

目次

I. 総括研究報告

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、職業性胆管癌の特徴と胆管癌の危険因子

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、
お佐藤恭子、小山孝一、三木幸雄、南山幸子

2. 職業性胆管癌にしばしばみられる平坦型異型病変 **biliary intraepithelial neoplasm (BillIN)** に関する病理学的検討および職業性胆管癌における **PD-1/PD-L1** の発現

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方法

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、久保正二

研究協力者 圓藤吟史

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

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
平成28年度総括研究報告書

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）
	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）

研究要旨

職業性胆管癌に対する総合的診断法を確立するため、検診結果、職業性胆管癌症例の曝露状況、臨床病理学および分子生物学的特徴について検討した。また、通常型胆管癌を含めて病理所見や腫瘍マーカーを含むバイオマーカーについて検討した。その結果、下記のような成果を得た。

(1) 今年度の検診において、肝機能異常 (γ -GTP 値や AST 値の上昇) や腹部超音波検査 (胆嚢ポリープなど) での異常所見が少数例でみられた。しかし、胆管癌を示唆する所見はみられず、新たな職業性胆管癌症例はみられなかった。

(2) MRI 像を検討したところ、職業性胆管癌症例では通常型胆管癌症例にみられる像と原発性硬化性胆管炎症例にみられる像の両者がみられることが特徴であった。また、FDG-PET は職業性胆管癌のステージングには有用であるが、前癌病変や早期癌病変の診断に対する有用性は乏しいと考えられる。

(3) 胆汁中チオール分析を行ったところ、職業性胆管癌症例では酸化型グルタチオンの割合が高く、慢性炎症や酸化ストレスの影響を受けていると考えられる。

(4) 外科的治療が望ましいが、同時性の多中心性発癌例や多中心性再発がみられることから、長期間の経過観察が必要である。

(5) 胆道癌の腫瘍マーカーの診断能を検討すると、血清 Duke Pancreatic Monoclonal Antigen Type 2 (DUPAN-2) の成績が最も良好で、職業性胆管癌のスクリーニングと診断にも有用であると考えられる。

(6) 肝内胆管癌の危険因子を検討すると、非アルコール性脂肪性肝炎が危険因子であった。生活習慣病を有する症例では年 2 回以上の γ -GTP 値と腫瘍マーカー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。

(7) Biliary intraepithelial neoplasia を異型度別に分類すると、異型度と MIB-1 指数や癌関連マーカーの発現と関連しており、この分類は発癌過程を病理学および病態的に検討する上で有用である。

(8) 職業性胆管癌においては高率に抗 (Programmed death-1) PD-1 抗体や抗 (Programmed death-ligand 1) PD-L1 抗体陽性となることから、免疫チェックポイント阻害剤が新たな治療法となると推測される。

(9) 同時性・異時性多発病変や前癌病変では、癌部でみられた特徴的な体細胞変異パターン (GpCpY to GpTpY) がみられるとともに、他の体細胞変異は重複しなかった。したがって、前癌病変の段階で浸潤癌にみられる体細胞変異がみられるとともに、それぞれが異なったクローン起源であり、多中心性発癌をきたす職業性胆管癌の特徴が分子生物学的検討からも明らかである。

(10) 1,2-ジクロロプロパンとジクロロメタンの曝露状況の検討から、それらの累積使用量と胆管癌発癌が関連しており、職業性胆管癌の診断において、それらの曝露状況や累積曝露量が重要な情報である。

以上より、曝露状況の把握、肝機能検査値や腫瘍マーカーなど検診における重要点と職業性胆管癌症例での新たな病理学的および分子生物学的特徴や病態が明らかになるとともに、多中心性再発などの治療上の注意点と免疫チェックポイント阻害剤による新たな治療法となる可能性が示された。

A. 研究目的

1,2-ジクロロプロパン (1,2-DCP) の曝露を受けた大阪の S 印刷事業場の元あるいは現従業員の検診結果、職業性胆管癌の臨床像、外科的切除肝や剖検肝を用いた病理学的所見、治療経過、胆管癌、前癌病変および早期癌病変の遺伝子変異プロファイルの検討および通常型胆管癌症例や健常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、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 の測定方法について検討する。さらに、1,2-DCP とジクロロメタン (DCM) を考慮した従事期間別に標準化罹患比 (SIR) と月ごとの洗浄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 SIR を算出する。これらの結果から、職業性胆管癌のスクリーニングや確定診断などの総合的診断法を確立する。

B. 研究方法

今年度は下記の課題について検討した。

(1) 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) に対する検診結果を検討した。

(2) 職業性胆管癌の画像診断上の特徴である広範囲胆管の狭窄像や拡張像について、職業性胆管癌症例、通常型胆管癌症例、原発性硬化性胆管炎 (PSC) 症例および健常者の

MRI 像を比較、検討した。また、職業性胆管癌症例の ^{18}F -Fluorodeoxy Glucose-Positron Emission Tomography (FDG-PET) 所見を検討した。

(3) 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。

(4) 職業性胆管癌の外科治療成績と臨床病理学的所見を検討した。

(5) 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 Duke Pancreatic Monoclonal Antigen Type 2 (DUPAN-2) の臨床的意義について検討した。

(6) 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。

(7) 胆管癌の前癌病変である Biliary intraepithelial neoplasia (BilIN) の病態を解明するため、多数の通常型胆管癌 (結節型/び漫型) 症例を用い、BilIN およびその関連病変の検討を行った。

(8) 職業性胆管癌 9 例 10 病変のホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いて、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。

(9) 職業性胆管癌 4 例の浸潤癌病変および他の 11 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。

