

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 30 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591303

研究課題名（和文） ハンセン病 70 年の医学的検証：らい菌、結核菌、C 型肝炎ウイルスの遺伝子解析

研究課題名（英文） Medical verification of Hansen disease in the past 70 years: genetic analysis of Leprosy, Tuberculosis and Hepatitis C virus

研究代表者

寺本 英已（TERAMOTO HIDEMI）

藤田保健衛生大学・医学部・研究生

研究者番号：80304236

研究成果の概要（和文）：

1940 年から 1999 年までの間に呂久光明園で行われた 996 例の病理解剖データを検討すると、肝硬変と肝癌の急激な増加を 1960 年から 1999 年にかけて認めた。そこで、ホルマリン固定肝硬変組織から RNA を抽出して nested PCR にかけて genotype を調べた。Genotype は 1b 85.7%、2a 14.3%であった。1b であった 30 名のサンプルからさらに NS5B 領域を増幅を行い、増幅できた 12 症例について塩基配列をしらべて樹形図を作成した。この結果、このハンセン病療養所では少なくとも 3 つの HCV 株が存在しており、70 年前から院内感染したことが強く示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The review of the the pathological data of a total of 996 patients autopsied in Oku-Komyo-En (1940-1999) found that the dramatic increase in the incidence of cirrhosis of the liver and HCC (1960-1999). In patients with cirrhosis of the liver, total RNA was examined by nested RT-PCR. The HCV genotypes were 85.7% for 1b (30/35), and 14.3% for 2a (5/35) in patients with leprosy. Tissues of 30 patients with leprosy (HCV genotype 1b) were amplified in 12 of the samples (NS5B region). Recombinant clones were then sequenced and the phylogenetic analysis of NS5 sequences was carried out. Our data suggest that at least three strains of HCV existed in this sanatorium. This observation strongly suggests the horizontal transmission of HCV in the past 70 years in this leprosy sanatorium.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	560,000	168,000	728,000
年度			
年度			
総計	2,560,000	768,000	3,328,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 感染症内科学

キーワード：ハンセン病 C型肝炎 結核

1. 研究開始当初の背景

現在、全国 13 カ所の国立ハンセン病療養所と 2 カ所の私立ハンセン療養所に計 2,717 名 (2008 年 5 月 1 日現在) が入所している。これらのハンセン病療養所の歴史は、1907 年 (明治 40 年) に“癩予防ニ関スル件”がはじめて制定されたことに由来する。1931 年第 1 回目の改正が行われ (癩予防法)、この時、隔離の対象がそれまで浮浪者であったのを、自宅療養している人にも広げることになった。この頃から国立療養所が次々に作られるようになり、一部の私立療養所を除いて、国が一括して管理する体制が作られ、患者の収容が一層強化されることになった (強制隔離政策)。邑久光明園は 1938 年 (昭和 13 年) に開園し、1941 年国立移管となった。その後、1953 年 (昭和 28 年) に、癩予防法から“らい予防法”に改定された。“らい予防法”は 1996 年 (平成 8 年) 4 月 1 日に施行された“らい予防法の廃止に関する法律”によってようやく廃止され、一般の病院や診療所で保険診療できるようになった。ハンセン病自体はほぼ全員治癒しているが、平均年齢 78.2 歳 (2006 年 5 月 1 日現在) と高齢化しており、80 歳以上の高齢者が全体の 38%、70 歳以上が 80% を占めている。療養所という閉鎖空間の中で暮らしてきたため、十分な教育も社会経験も有しておらず、病気の後遺症による障害、さらにかつて強制的に行われた断種手術、墮胎手術のために子供がいない元患者が多いことから、介護を必要として療養所に入所しているのが実情である。こうしたハンセン病患者の苦難の歴史については、入所者の経験談等をもとに、人権侵害について多くの著書や研究がある。しかしながら、ハンセン病を隔離し治療を行うことで療養所のなかで起こっていたであろう、院内感染をはじめとした医学的検討はまだまだ十分に行われていない。

