

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 13 日現在

機関番号：24402  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2014～2016  
課題番号：26462048  
研究課題名(和文) 臨床病理学および分子生物学的検討による肝内胆管癌化学発癌メカニズムの解明

研究課題名(英文) Clinicopathological and molecular biological analysis of carcinogenesis induced by chemicals

研究代表者  
久保 正二 (Kubo, Shoji)  
大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：80221224  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：職業性胆管癌症例の臨床病理学的検討の結果、比較的若年、 $\gamma$ -GTP高値、限局性肝内胆管拡張像がみられること、浸潤癌以外に前癌病変であるbiliary intraepithelial neoplasia (BillIN) や intraductal neoplasm of the bile duct (IPNB) がみられ、DNA傷害がみられることが判明した。また、浸潤癌や前癌病変部には遺伝子変異が高頻度に見られることが明らかとなった。したがって、職業性胆管癌は、化学物質によりDNA傷害を伴う慢性胆管傷害が広範囲の胆管に惹起され、前癌病変を経て浸潤癌に致す多段階発育を来すと考えられた。

研究成果の概要(英文)：The analysis of occupational cholangiocarcinoma showed that young age, high  $\gamma$ -GTP level, regional dilation of intrahepatic bile duct, the presence of biliary intraepithelial neoplasia (BillIN) and intraductal neoplasm of the bile duct (IPNB) as well as invasive cholangiocarcinoma are characteristics of the carcinoma. The molecular biological studies showed that such lesions had hypermutation of DNA. These results indicate that some chemicals induced DNA injury, inducing premalignant lesions such as BillIN and IPNB, eventually developing invasive cholangiocarcinoma in the occupational cholangiocarcinoma.

研究分野：外科学

キーワード：職業性胆管癌 1,2-ジクロロプロパン ジクロロメタン 肝内胆管癌 前癌病変 遺伝子異常 多段階発育

### 1. 研究開始当初の背景

印刷事業場 S 社の現あるいは元従業員に胆管癌が多発していることが報告された。本事例では従業員が dichloromethane (DCM) や 1,2-dichloropropane (DCP) に高濃度、長時間曝露されていた。その詳細な胆管癌発癌メカニズムの解明が必要である。

### 2. 研究の目的

本研究は職業性胆管癌にみられるような胆管癌化学発癌メカニズムを臨床病理学および分子生物学的検討により解明することを目的とするとともに、通常の肝内胆管癌の発癌メカニズム解明への展開を目指す。

### 3. 研究の方法

職業性胆管癌症例の臨床経過、臨床的特徴、病理学および分子生物学的検討や通常型胆管癌との比較から、肝内胆管癌化学発癌のメカニズムを解明し、その診断法や治療法選択法などの臨床的展開を目指す。

### 4. 研究成果

#### (1) 臨床検査値、画像所見および臨床診断

職業性胆管癌症例の多くは診断時、 $\gamma$ -GTP、AST、ALT 値が上昇していた。また、胆管癌発見の数年前よりそれらが上昇していた。血清 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）は 12 例中 12 例で上昇していた。

画像診断上、肝内腫瘤像、胆管内腫瘤像、腫瘍による胆管閉塞に加えて、原発性硬化性胆管炎 (PSC) 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が特徴的であった。腹部超音波検査上、異常所見が確認された。FDG-PET 像では主腫瘍やリンパ節転移では集積像がみられたが、前癌病変は描出されなかった。職業性胆管癌のスクリーニングには自覚症状や肝機能検査値や腫瘍マーカーなどの血液検査や腹部超音波検査が有用で、CT、MRI などの画像診断検査で異常所見がみられる場合、生検による確定診

断や PET による進行度診断が必要となる。

#### (2) 病理学的所見

職業性胆管癌は総胆管から肝内第 3 次分枝までの比較的大型胆管が原発部位であった。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。全例で慢性胆管傷害像や Biliary intraepithelial neoplasia (BilIN) 病変や Intraductal papillary neoplasm of the bile duct (IPNB) 病変がみられた。特に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た。さらに、正常胆管、慢性胆管傷害、BilIN、IPNB および浸潤癌が  $\gamma$  H2AX 陽性であり、広範囲の胆管に DNA 傷害がみられた。癌化を示す S100P は BilIN、IPNB と浸潤癌で陽性であった。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。職業性胆管癌では緻密な胆管周囲の線維化がみられ、胆管周囲には  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) 陽性細胞が多く分布していた。職業性胆管癌では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た。

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ところ、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。

#### (3) 治療成績

職業性胆管癌切除例では術後合併症が高頻度に発症し、慢性胆管傷害が影響している

と考えられた。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るが、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。

#### (4) 分子生物学的検討

DNA methyltransferase (DNMT) 3A および 3B の発現は胆管周囲付属腺、BiIN および浸潤癌で亢進していた。大型胆管上皮においても DNMT3A の発現が亢進していた。職業性胆管癌では DNA メチル化の亢進と蓄積がみられ、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。

職業性胆管癌の癌部、前癌病変部および胆管の DNA を抽出し、Comprehensive Cancer Panel による遺伝子変異解析を行った結果、通常の胆管癌に比較し、職業性胆管癌では前癌病変および癌部において塩基置換数が多くみられた。これらの結果から、職業性胆管癌では化学物質などによる DNA 損傷が発癌要因であることが推測された。