（10）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。

（11）1,2-DCP と DCM の月ごとの洗浄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。

（12）これらの結果より職業性胆管癌のスクリーニングを含めた総合的診断法や治療法を考察した。

C. 研究結果

（1）検診結果

今年度も引き続き S 社の元あるいは現従業員のうち、DCM や 1,2-DCP に曝露された従業員や健康管理手帳交付者に対して検診を行った。健康管理手帳交付者 16 例中 4 例では職業性胆管癌症例の特徴である血清 γ -GTP 値が持続的に高値であった。2 例では AST 値が、1 例ではアルカリフォスファターゼ値が上昇していた。血清 CA19-9 高値例はみられなかった。腹部超音波検査では胆嚢ポリープが 2 例に、脂肪肝が 4 例にみられた。しかし 16 例全例において胆管癌を示唆する異常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 名に行われた。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。しかし、胆管癌を示唆する異常所見はみられなかった。すなわち、今年度の

検診において、新たに胆管癌と診断された患者はみられなかった。

（2）画像所見

従来より、職業性胆管癌症例の MRI 像、特に MRCP 像において、広範囲の胆管の狭窄や拡張がみられ、PSC 症例の画像所見と類似していることを報告してきた。そこで、職業性胆管癌の画像所見の特徴をさらに明らかにするため、職業性胆管癌 5 例の MRI 像を通常型胆管癌 8 例、PSC 6 例および肝胆膵疾患を有さない健常者 8 例の MRI 像と比較検討した（表 1）。その結果、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、そのうち職業性胆管癌 2 例と通常型胆管癌 4 例では腫瘤形成型肝内胆管癌像が、職業性胆管癌 2 例では胆管内発育型肝内胆管癌像がみられた。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。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、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 4 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。

職業性胆管癌 10 例における治療前 FDG-PET 像を検討した。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 1）。しかし、前癌病変あるいは早期癌病変である BilIN や Intraductal papillary neoplasm of the bile duct (IPNB) 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。

(3) 胆汁中チオールと胆汁酸分析

職業性胆管癌を含む各種肝胆膵疾患症例における胆汁中チオール分析では、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 (図 2)。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、他の患者では低く、職業性胆管癌の特徴と考えられた。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考えられる。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 3)。

(4) 外科治療成績と臨床病理学的所見

全国の職業性胆管癌 20 例の外科治療後の経過を検討した。20 例中 12 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 5 例では、原発部位と異なる部位に単発の再発病巣がみられた。このうち 4 例には再切除が施行されたが、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。この 4 例中 2 例では再々発がみられ、外科治療が行われた。このうち 1 例では切除標本を詳細に検討しえたが、腺癌に加えて、その周囲の胆管には BilIN 病変が認められた (図 4)。すなわち、再々発病巣も多中心

性発癌と考えられた。したがって、職業性胆管癌症例では広範囲の胆管の発癌ポテンシャルが亢進しているため、多中心性発癌を繰り返すことがあり、長期間にわたる経過観察が必要であると考えられた。

(5) 胆道癌の腫瘍マーカー

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、血清 DUPAN-2 の成績が最も良好であった (表 2)。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。

(6) 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。

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、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 回以上の血清 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。

(7) Biliary intraepithelial neoplasia (BilIN)の病態の解明

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 (表 3、4)。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。

(8) 職業性胆管癌における PD-L1 や PD-1 の発現

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 5)。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 ($p < 0.01$ 、表 5)。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 5)。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 ($p < 0.05$ 、表 6)。PD-L1 は癌部に浸潤する単核細胞にも陽性となった (図 5)。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や肝外胆管癌より有意に多かった ($p < 0.01$ 、図 6)。

PD-1 の発現は癌部に浸潤する単核細胞に認められた (図 5)。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や肝外胆管癌より有意に多かった ($p < 0.01$ 、図 6)。

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 ($p < 0.05$)。

(9) 職業性胆管癌における体細胞変異プロフィール

同時・異時多発病変、前癌病変は平均 71.6/Mb (範囲: 6.3-214.4/Mb) の体細胞変異を有しており、既報の職業性胆管癌の特徴同様、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。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、センス鎖とアンチセンス鎖における変異頻度の有意差が 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。

(10) 職業性胆管癌患者の曝露濃度および曝露期間の推定

S社では、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 (図7)。また前室作業者では、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。職業性胆管癌17例における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 (表7)。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。

FID付のガスクロマトグラフ (GC-FID) による 1,2-DCP の個人曝露測定法では、4.6 ~ 1200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲で検量線の直線性が確認できた。最終試料液 4.6 ~ 1200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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。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。

(11) 1,2-DCP と DCM の累積使用量別の SIR

職業性胆管癌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-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。

D. 考察

職業性胆管癌や通常型胆管癌症例の臨床病理学的所見の検討から、職業性胆管癌のスクリーニングと診断には、 γ -GTP、AST、

ALTなどの肝機能異常、腫瘍マーカーである血清CA19-9、CEAやDUPAN-2値の上昇、腹部超音波検査、CT、MRCPにおける限局性の肝内胆管拡張像や腫瘤像などの検出が重要である。また、FDG-PETは職業性胆管癌のステージングには有用と考えられたが、BiINやIPNBなどの前癌病変や早癌期病変の診断には有用性が乏しいと考えられた。病理所見においては主腫瘍以外に慢性胆管傷害、BiINなどの前癌病変や早癌期病変が広範囲の胆管にみられることが特徴である。そこで胆管全域の病変の解析を行ったところ、前癌病変を含めたほとんどの病変が既報の職業性胆管癌に特徴的な共通の遺伝子変異プロファイルを有することが見出された。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。この広範囲の胆管の発癌ポテンシャルの亢進は、臨床的には多中心性発生や多中心性再発に関連するため、根治的治療後も長期間の経過観察が必要となると考えられる。また、胆汁中チオール分析の結果は酸化ストレスの亢進や慢性炎症を反映しているとともに、胆汁中2次胆汁酸お増加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。

一方、職業性胆管癌では高率にかつ広範囲にBiINの出現することが知られているが、通常型胆管癌でも癌周囲の胆管粘膜にしばしばBiIN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。

職業性胆管癌では高率に遺伝子変異が認められる。このことから、職業性胆管癌に対する新たな治療の検討として、PD-L1 や PD-1 の発現などについて検討した。その結果から職業性胆管癌では PD-L1 の発現が亢進しており、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。一般に、体細胞変異量が多い腫瘍細胞は PD-L1 を発現しやすい傾向があり、正常細胞には存在しない新たな抗原(ネオ抗原)を発現し、これらの抗原に対し強い免疫応答を惹起するため免疫チェックポイント阻害薬により排除されやすい傾向があるとされる。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癌で、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考えられ、抗 PD-1 抗体を用いたがん免疫療法の効果が期待される。