たとえば、戦中から戦直後 (昭和 20 年代) の死因のトップは結核である。療養所という閉鎖空間での結核感染の流行は院内感染 (空気感染) であった可能性が高いが、十分な証明はなされていない。この時代には有効な抗結核剤がなく、医学知識のない患者が患者をケアするというシステムであったことも結核が蔓延した理由の一つと考えられる。そこで、結核菌の遺伝子型を検討することによって、院内感染であったことを科学的に証明する。

また、昭和 40 年代以降、C 型肝炎ウイルスによるであろう肝硬変症の罹患率が高い。独立行政法人福祉医療機構による“国立ハンセン病療養所における肝炎ウイルス罹患者の

実態調査結果概要”によると、一般社会での C 型肝炎有病率 0.7% に比較して、ハンセン病療養所では 24% と実に 4 人に 1 人がキャリアである (国立療養所邑久光明園では 42.4%)。おそらく、注射針の共有による院内感染 (血液感染) であろうことが推測されるが、その証明はない。また、戦中、戦直後は、結核の死亡率が高かったため、C 型肝炎の感染が隠蔽された可能性がある。戦前は大風子油、戦後はプロミンの注射の際に感染が生じたと思定されるが、院内感染があったのかどうか、HCV (Hepatitis C virus) の遺伝子型の検討は全くされていない。本研究ではこの点を証明する。

この強制隔離の原因となつたらい菌は結核菌に近い抗酸菌だが、感染力は弱い。しかしながら、*Mycobacterium leprae* による院内重複感染がこの閉鎖集団で生じていた可能性は完全には否定できない。同時に、国立療養所邑久光明園の入所者は、大阪、京都、兵庫、奈良、和歌山、三重、滋賀、岐阜、福井、石川、富山、鳥取の 2 府 10 県から集められているが、これらの地域でどの程度、遺伝子型に違いがあるのかどうか、いまだ検討されていない。そこで、らい菌の遺伝子型について検討する。

2. 研究の目的

現在、国立療養所邑久光明園には 1938～2007 年 (70 年間) の入所者約 2,000 名のカルテ、エックス線画像、800 例を超える剖検病理検体が保存されているが、早晚処分される運命にあると思われる。これらの資料を整理して computer に保存を行う。それをもとに、この園での死因、死亡者数および死亡率を検討して、その時代の日本の統計と比較検討を行う。

(1) C 型肝炎ウイルス (Hepatitis C virus) 院内感染の遺伝子解析

国立療養所邑久光明園入所中で HCV-RNA 陽性者 (約 40 名) の血清を集めて、HCV 遺伝子型解析 (genotyping) を行う。同一の遺伝子型であることが予想されるため、対照として絨仁病院 (名古屋市) の HCV-RNA 陽性患者の血清 (30 名) を集めて、ジェノタイプおよび系統学的解析 (phylogenetic analysis) を行う。できれば、その次の段階として、全国 13 カ所の国立ハンセン病療養所の HCV-RNA 陽性者の血清を集めて遺伝子解析を行いたい。さらに、国立療養所邑久光明園でホルマリン固定されていた肝臓検体 (免疫染色での HCV 抗原陽性例：慢性肝炎、肝硬変を含む)

に対して HCV 遺伝子解析を行い、HCV の院内感染の実態を検討する。

(2) 結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 院内感染の遺伝子解析

国立療養所 邑久光明園で保管されている結核死亡患者の肺サンプル (ホルマリン固定パラフィン切片) より、結核菌遺伝子解析を行ったのちに、系統学的解析 (phylogenetic analysis) を行う (約 100 例が目標)。

(3) らい菌 (*Mycobacterium leprae*) の地域集積性に関する遺伝子解析

国立療養所 邑久光明園で保管されているホルマリン固定サンプルのうち、ハンセン病病変のある臓器 (末梢神経、咽喉頭、肝など) よりらい菌遺伝子解析を行ったのち、系統学的解析を行う。カルテを参考にして、入所者の元居住地ごとに DNA 変異があるのかどうかを検討する。