#### (5) 職業性胆管癌と通常型胆管癌との比較

職業性胆管癌と通常型肝内胆管癌を比較した結果、通常型胆管癌に比較し、職業性胆管癌では若年で、 $\gamma$ -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。職業性肝内胆管癌において胆管内発育型が多く、BiIN、IPNB および慢性胆管傷害像が多くみられた。

#### (6) 胆管癌の危険因子、腫瘍マーカー

肝内胆管癌症例では非アルコール性脂肪性肝炎が肝内胆管癌のリスク因子であった。生活習慣病を有する症例では、年 2 回以上の  $\gamma$ -GTP 値や CA19-9 値測定と画像診断が早期の肝内胆管癌発見に有用であった。

職業性胆管癌症例では血清 DUPAN-2 の成績が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った。

#### 5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計 15 件)

1. 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, *Jpn J Radiology*, 査読有, 35, 2017, 233-241 DOI:10.1007/s11604-017-0626-y
2. 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, *Pathol International*, 査読有, 67, 2017, 163-170 DOI : 10.1111/pin.12511
3. 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, *J Hepatobiliary Pancreat Sci*, 査読有, 23, 2016, 556-564 DOI : 10.1002/jhbp.373
4. 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*, 査読有, 23,

2016、389-396 DOI : 10.1002/jhbp.353

5. 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、 査読有 Surg Today 2016;46:705-712 DOI : 10.1007/s00595-015-1229-9

6. 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、 査読有、 23、 2016、 92-101 DOI : 10.1002/jhbp.305

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、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、査読無、71、2015、877-885

[http://mol.medicalonline.jp/library/journal/download?GoodsID=ao1ktsud/2015/007105/013&name=0877-0885j&UserID=160.193.213.77&base=jamas\\_pdf](http://mol.medicalonline.jp/library/journal/download?GoodsID=ao1ktsud/2015/007105/013&name=0877-0885j&UserID=160.193.213.77&base=jamas_pdf)

8. 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、査読有、28、2015、139-146

9. 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、査読無、64、2016、1-5 <http://www.jsomt.jp/journal/pdf/064010001.pdf>

10. 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、査読無、69、2014、1079-1085 [http://mol.medicalonline.jp/library/journal/download?GoodsID=ao1ktsud/2014/006906/038&name=1079-1085j&UserID=160.193.213.77&base=jamas\\_pdf11](http://mol.medicalonline.jp/library/journal/download?GoodsID=ao1ktsud/2014/006906/038&name=1079-1085j&UserID=160.193.213.77&base=jamas_pdf11). 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, Kobarai T, Hisano T, Saiura A, Numao H, Toda M, Kuwae Y, Nakanuma Y, Endo G、 Characteristics of printing company workers newly diagnosed with occupational cholangiocarcinoma、 J Hepatobiliary Pancreat Sci、 査読有、 21、 2014、 809-817 DOI : 10.1002/jhbp.137

12. 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 Exper Patho、 査読有、 7、 2014、 4745-4754 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4152035/>

13. 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, Haya shi T, Endo G、 Case-series of 17 patient s with cholangiocarcinoma among young adult workers of a printing company in Japan、 J Hepatobiliary Pancreat Sci、 査 読有、 21、 2014、 479-488 DOI : 10.1002/j hbp.86

14. 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、査読無、30、2014、1-4

15. 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、査読有、111、2014、500-509 [https://www.jstage.jst.go.jp/article/nisshoshi/111/3/111\\_500/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/nisshoshi/111/3/111_500/_pdf)

〔学会発表〕(計 18 件)

1.. 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、2016 年 11 月 4 日、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

2. 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、2016 年 7 月 14 日、アスティ徳島(徳島県徳島市)

3. 久保正二、職業性胆管癌の臨床と対策、第 52 回日本肝臓研究会 2016 年 7 月 2 日 虎の門フォーラム(東京)

4. 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 年 7 月 9 日、Crown Plaza (China

HongKong)

5. 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、2015 年 10 月 10 日、グランドプリンスホテル新高輪(東京)

6. 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、2015 年 7 月 16 日、アクトシティ浜松(静岡県浜松市)

7. 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、2015 年 4 月 8 日、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

8. 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 年 3 月 27 日、和歌山県立医科大学(和歌山県和歌山市)

9. 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 年 3 月 27、和歌山県立医科大学(和歌山県和歌山市)

10. 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、2014

年 11 月 16 日、神戸国際会議場（兵庫県神戸市）

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、2014 年 9 月 26、グランドプリンスホテル新高輪（東京都）

12. 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、2014 年 7 月 18 日、郡山総合体育館（福島県郡山市）

13. 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、2014 年 7 月 17 日、郡山総合体育館（福島県郡山市）

14. 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、2014 年 6 月 12 日、和歌山県民文化会館（和歌山県和歌山市）

15. 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 年 6 月 6 日、国立京都国際会館（京都府京都市）

16. 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、2014 年 4 月 5 日、国立京都国際会館（京都府京都市）

17. 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、2014 年 4 月 4 日、国立京都国際会館（京都府京都市）

18. 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 年 8 月 8 日、Youngnam University (Youngnam, Korea)

〔図書〕（計 1 件）

1. 久保正二 他. 文光堂、Hepatology Practice vol.5 肝癌の診療を極める：基本から最前線まで、文光堂、2014、328 (32-33)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

久保 正二 (KUBO, Shoji)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：80221224

### (2) 研究分担者

竹村 茂一 (TAKEMURA, Shigekazu)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：00322363

中沼安二 (NAKANUMA, Yasuni)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：10115256

西尾和人 (NISHIO, Kazuto)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号：10208134