S 社については、再現実験の結果を基に、実際の使用量のデータを用いて曝露濃度を推定しており、適切に推定できていると考えられる。一方、複数の胆管がん患者が発生した 3 つの小規模印刷会社における患者 7 例の曝露状況を推定し、1,2-DCP の曝露期間および曝露濃度はそれぞれ 7-17 年および 62-240 ppm であった。これらのデータを基に、この患者 7 例の累積曝露量を算出すると、690-2550 ppm-年となる。S 社の職業性胆管癌 17 例の 1,2-DCP 累積曝露量は 646-3409 ppm-年であり、上記 7 例と同程度であ

った。

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 である 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 GC-MS を使用して 1,2-DCP を測定する方法を報告されているが、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。

1,2-DCP および DCM 累積使用量別の SIR は、概ね両者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。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-years 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。S 社の職業性胆管癌において 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。

以上より、職業性胆管癌のスクリーニングや診断には下記の点が重要である。(1) 1,2-DCP と DCM の曝露状況の検討から、

それらの累積使用量と胆管癌発癌が関連しており、職業性胆管癌の診断において、1,2-DCP や DCM の曝露状況や累積曝露量が重要な情報である。(2) 臨床検査値では、 γ -GTP、AST、ALT 値の経時的な推移および腫瘍マーカーとして血清 CA19-9 および DUPAN-2 値の測定が重要である。(3) 画像診断においては、腫瘤像や胆管内腫瘤像も加えて胆管拡張像や腫瘍を伴わない限局性胆管拡張像や狭窄像が重要であり、MRCPにおいて特徴的な像が得られると考えられる。これらの画像所見は、浸潤癌のみならず BilIN や IPNB 病変などの前癌病変、早期癌病変および慢性胆管傷害像がみられる病理学的所見を反映している。一方、FDG-PET は胆管癌のステージングには有用ではあるが、広範囲の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。(4) 病理学的には高分化型から低分化型腺癌の主腫瘍とともに広範囲の胆管に BilIN や IPNB 病変が見られることが特徴である。(5) この進行癌および前癌病変には高頻度に体細胞変異が認められ、特異的な 3 塩基置換パターンがみられた。このことは共通の変異原性ストレスが胆管の異なる部位に変異を蓄積し、広範囲の胆管に前癌病変や早期癌病変がみられ、発癌ポテンシャルを亢進させ、多中心性発癌を来たす職業性胆管癌の特徴を反映している。(6) 胆汁中チオール分析結果は慢性炎症や酸化ストレスが影響を受けていると考えられる。(7) 一方、外科的治療が望ましいが、前述のように多中心性再発がみられることから、長期間の経過観察が必要である。(8) 職業性胆管癌においては高率に抗 PD-1 抗体や抗 PD-L1 抗体陽性となることから、免

疫チェックポイント阻害剤が新たな治療戦略となると推測される。

G. 結論

職業性胆管癌においては塩素系有機溶剤の曝露によって広範囲の胆管に遺伝子変異を伴う慢性胆管傷害が発生し、広範囲の胆管に前癌病変や早期癌病変が誘導され、最終的に浸潤癌となると考えられる。この過程を反映する臨床症状、臨床検査値、画像診断像および病理学的所見が職業性胆管癌の特徴である。また、根治治療後にも多中心性再発がみられることも特徴である。遺伝子変異では職業性胆管癌の症例に共通点が見出されることは、共通の発癌物質に曝露されたことを示している。さらに、この高率な遺伝子変異と PD-L1 抗体による免疫組織学的検討は免疫チェックポイント阻害剤が新たな治療法となりうることを示している。職業性胆管癌の研究成果から、通常型胆管癌での病理学的特徴、腫瘍マーカーを含むバイオマーカーの開発など、他の分野への貢献が期待される。

E. 研究発表

1. 論文発表

1) 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
- 2) Kinoshita M, Kubo S, Tanaka S, Takemura S, Nishioka T, Hamano G, Ito T, Koda M, Aota T, Tanaka S, Kuwae Y, Osawa M, T. Shibata. The association between non-alcoholic steatohepatitis and intrahepatic cholangiocarcinoma: A hospital based case-control study. *Journal of Surgical Oncology* 2016;113:779-783
- 3) 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
- 4) 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;73:545-55
- 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 may be aberrantly activated in occupational cholangiocarcinoma. *Pathology International* 2017;67:163-170
- 6) 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)
- 7) 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
- 8) 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
2. 学会発表
- 1) 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
- 2) Kubo S, Takemura S, Tanaka S, Kinoshita M, Hamano G, Nakanuma Y, Sato Y, Mimaki S, Tsuchihara K. Development of cholangiocarcinoma in a printing company employee: Occupational cholangiocarcinoma. The 7th Asia-Pacific Primary Liver Cancer Expert Meeting. 2016
- 3) 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
- 4) 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

5) 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

6) 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

7) 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 回日本癌学会学術集会 2016

8) 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

9) 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癌術後再発予測マーカー作成. 第 20 回日本肝臓学会大会 2016

10) Ito T, Tanaka S, Takemusa 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
分担研究報告書

1. 検診結果、職業性胆管癌の特徴と胆管癌の危険因子

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）
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（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） 南山幸子（京都府立大学大学院生命環境科学研究科）

研究要旨

（1）今年度の検診において、肝機能異常（ γ -GTP 値や AST 値の上昇）や腹部超音波検査（胆嚢ポリープなど）での異常所見が少数例でみられた。しかし、胆管癌を示唆する所見はみられず、新たな職業性胆管癌症例はみられなかった。

（2）MRI 像を検討したところ、職業性胆管癌症例では通常型胆管癌症例にみられる像と原発性硬化性胆管炎症例にみられる像の両者がみられることが特徴であった。また、FDG-PET は職業性胆管癌のステージングには有用であるが、前癌病変や早期癌病変の診断に対する有用性は乏しいと考えられる。