3. 研究の方法

(1) HCV の遺伝子解析 (genotyping) と系統学的解析 (phylogenetic analysis)
国立療養所 邑久光明園入所中の HCV-RNA 陽性者 40 名および 紘仁病院入院患者の HCV-RNA 陽性者 30 名の血清を採取し、Okamoto らの方法 (Typing hepatitis C virus by polymerase chain reaction with type-specific primers: application to clinical surveys and tracing infectious sources. J Gen Virology 73, 673-679) でウイルス型 (ジェノタイプ) および Hmaied F らの方法 (Determining the source of nosocomial transmission in hemodialysis units in Tunisia by sequencing NS5B and E1 sequence of HCV. J Med Virol 2007, 79(8), 1082-1088) に準じて、HCV ゲノムの Core 部分および NS5B 部分を RT-PCR で増幅したのちに解析する。

(2) 結核菌の遺伝子解析および系統学的解析

国立療養所 邑久光明園の剖検例で結核症と病理診断されたパラフィン包埋組織 (主として肺病変: 目標症例数 50) から DNA を抽出したのち、西森らの方法 (VNTR (Variable Numbers of Tandem Repeats) 型別による結核菌群及び鳥型結核菌の分子疫学的解析マニュアル, 動衛研研究報告 109

号, 25-32, 2003) によって MIRU-VNTR (mycobacterial interspersed repetitive unit-variable number tandem repeat analysis) を行い、系統学的に解析を行う。

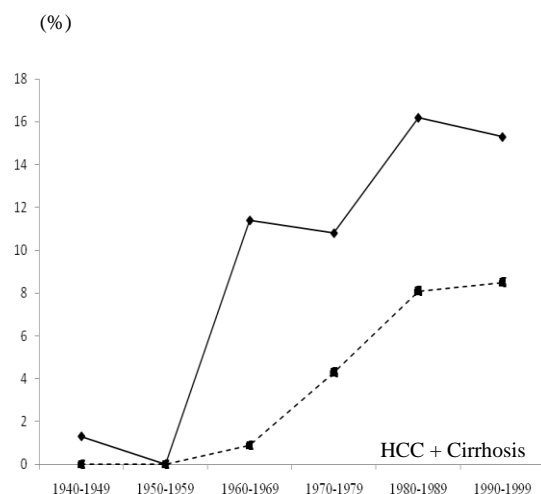
(3) らい菌の遺伝子解析および系統学的解析

国立療養所 邑久光明園で剖検されたハンセン病患者に対して、府県別に 5 名ずつ (合計 60 名以上)、らい病変のある末梢神経、咽喉頭、肝臓等のパラフィン包埋組織より DNA を抽出したのち、Truman R らの方法 (Genotypic variation and stability of four variable-number tandem repeats and their suitability for discriminating strains of *Mycobacterium leprae*. J Clin Microbiol 2004, 2558-2565) によって系統学的に解析する。

4. 研究成果

(1) HCV の遺伝子解析 (genotyping) と系統学的解析 (phylogenetic analysis)

厚生労働省が全国 13 ヲ所の国立ハンセン病療養所の入所者を対象にした C 型肝炎ウイルス検査を行い、入所者全体の 11.7% が感染していることが報告されている (2002 年)。感染率が高い療養所 (栗生楽泉園 56.90%) から低い療養所 (沖縄愛楽園 2.40%) までであったが、この事実は C 型肝炎の院内感染を示唆している。血清は保存されていないため、今回、剖検病理サンプルを使用して C 型肝炎の感染調査をおこなった。国立ハンセン病療養所の剖検病理標本の保管状況は 1,398 例であり、その中で国立療養所 邑久光明園には 820 例あり、全国の約 60% にあたることから、邑久光明園を対象とした。