（3）胆汁中チオール分析を行ったところ、職業性胆管癌症例では酸化型グルタチオンの割合が高く、慢性炎症や酸化ストレスの影響を受けていると考えられる。

（4）外科的治療が望ましいが、同時性の多中心性発癌例や多中心性再発がみられることから、長期間の経過観察が必要である。

（5）胆道癌の腫瘍マーカーの診断能を検討すると、血清 Duke Pancreatic Monoclonal

Antigen Type 2 (DUPAN-2) の成績が最も良好で、職業性胆管癌のスクリーニングと診断にも有用であると考えられる。

(6) 肝内胆管癌の危険因子を検討すると、非アルコール性脂肪性肝炎が危険因子であった。生活習慣病を有する症例では年 2 回以上の γ -GTP 値と腫瘍マーカー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。

(7) 以上の検討から、職業性胆管癌のスクリーニングと診断には、 γ -GTP、AST、ALT 値などの肝機能異常、腫瘍マーカーである血清 CA19-9、CEA や DUPAN-2 値の上昇、腹部超音波検査、CT、MRCP における限局性の肝内胆管拡張像や腫瘍像などの検出が重要である。また、病理所見においては主腫瘍以外に BiIIN などの前癌病変が広範囲の胆管にみられることが特徴であり、多中心性発癌を繰り返すことがあるため、長期間にわたる経過観察が必要である。大阪市立大学医学部附属病院での胆管がん特別外来や健康管理手帳による検診においてこれまでに S 社従業員 4 名が職業性胆管癌と診断され、加療されたことから、職業性胆管癌のスクリーニングと診断には、上記の診断法が臨床的には妥当であると考えられる。ただし、現在の健康管理手帳による検診時には腫瘍マーカーとして CA19-9 のみ測定されているが、血清 DUPAN-2 値の測定も考慮されてよいと考えられた。

A. 研究目的

1,2-ジクロロプロパンの曝露を受けた大阪の S 印刷事業場の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の胆管癌症例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。これらの結果から職業性胆管癌のスクリーニングや確定診断などの総合的診断法を確立する。

B. 研究方法

今年度は下記の課題について検討した。

(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-ジクロロプロパン (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 (DCP 業務従事者) に対して行った検診結果を検討した。

(2) 職業性胆管癌の画像診断上の特徴である広範囲胆管の狭窄像や拡張像について、

職業性胆管癌症例、通常型胆管癌症例、原発性硬化性胆管炎 (PSC) 症例および健康者の MRI 像を比較、検討した。また、 ^{18}F -Fluorodeoxy Glucose- Positron Emission Tomography (FDG-PET) 所見を検討した。(3) 職業性胆管癌症例の臨床像、病理学的所見、胆汁中チオールと胆汁酸分析および外科治療成績の検討から、職業性胆管癌症例の特徴を検討した。(4) 職業性胆管癌の外科治療成績と臨床病理学的所見を検討した。(5) 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 Duke Pancreatic Monoclonal Antigen Type 2 (DUPAN-2) の臨床的意義について検討した。(6) 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。(7) これらの結果より職業性胆管癌の総合的診断法や治療法を考察する。を

C. 研究結果

(1) 検診結果

今年度も S 社の元あるいは現従業員のうち、健康管理手帳交付者 16 例中 4 例では職業性胆管癌症例の特徴である血清 γ -GTP 値が持続的に高値であった。この 4 例中 1 例はトリクロロエチレンによると考えられる重症肝炎の既往歴 (Kubo S, et al. J Occup Health 2015;57;87-90) を有していた。2 例では AST 値が、1 例ではアルカリフォスファターゼ値が上昇していた。血清 CA19-9 高値例はみられなかった。腹部超音波検査では胆嚢ポリープが 2 例に、脂肪肝が 4 例にみられた。しかし、全例において胆管癌を示唆する異常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 16 名の検診の結果、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。しかし、胆管癌を示唆する異常所見はみられなかった。すなわち、今年度の検診において、新たに胆管癌と診断された患者はみられなかった。

(2) 画像所見

職業性胆管癌症例の MRI 像や Magnetic resonance cholangiopancreatography (MRCP) 像において、広範囲の胆管の狭窄や拡張がみられ、PSC 症例の画像所見と類似していることを報告してきた。そこで、職業性胆管癌 5 例の MRI 像を通常型胆管癌 8 例、PSC6 例および肝胆膵疾患を有さない健常者 8 例の MRI 像と比較検討した(表 1)。その結果、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、そのうち

DCM や 1,2-DCP に曝露された従業員や健康管理手帳交付者に対して検診を行った。職業性胆管癌 2 例と通常型胆管癌 4 例では腫瘤形成型胆管癌像が、職業性胆管癌 2 例では胆管内発育型胆管癌像がみられた。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。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 4 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。

S 社の職業性胆管癌 10 例における治療前 FDG-PET 像を検討した(図 1)。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。しかし、Biliary intraepithelial neoplasia (BilIN) 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の両者がみられることが特徴であった。

(3) 胆汁中チオールと胆汁酸分析

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 cystathionine 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、他の患者では低く、職業性胆管癌の特徴と考えられた (図 2)。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る。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 3)。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た。

(4) 外科治療成績と臨床病理学的所見

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 例の外科治療後の経過を検討した (Kubo S, et al. J Hepato-Biliary Pancreat Sci 2016;23:556-564)。20 例中 12 例に胆管癌再発がみられたが、肝内多発再発が 2 例に、胆管断単再発が 5 例にみられた。他の 5 例では、原発部位と異なる部位に単発の再発病巣がみられた。このうち 4 例には再切除が施行されたが、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。

この 4 例中 2 例では再々発がみられ、外科治療が行われた。そのうち 1 例では切除標本を詳細に検討しえたが、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り、職業性胆管癌症例の特徴である BilIN が認められた (図 4)。すなわち、再々発病巣も多中心性発癌と考えられた。したがっ

て、職業性胆管癌症例では広範囲の胆管の発癌ポテンシャルが亢進しているため、多中心性発癌を繰り返すことがあり、長期間にわたる経過観察が必要であると考えられた。

(5) 胆道癌の腫瘍マーカー

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、S 社の職業性胆管癌症例において CEA は 18 例中 11 例、CA19-9 は 18 例中 13 例、DUPAN-2 は 7 例中 7 例、それ以外の職業性胆管癌症例において CEA は 18 例中 6 例、CA19-9 は 18 例中 10 例、DUPAN-2 は 5 例中 5 例で上昇していた。全例をまとめると、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(表2)、血清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スクリーニングと診断に有用であると考えられた。しかし、職業性胆管癌症例では特徴的な胆管の慢性的な胆管傷害がみられることから、血清DUPAN-2値に対するこれらの影響を今後検討する必要があると考えられた。

(6) 胆管癌の危険因子

肝内胆管癌切除症例と病理標本の検討が可能であり、かつ、背景肝疾患を伴わない転移性肝癌の比較(Hospital-based case control study)から肝内胆管癌の危険因子を検討した。その結果、当科における肝内胆管癌切除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。一方、転移性肝癌83例からC型肝炎やアルコール多飲の14例を除く69例のうち13例にNASHが確認された。これらから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。

一方、糖尿病、高血圧、脂質異常症の生活習慣病からみると、肝内胆管癌のうち既知の危険因子を有する症例を除く43例のうち、生活習慣病に対する定期的(年2回)な経過観察中に肝内胆管癌が発見されたのが16例、生活習慣病を有する者の定期的な

経過観察がなかったのが14例、生活習慣病を有さなかったのが13例であった。定期的な経過観察をされていた16例では γ -GTP値やCA19-9値の上昇、腹部超音波検査やCTでの腫瘍像が胆管癌発見のきっかけとなったが、他の症例では肝内胆管癌による症状出現後、医療機関を受診した。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。

D. 考察

職業性胆管癌や通常胆管癌症例の臨床病理学的所見の検討から、職業性胆管癌のスクリーニングと診断には、 γ -GTP、AST、ALT値などの肝機能異常、腫瘍マーカーである血清CA19-9、CEAやDUPAN-2値の上昇、腹部超音波検査、CT、MRCPにおける限局性の肝内胆管拡張像や腫瘍像などの検出が重要である。また、FDG-PETは職業性胆管癌のステージングには有用と考えられたが、BiIINやIPNBなどの前癌病変や早癌期病変の診断には有用性が乏しいと考えられた。病理所見においては主腫瘍以外にBiIINなどの前癌病変や早癌期病変が広範囲の胆管にみられることが特徴であり、多中心性発癌を繰り返すことがあるため、長期間にわたる経過観察が必要である。

大阪市立大学医学部附属病院での胆管がん特別外来や健康管理手帳による検診において、これまでにS社従業員4名が職業性胆管癌と診断され、加療されたことから、

職業性胆管癌のスクリーニングと診断には、上記の診断法が臨床的には妥当であると考えられる。ただし、現在の健康管理手帳による検診時には腫瘍マーカーとして血清CA19-9 値のみ測定されているが、血清DUPAN-2 値の測定も考慮してよいと考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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
- 2) Kinoshita M, Kubo S, Tanaka S, Takemura S, Nishioka T, Hamano G, Ito T, Koda M, Aota T, Tanaka S, Kuwae Y, Osawa M, T. Shibata. The association between non-alcoholic steatohepatitis and intrahepatic cholangiocarcinoma: A hospital based case-control study. *Journal of Surgical Oncology* 2016;113:779-783
- 3) 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

4) 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

5) 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)

6) 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

7) 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

2. 学会発表

- 1) 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

2) 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

3) 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

4) 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

5) 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

6) 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

7) 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 回日本癌学会学術集会 2016

8) 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

9) Ito T, Tanaka S, Takemusa 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
分担研究報告書

2. 職業性胆管癌にしばしばみられる平坦型異型病変 biliary intraepithelial neoplasm (BiIN) に関する病理学的検討および職業性胆管癌における PD-1/PD-L1 の発現

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

職業性胆管癌の病理病態を明らかにすることを目的とし、本年度は (I) 職業性胆管癌にしばしばみられる平坦型異型病変 biliary intraepithelial neoplasm (BiIN) に関する病理学的検討、ならびに (II) 腫瘍免疫の回避に関与する programmed death-1 (PD-1)、programmed death-ligand 1 (PD-L1) の発現に関する免疫組織化学的検討を行った。

(I) 職業性胆管癌にしばしばみられる BiIN に関する病理学的検討：通常型胆管癌 (57 例) の外科切除材料を用いた組織学的検討を行った。胆管上皮内にみられる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 IENBs を 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。IENBs は 57 例中 31 例にみられ、group C が 26 例、group B が 22 例、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的および病態的に検討する上で貴重な分類と考えられた。職業性胆管癌では高率にかつ広範囲に BiIN の出現することが知られているが、通常型胆管癌でも癌周囲の胆管粘膜にしばしば BiIN 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。

(II) 職業性胆管癌における PD-1/PD-L1 の発現：職業性胆管癌 (9 例 10 病変) では全例の癌細胞に PD-L1 の発現を認め、前癌/前浸潤性病変 (BiIN, intraductal papillary neoplasm of bile duct) もしばしば PD-L1 を発現した。PD-L1 発現は腫瘍間質に浸潤する単核細胞 (主に腫瘍関連マクロファージ) にも観察され、職業性胆管癌における腫瘍間質の PD-L1 陽性単核細胞数は対照群 (肝内胆管癌, 肝外胆管癌) より有意に多かった。PD-1 は腫瘍間質に浸潤する T リンパ球に発現を認めた。腫瘍間質の PD-1 陽性リンパ球数ならびに CD8 陽性リンパ球数は、職業性胆管癌において対照群より有意に高値を示した。癌細胞のア

ポトーススを TUNEL 法で検討した結果、職業性胆管癌における癌細胞のアポトーススは対照群より有意に抑制されていた。以上の結果から、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。