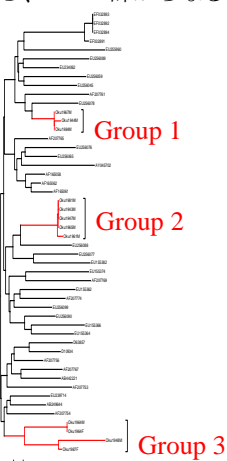


入所者のカルテを検索すると 1940 年から 1999 年の間に 996 名が剖検がされており、肝硬変で死亡した入所者は 1940-1949 年 604 名中 8 名(1.3%)、1950-1959 年 62 名中 0 名(0%)、1960-1969 年 114 名中 12 名(10.5%)、1970-1979 年 46 名中 3 名(6.5%)、1980-1989 年 11 名中 9 名(8.1%)、1990-1999 年 59 名中 4 名(6.8%)であった。このことは、1940 年台に院内感染により C 型肝炎に感染した入所者が 20 年の時を経て肝硬変に移行したことが考えられた。ホルマリン固定肝硬変患者の肝臓 53 名から DNA を抽出したのち、HCV 遺伝子解析 (genotyping) をおこなったところ 35 名で HCV RNA を検出できた。対照として絨仁病院 (名古屋市) の HCV-RNA 陽性患者の血清 (30 名) を集めて、HCV 遺伝子型解析を行ったところ、1b 2a 2b がそれぞれ 63.3% 33.3% 3.4%であったのに比較して、光明園では 1b、2a、2b が 85.7%、24.3%、0% と分布が異なっており、院内感染であった可能性を示した。

No. of isolates of HCV genotypes

genotyping				Total
1940-1949	6	1	0	7
1950-1959	0	0	0	0
1960-1969	7	1	0	8
1970-1979	4	0	0	4
1980-1989	8	3	0	11
1990-1999	5	0	0	5
Total	30	5	0	35

ホルマリン固定肝硬変患者の肝臓 53 名から DNA を抽出したのち、HCV 遺伝子解析 (genotyping) をおこなったところ 35 名で HCV RNA を検出できた。この中で genotype 1b の 30 名について NS5B 領域を RT-PCR したところ 12 例で増幅でき、シーケンスを行った。塩基配列はすでに Genbank に報告されている genotype 1b 例の NS5B 領域の塩基配列とともに MEGA5 soft を用いて樹形図を作成したところ、3つの群からなることがわかった。



この事実は閉鎖された療養所であり、針やメスを研いだりして再利用していたことを考慮すると、1940年代に療養所に入所した患者が持ち込んだ HCV が70年間療養所内で蔓延してきた可能性を示すと考えられた。

- (2) 結核菌の遺伝子解析および系統学的解析
- (3) らい菌の遺伝子解析および系統学的解析

現在解析中である。陽性コントロールでは解析できるが、ホルマリン固定組織からの DNA 遺伝子増幅に難点があり検討中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Teramoto H, Shiogama K, Mizutani Y, Inada K, Kamahora T, Makino M, Tsutsumi Y. Molecular epidemiology of a hepatitis C virus outbreak in a leprosy sanatorium in Japan. J Clin Microbio. 2011, 49(9): 3358-3360.
- ② Shiogama K, Teramoto H, Morita Y, Mizutani Y, Shimomura R, Inada K, Kamahora T, Makino M, Tsutsumi Y. Hepatitis C virus infection in a Japanese leprosy sanatorium for the past 67 years. J Med Virol. 2010, 82(4): 556-561.

[学会発表] (計 2 件)

- ① 第 99 回日本病理学会総会 2010 年 4 月 28 日 (東京) 長期ホルマリン固定剖検肝標本を用いた in situ hybridization 法による C 型肝炎ウイルスの組織化学的証明 塩竈和也 寺本英巳 水谷泰嘉 稲田健一 塚本徹哉 畑野研太郎 牧野正直 堤寛
- ② 第 98 回日本病理学会総会 2009 年 5 月 2 日 (京都) 長期ホルマリン固定ハンセン病剖検肝における C 型肝炎ウイルスの証明 塩竈和也 寺本英巳 水谷泰嘉 稲田健一 牧野正直 堤寛

[その他]

ホームページ等
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺本 英已 (TERAMOTO HIDEMI)
藤田保健衛生大学医学部 研究生
研究者番号：80304236

(2) 研究分担者

堤 寛 (TSUTSUMI YUTAKA)
藤田保健衛生大学医学部 教授
研究者番号：80138643
牧野 正直 (MAKINO MASANAO)
藤田保健衛生大学医学部 客員教授
研究者番号：00116097
釜洞 俊雄 (KAMAHORA TOSHIO)
鳥取大学医学部 准教授
研究者番号：30144520
塩竈 和也 (SHIOGAMA KAZUYA)
藤田保健衛生大学医学部 助教
研究者番号：10387699

(3) 連携研究者

該当者なし