(I) 職業性胆管癌にしばしばみられる BilIN に関する病理学的検討

A. 研究目的

印刷事業所のオフセット印刷の作業過程で使用された塩素系有機溶剤である 1,2-ジクロロプロパン 1,2-dichloropropane (DCP) とジクロロメタン dichloromethane (DCM) に長時間、高濃度暴露をうけた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。1,2-DCP と DCM ばく露に関連した労務災害の可能性が強く示唆されている。本分担者は、1,2-DCP と DCM ばく露が関係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あ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) がしばしばみられることを報告してきた。職業性胆管癌では、胆管内発育型の胆管癌（しばしば非浸潤性）および平坦型の上皮内胆管異型病変がしばしば経験される。これらの病変の成り立ちは、非職業性の胆管癌の早期病変あるいは前浸潤性の病変としても注目されている。

BilIN は従来より、肝内結石症などの慢性胆管障害に発生する胆管癌の先行病変あるいは前浸潤性病変とされている。顕微鏡レベルで同定される病変であり、その異型度から BilIN-1（軽度デスプラジア）、BilIN-2（中等度デスプラジア）、それに BilIN-3（高度デスプラジア）に異型度分類される。この病変は、職業性胆管癌の背景胆管でもしばしばみられ、職業性胆管癌での発癌機序から注目されている。そこで、今年度は BilIN の病態の

解明を行うため、多数の通常型胆管癌（結節型/び漫型）症例を用い、BilIN およびその関連病変の検討を行った。

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。ホルマリン固定後、パラフィン包埋し、その後、30 枚以上の薄切片を作成し、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. 研究結果、D. 考察

(1) Intraepithelial neoplasms of the bile duct (IENBs) :

通常型胆管癌にみられる上皮内病変には、複数のカテゴリーが存在すると考えられる。つまり浸潤性胆管癌の先行病変である BilIN であり、さらに一度、浸潤性に発育した癌が、再び胆管上皮層内へ逆戻りして上皮内を発育進展する cancerization があると考えられ、キメラ状態になっていると推定される。これらの病変の鑑別は、従来試みられていない。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う。IENBs は、胆管上皮層内で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、高異型度デスプラシ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)。

(2) IENB の出現と意義(表1、表2)：

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。

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 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。

E. 結論

従来、職業性胆管癌では、高率にかつ広範囲に BiIN 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 BiIN 病変が認められた事から、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。

(II) 職業性胆管癌における PD-1/PD-L1 の発現：

A. 研究目的

Programmed death-1 (PD-1) は活性化 T 細胞に発現する免疫抑制受容体で、T 細胞の増殖とエフェクター機能を抑制し、正常では「免疫チェックポイント」として自己への不適切な免疫応答の回避に関与している。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-1 リガンド (programmed death-ligand 1、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おり、一般に PD-L1 を高発現している腫瘍は予後不良という報告が多い。近年、PD-1/PD-L1 を介した腫瘍免疫の回避機構を標的としたがん免疫療法として、抗 PD-1 抗体 (ニボルマブ、ペンブロリズマブ) が注目されている。

今回、職業性胆管癌における PD-1/PD-L1 の発現状態を明らかにすることを目的とし、免疫組織化学的な検討を行った。

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 10 病変の切片では浸潤癌に加えて 7 例に BiIN 病変、4 例に IPNB 病変を認めた。対照として肝内胆管癌 (23 例)、肝外胆管癌 (45 例)、BiIN 病変を伴う肝内結石症 (14 例)、IPNB (16 例) のホルマリン固定パラフィン包埋切片を使用した。これらを対象として抗 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。

C. 研究結果

(1) 職業性胆管癌における PD-L1 の発現：

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 1A)。PD-L1 の陽性染色は癌の一部に局限し、切片上で癌の陽性細胞の割合が 10% を超える症例は 2 例のみであり、びまん性に陽性となる症例はなかった。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。対照群においても、癌の陽性細胞の割合が 10% を超える症例は肝外胆管癌の 1 例のみであった。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 ($p < 0.01$) (表 3)。

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 (BiIIN、IPNB) もしばしば PD-L1 陽性を示した (図 1B、C)。BiIIN 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 ($p < 0.05$) (表 4)。

PD-L1 は癌部に浸潤する単核細胞にも陽性となった (図 1A)。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 ($p < 0.01$) (図 2A)。

(2) 腫瘍間質における PD-1 陽性細胞、CD8 陽性リンパ球の浸潤：

PD-1 の発現は癌部に浸潤する単核細胞に認められた (図 1D)。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 ($p < 0.01$) (図 2B、C)。

(3) 癌細胞のアポトーシス：

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。肝外胆管癌は腫瘍間質の CD8 陽性リンパ球数が多く、かつ癌細胞に PD-L1 の発現のない症例を選択した。対象とした 2 群において腫瘍間質の CD8 陽性リンパ球数に有意差はなかった。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 ($p < 0.05$)。

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 BiIIN 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-L1 の発現誘導には MAPK 経路や PI3K/Akt 経路、いくつかの転写因子、エピジェネティックな因子の関与が明らかとなっている。職業性胆管癌は有機溶剤のばく露という特殊な環境下で発症しており、本症における PD-L1 の発現誘導の機序はさらに検討する必要がある。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、再発時に PD-L1 の発現亢進を認めたが、文献的にゲムシタピンは *in vitro* で胆管癌細胞に PD-L1 の発現を誘導し、これが抗癌剤の耐性に関与するという報告がある (1)。実際にこの症例は初回手術の後、ゲムシタピンを含めた補助化学療法を行っており、これが PD-L1 発現誘導の一因となった可能性がある。

最近の胆道癌の大規模ゲノム解析で予後不良のサブグループは体細胞変異が多く、その中に PD-L1 を高発現している群があることが報告されている (2)。今回、職業性胆管癌で PD-L1 の高発現を認めたが、職業性胆管癌に体細胞変異がきわめて多いことは既に Mimaki らが報告している (3)。体細胞変

異量が多い腫瘍細胞は PD-L1 を発現しやすい傾向があり、正常細胞には存在しない新たな抗原（ネオ抗原）を発現し、これらの抗原に対し強い免疫応答を惹起するため免疫チェックポイント阻害薬により排除されやすい傾向があるとされる（4）。

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（5）。職業性胆管癌はこうした条件を満たしていると思われ、抗 PD-1 抗体を用いたがん免疫療法の効果が期待される。

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ており、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。

参考文献

1. Koido S et al. *Anticancer Res* 2014;34:6353-61.
2. Nakamura H et al. *Nat Genet* 2015;47:1003-10.
3. Mimaki S et al. *Carcinogenesis* 2016;37:817-26.
4. Madore J et al. *Clin Cancer Res.* 2016;22:3915-23.
5. Tumeh PC et al. *Nature.* 2014;515:568-71.

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.

2. 学会発表

なし

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 (++) ^b	3 (18.8%) ^b	5 (22.7%) ^b	15 (57.7%)	26 (83.9%)
E-cadherin (++) ^a	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%)

+^a, 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 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%)

表4 前癌/前浸潤性病変におけるPD-L1の発現

Subject	n	Positive
BillIN		
Occupational cholangiocarcinoma	7	4 (57%)
Hepatolithiatic liver	14	2 (14%)
IPNB		
Occupational cholangiocarcinoma	4	2 (50%)
Conventional IPNB	16	1 (6%)

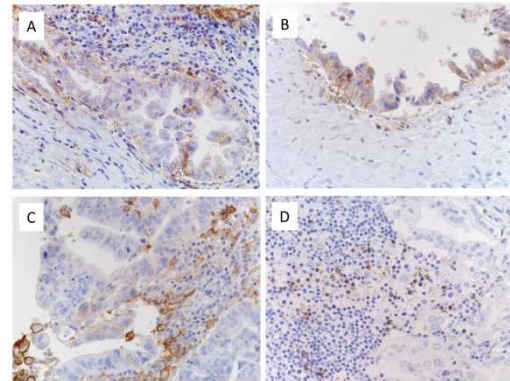


図1 職業性胆管癌におけるPD-L1, PD-1の発現
A, PD-L1 (浸潤癌). B, PD-L1 (胆管上皮層内腫瘍, BillIN). C, PD-L1 (胆管内乳頭状腫瘍, IPNB). D, PD-1 (浸潤部)

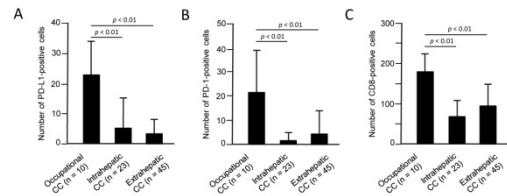


図2 腫瘍間質に浸潤するPD-L1, PD-1, CD8陽性細胞数
A, PD-L1陽性単核細胞数. B, PD-1陽性リンパ球数. C, CD8陽性リンパ球数.

労災疾病臨床研究事業費補助金
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早期・探索研究センター）

研究要旨

既に我々は、職業性胆管癌に特徴的な遺伝子変異プロファイルとして、①きわめて高頻度の体細胞変異、②一塩基置換のセンス・アンチセンス鎖間のバイアス、③特異的な3塩基置換パターンを見出してきた。これらの特徴が同時・異時多発病変、前癌病変にも共通するかを明らかにし、この特徴的な遺伝子変異プロファイルが本疾患のゲノムバイオマーカーになり得るかを検討するため、職業性胆管癌症例4例の同時・異時多発、前癌、計11病変の網羅的ゲノム解析を行った。その結果、前癌病変も含めた全病変において高頻度の体細胞変異が認められ、一塩基置換のセンス・アンチセンス鎖間のバイアスは11病変中10病変、特異的な3塩基置換パターンは11病変中9病変において認められた。このことは共通の変異原性ストレスが胆管の異なる場所に変異を蓄積し、職業性胆管癌の多中心性発生の原因となっていることを示唆する結果であった。また、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された。

A. 研究目的

職業性胆管癌では、胆管全域にわたり慢性胆管傷害、前癌病変、早期癌病変が認められ、広範囲の胆管が高い発癌ポテンシャルを有し、多中心性発癌の母地である可能性が示唆されている。我々の見出した職業性胆管癌に特徴的な遺伝子変異プロファイルが、前癌、早期癌も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かを明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

我々は既に、職業性胆管癌症例4例（Case 1、Case 2、Case 3、Case 4）の浸潤癌病変の網羅的ゲノム解析を試み報告を行ってきた（Mimaki S, et al. Carcinogenesis 2016 Aug;37(8):817-26）。今回はその報告と同一症例で観察された別病変、計11病変（同時・

異時多発病変、前癌病変）を解析対象とした。Case 1では同時多発浸潤癌2病変、Case 2では前癌5病変、Case 3では同時多発浸潤癌1病変、Case 4では前癌2病変、異時多発（再発）1病変を対象とし、FFPE組織検体よりDNAを抽出し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、既報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

各病変は平均 71.6/Mb (範囲: 6.3-214.4/Mb) の体細胞変異を有しており、既報の職業性胆管癌の特徴同様、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。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、センス鎖とアンチセンス鎖における変異頻度の有意差が 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。

D. 考察

職業性胆管癌では、胆管全域にわたり慢性胆管傷害、前癌病変、早期癌病変が認められ、孤発性の同時・異時多発腫瘍も多数観察されることから、多中心性発癌が示唆されている。このことは、原因物質と予想されている化学物質が胆管全域に曝露され、胆管全域の発癌ポテンシャルを上げていると予測できるが、どのようなポテンシャルを有しているかは不明であった。我々は、胆管全域の病変が、既報の、職業性胆管癌に特徴的な遺伝子変異プロファイルを有するのではと考え、解析を行ったところ、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有することを見出した。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。また、各病変が有しているドライバー遺伝子変異には浸潤癌と前癌で際立った差がなく、前癌から浸潤癌への移行に何が必要かは今後の課題であるが、これらの病変の丹念な解析によりその手がかりが得られる可能性があると考ええる。

E. 結論

共通の変異原性ストレスが胆管の異なる場所に変異を蓄積し、職業性胆管がんの多中心性発生の原因となっている可能性をゲノムレベルで証明できた。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。

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, 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

2. 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

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

平成 28 年度分担研究報告書

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方法と創薬の試み

研究分担者 河田則文（大阪市立大学大学院医学研究科肝胆膵病態内科学）

研究協力者 村上善基、川村悦史（大阪市立大学大学院医学研究科肝胆膵病態内科学）

研究要旨

肝内胆管癌は早期発見が困難で予後不良である。胆管癌組織のトランスクリプトーム、メタボローム解析の結果から胆管癌特異的なマーカー探索と発癌経路解析を試みた。

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。

我々は外科的に切除した肝内胆管癌とその非癌部、比較対象として肝細胞癌とその非癌部組織よりトランスクリプトームとメタボローム解析を行ない、胆管癌細胞特異的な遺伝子発現パターンと低分子の存在様式を明らかにした。胆管癌の病理組織学的診断は肝細胞癌細胞と混在例や、腺管構造が明らかではない低分化型の場合等診断が困難なことがある。そのため胆管癌特異的な分子標的を探索し、新規抗癌剤創薬のため

の予備実験を行なった。

B. 研究方法

(1) 分子標的薬探索のための予備実験

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) XTT 取り込みによる細胞増殖活性とアポトーシスの評価

それぞれ $2e+04/100\mu\text{l}$ 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

13nMと52nMのsiRNA (KARS, MARS) (FrexiTube siRNA Qiagen) を Lipofectamine RNAiMAX (lifetechnology) を用いて 8e+04/24well 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'-
TCTTCCCATTGACCTTCAG-3'

C. 結果

miRNA による機能解析

今までの実験結果より ICC 組織と HCC 組織で発現の異なった 4 種の miRNA (ICC>HCC: let-7b-5p, miR-21-5p, miR-29a-3p, ICC<HCC: miR-122-5p) の各癌細胞株に与える影響を観察した

(Murakami Y et al. Sci Rep 2015)。

XTT 取り込みによる細胞増殖効果は 4 種の miRNA の過剰発現は短時間の観察では細胞増殖に影響しなかった。また Caspase-9 によるアポトーシス誘導効果は let-7b-5p は過剰発現でアポトーシス誘導効果がみられた。また miR-21-5p, miR-29a-3p は HepG2 によってアポトーシス抑制効果があった。

ARS の機能解析

今回選択した ARS は以下の二種である。

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) 。

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)。

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

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。

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

miR-122-5p は KARS を介し胆管癌細胞の増殖を抑制している可能性がある。今後 ARS ネットワークにおける miRNA の発現の関連と細胞増殖を評価項目にした、抗腫瘍効果を明らかにする。ARS ネットワークの血中での検出系の探索を試みる。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 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癌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

H. 知的財産権の出願、登録状況

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

労災疾病臨床研究事業費補助金 分担研報告書

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)

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 17 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。このため、対象者が勤務した印刷会社における洗浄剤の化学成分と使用量、印刷機の台数、作業場の換気量に関する情報を当該会社および厚生労働省から収集し、それらの情報を基にして曝露濃度を推定した。

全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。

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17人について、使用した化学物質の種類を特定するとともに、各種の情報を基にして曝露濃度を推定することを目指した。なお、本研究は大阪
市立大学大学院医学研究科の倫理委員会

の承認を得て行った。

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

対象者は大阪市内のオフセット校正印

刷会社の従業員 17 人（元従業員を含む）であり、いずれも 2013 年に厚生労働省により職業性胆管がんと認定されている。診断年齢は 20 歳代が 2 人、30 歳代が 11 人、40 歳代が 4 人である。

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、印刷機の台数、作業場の換気量に関する情報を、同社および厚生労働省から収集した。

3. 曝露濃度の推定

1) 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、同社での各年の使用量（購入量の記録から算出、ただし記録がない期間はその後の 3 年間の平均を使用）から曝露濃度を推定した。

2) 作業場 2, 3, 4

作業場 2, 3 および 4 では、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下記の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。

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 μL あるいは 100 μL 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 μL 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°C、80°C および 180°C 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. 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。印刷作業者では、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。

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。

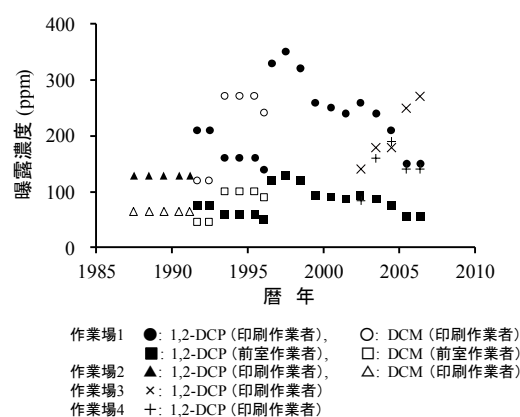


図1. 1,2-ジクロロプロパンおよびジクロロメタンの推定曝露濃度

表1. 胆管がん患者の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

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 4.6~1200µg/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

作業場 1 については、再現実験の結果を基に、実際の使用量のデータを用いて曝露濃度を推定しており、適切に推定できていると考えられる。一方、作業場 2、3、4 については、数理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。

Yamadaらは、複数の胆管がん患者が発生した3つの小規模印刷会社における患者7人の曝露状況を推定し、1,2-DCPの曝露期間および曝露濃度はそれぞれ7-17年および62-240 ppmであったと報告している(J Occup Health 2014; 56: 332-338, J Occup Health 2015; 57: 565-571.)。同論文で示されたデータを基に、患者7人の累積曝露量を算出すると、690-2550 ppm-年となる。本報告では、患者17人の1,2-DCP累積曝露量は646-3409 ppm-年であり、Yamadaらの調査対象者と同程度である。

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である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) 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）

研究協力者 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、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、昨年度報告した。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。DCM、1,2-DCP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。

D. 考察

DCM および 1,2-DCP 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)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし