

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2014～2017

課題番号：26305013

研究課題名(和文)南アジアにおけるアメーバ赤痢の免疫学的コホート研究

研究課題名(英文)Immunological cohort study on amebiasis in South Asia

研究代表者

濱野 真二郎 (HAMANO, Shinjiro)

長崎大学・熱帯医学研究所・教授

研究者番号：70294915

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：各種下痢起因性病原体の感染状況と下痢エピソードとの相関を詳細に解析したところ、赤痢アメーバ *E. histolytica* ならびに *E. moshkovskii* の単独感染と下痢エピソードとの相関が見出された。また、子供たちの免疫応答から得られた知見に関してモデル動物を用いて検証したところ、赤痢アメーバの腸管感染が遷延する動物モデルではIL-17Aの発現亢進が認められた。IL-17A遺伝子欠損マウスを用いた研究により、IL-17Aは赤痢アメーバ腸管感染の慢性期において、IFN-g/IL-4比を減じつつ、赤痢アメーバの持続感染に寄与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We analyzed associations between infection with each pathogen and diarrheal episodes and found both *E. histolytica* and *E. moshkovskii* infections were associated with diarrheal episodes. Based on the immunological finding observed in children, we clarified the role of IL-17A during *E. histolytica* infection. In an animal model with chronic amebic colitis, augmented IL-17A expression was observed. In some of IL-17A deficient mice, ameba was expelled with increased IFN-g/IL-4 ratio, indicating IL-17A contributes to chronic infection with *E. histolytica*.

研究分野：寄生虫学

キーワード：アメーバ赤痢 南アジア バングラデシュ コホート研究 下痢 混合感染 病原性 感染防御機構

## 1. 研究開始当初の背景

世界の5歳未満児の死亡数は690万人であり、その20%は下痢性疾患に因る(UNICEF、2011年、世界子供白書)。アメーバ赤痢は発展途上国における小児下痢症の主要原因であり、世界中の感染者人口はおよそ5000万人、同症で毎年10万人の命が失われている。効果的な対策を講ずるには、赤痢アメーバの病原性に加えて同原虫に対する感染防御機構の理解が不可欠である。

## 2. 研究の目的

我々はアメーバ赤痢が蔓延している地域、特にバングラデシュにおいて、国際的な共同研究を展開し、(1)感染の成立からアメーバ赤痢の発症・重症化までを規定する宿主因子ならびに(2)病原体の病原性因子の同定を目的とする。また研究代表者らが尽力して確立したアメーバ赤痢の動物モデルを用いて、赤痢アメーバに対する感染防御機構ならびに同原虫の病原性を解明する。

## 3. 研究の方法

本研究の土台としてバングラデシュにおいてバージニア大学のPetri教授らを中心に2-5歳の子供たち400人を対象に始められた13年に及ぶコホート研究がある。本研究では4年前から新たに設定した500人からなる子供を対象に、赤痢アメーバ症の免疫学的コホート研究を遂行すると共に、フィールドからの知見を動物モデルにおいて検証する。

## 4. 研究成果

本研究では子供たちから定期的に回収された健常便ならびに下痢便よりDNAを抽出し、下痢の原因となる病原性アメーバ *E. histolytica*、*E. moshkovskii* ならびに非病原性アメーバ *E. dispar* の検出を試みた。その上で、各アメーバの陽性率と遺伝子多型を調

べ、さらにタックマンアレイカードを用いて下痢起因性の各種病原体(蠕虫、原虫、細菌、ウイルスまで多岐に渡る)の同時一括検出を試みたところ、赤痢菌、ロタウイルス、アデノウイルス、クリプトスポリジウムなど下痢を引き起こしうる各種病原体の混合感染が明確となった。各種病原体の感染状況と下痢エピソードとの相関を詳細に解析したところ、*E. histolytica* ならびに *E. moshkovskii* の単独感染と下痢エピソードとの相関が見出された。

一方、赤痢アメーバの腸管定着を規定する因子を同定する目的で、腸管定着性が亢進した赤痢アメーバと標準株を用いてRNAシーケンスを行い、発現が有意に変化している遺伝子を同定した。それら分子の機能を解明する研究を継続している。

子供たちの免疫応答に関する研究を通して赤痢アメーバの慢性感染と相関を示す免疫応答の解明に繋がる糸口が得られた。上記知見に関してモデル動物を用いてその詳細を解明したところ、赤痢アメーバの腸管感染が遷延する動物モデルではインターロイキン(IL)-17Aの発現亢進が認められた。ワクチンや腸内細菌フローラの調整などによって予め誘導したIL-17Aは、赤痢アメーバの腸管定着阻止に機能することが明らかとなっているが、感染によって誘導されるIL-17Aが赤痢アメーバ感染に果たす役割は不明である。そこで野生型とIL-17A遺伝子欠損マウスに赤痢アメーバを感染させ、赤痢アメーバ感染におけるIL-17Aの役割を解明した。感染4週目では、IL-17A遺伝子欠損マウスにおいて顕著な虫垂内アメーバ数の減少と感染率の低下が認められた。このときIL-17A遺伝子欠損マウスの虫垂では、感染野生型マウスと比べ有意にTh1サイトカインであるIFN-g、IL-12p35遺伝子の発現が増加し、Th2サイトカインであるIL-4や、制御性サイトカインであるIL-10遺伝子の発現が減少していた。本研究により、IL-17Aは赤痢ア

メーバ感染初期の赤痢アメーバの定着および病態形成には影響しないことが明らかとなった。一方、IL-17Aは赤痢アメーバ腸管感染の慢性期において、IFN-g/IL-4比を減じつつ、赤痢アメーバの持続感染に寄与することが示唆された。

#### 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15件)

- 1) Deloer, S., Nakamura, R., Kikuchi, M., Moriyasu, T., Kalenda, Y.D.J., Mohammed, E.S., Senba, M., Iwakura, Y., Yoshida, H., Hamano, S.: IL-17A contributes to reducing IFN- /IL-4 ratio and persistence of *Entamoeba histolytica* during intestinal amebiasis. **Parasitol. Int.** 2017; 66(6): 817-823. 査読有  
doi: 10.1016/j.parint.2017.09.011.
- 2) Shimokawa, C., Senba, M., Kobayashi, S., Kikuchi, M., Obi, S., Ochia, A., Hamano, S., Hisaeda, H.: Intestinal inflammation-mediated clearance of amebic parasites is dependent on IFN- . **J. Immunol.** 2017; 200(3): 1101-1109. 査読有  
doi: 10.4049/jimmunol.1700806.
- 3) 田中美緒・濱野真二郎: アメーバ赤痢、「特集 寄生虫症( )」、**医学と薬学**、2017、74(11): 1399-1405. 査読なし
- 4) 安達圭司・濱野真二郎: One Healthの視点からみた寄生虫感染症、「特集 One Healthの視点からみた感染症の現状と対策」、**最新医学**、2017、70(11)、2407-2414. 査読なし
- 5) Mi-ichi, F., Yoshida, H., Hamano, S.: *Entamoeba* encystation: new targets to prevent the transmission of amebiasis, **PLoS Pathogens**, 2016, 12(10): e1005845. 査読有  
doi: 10.1371/journal.ppat.1005845.
- 6) Deloer, S., Nakamura, R., Mi-Ichi, F., Adachi, K., Kobayashi, S., Hamano, S.: Mouse models of amoebiasis and culture methods of amoeba. **Parasitol Int.** 2016; 65: 520-525. 査読有  
doi: 10.1016/j.parint.2016.03.012.
- 7) Ghosh, P., Bhaskar, K.R., Hossain, F., Khan, M.A., Vallur, A.C., Duthie, M.S., Hamano, S., Salam, M.A., Huda, M.M., Khan, M.G., Coler, R.N., Reed, S.G., Mondal, D.: Evaluation of diagnostic performance of rK28 ELISA using urine for diagnosis of visceral leishmaniasis. **Parasit Vectors.** 2016; 9(1): 383. 査読有  
doi: 10.1186/s13071-016-1667-2.
- 8) 渡辺恒二・濱野真二郎: 「特集 消化管感染症発症のメカニズム」アメーバ赤痢、**化学療法領域**、2016; 32(9): 1696-1705. 査読なし
- 9) 森保妙子・中村梨沙・濱野真二郎: 「連載 グローバル感染症最前線 ~NTDsの先へ」感染症の現状 ~3大感染症から新興・再興感染症、NTDs、**医学の歩み**、2016; 258(3): 252-257. 査読なし
- 10) 中村梨沙・見市文香・Sharmina Deloer・濱野真二郎: 「特集 寄生虫感染と生体防御・免疫系」アメーバ赤痢、**臨床免疫・アレルギー科**、2016; 65(5): 412-418. 査読なし
- 11) 原田倫世・中村梨沙・濱野真二郎: アメーバ赤痢やクリプトスポリジウム症の現状と最新の知見: 通常の抗生物質が無効な原虫性下痢症、**最新医学** 「特集 感染性胃腸炎」、2015、70(11)、2407-2414. 査読なし
- 12) Mondal, D., Hasnain, M.G., Hossain, M.S., Ghosh, D., Ghosh, P., Hossain, H., Baker, J., Nath, R., Haque, R., Matlashewski, G., Hamano, S.: Study on the safety and efficacy of miltefosine for the treatment of children and adolescents with post-kala-azar dermal leishmaniasis in Bangladesh, and an association of serum vitamin E and exposure to arsenic with post-kala-azar dermal leishmaniasis: an open clinical trial and case-control study protocol. **BMJ Open.** 2016; 6(5): e010050. 査読有  
doi: 10.1136/bmjopen-2015-010050.

〔学会発表〕(計 23 件)

- 1) Risa Nakamura, Sharmina Deloer, Masachika Senba, Mihoko Kikuchi, Shigeo Koyasu, Kazuyo Moro, Shinjiro Hamano: Group 2 innate lymphoid cells exacerbate severe amebic liver abscess by IFN-g independent manner in mice. 第 87 回日本寄生虫学会大会, 2018 年 3 月 16~18 日, 国立国際医療研究センター (国内学会)
- 2) Risa Nakamura, Sharmina Deloer, Masachika Senba, Mihoko Kikuchi, Shigeo Koyasu, Kazuyo Moro, Shinjiro Hamano: Group 2 innate lymphoid cells exacerbate severe amebic liver abscess by IFN-g independent manner in mice, 第 11 回寄生虫感染免疫研究会, 2018 年 2 月 22~23 日, 杏林大学三鷹キャンパス 大学院講堂 (国内学会)
- 3) Risa Nakamura, Sharmina Deloer, Kazuyo Moro, Shinjiro Hamano: Type 2 innate lymphoid cells exacerbate severe amebic liver abscess in mice. 第 46 回日本免疫学会学術集会, 2017 年 12 月 12~14 日, 仙台国際センター (国内学会)
- 4) Sharmina Deloer, Risa Nakamura, Mihoko Kikuchi, Taeko Moriyasu, Yombo Dan Justin Kalenda, Eman Sayed Mohammed, Masachika Senba, Yoichiro Iwakura, Hiroki Yoshida, Shinjiro Hamano: IL-17A contributes to the decrease of IFN- $\gamma$ /IL-4 ratio and the persistence of Entamoeba histolytica during intestinal amebiasis. The 5th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society, 2017 年 10 月 29 日~11 月 2 日, ISHIKAWA ONGAKUDO, ANA CROWNE PLAZA KANAZAWA (国際学会)
- 5) Risa Nakamura, Sharmina Deloer, Kazuyo Moro, Shinjiro Hamano: Type 2 innate lymphoid cells exacerbate severe amebic liver abscess in mice. The 5th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society, 2017 年 10 月 29 日~11 月 2 日, ISHIKAWA ONGAKUDO, ANA CROWNE PLAZA KANAZAWA (国際学会)
- 6) Risa Nakamura, Sharmina Deloer, Kazuyo Moro, Shinjiro Hamano: Type 2 innate lymphoid cells exacerbate severe amebic liver abscess in mice. 第 16 回あわじしま感染症・免疫フォーラム, 2017 年 9 月 4~7 日, 淡路夢舞台国際会議場 (国際学会)
- 7) 中村梨沙, Sharmina Deloer, 茂呂和世, 濱野真二郎: Type 2 innate lymphoid cells exacerbate severe amebic liver abscess in mice. 第 86 回日本寄生虫学会大会, 2017 年 5 月 28~29 日, 北海道大学 学術交流会館 (国内学会)
- 8) Sharmina Deloer, Risa Nakamura, Mihoko Kikuchi, Masachika Senba, Taeko Moriyasu, Eman Sayed Mohammed, Shinjiro Hamano: IL-17A may help to persist of Entamoeba histolytica by keeping antagonistic relationship with Th1 response in animal model of intestinal amebiasis. The 13th Nagasaki-Singapore Medical Symposium / Leading Program International Symposium 2017, 2017 年 5 月 18~19 日, 長崎大学 坂本キャンパス (国際学会)
- 9) Risa Nakamura, Sharmina Deloer, Kazuyo Moro, Shinjiro Hamano: Type 2 innate lymphoid cells exacerbate severe amebic liver abscess in mice. The 13th Nagasaki-Singapore Medical Symposium / Leading Program International Symposium 2017, 2017 年 5 月 18~19 日, 長崎大学 坂本キャンパス (国際学会)
- 10) Risa Nakamura, Sharmina Deloer, Kazuyo Moro, Shinjiro Hamano: Type 2 innate lymphoid cells exacerbate severe amebic liver abscess in mice. 第 10 回寄生虫感染免疫研究会, 2017 年 2 月 9~10 日, 徳島大学 蔵本キャンパス (国内学会)
- 11) Risa Nakamura, Sharmina Deloer, Kazuyo Moro, Shinjiro Hamano: IFN- $\gamma$  controls amebic liver abscess and the function of type 2 innate lymphoid cells in mice intraperitoneally inoculated with Entamoeba histolytica. 第 45 回日本免疫学会学術集会, 2016 年 12 月 5~7 日, 沖縄コンベンションセンター、ラグナガーデンホテル (国内学会)

- 12) Sharmina Deloer, Risa Nakamura, Mihoko Kikuchi, Masachika Senba, Shinjiro Hamano: Intestinal amebiasis : Does IL-17 play any role? ASTMH 65th 2016 Annual Meeting, 2016年11月13~17日, Atlanta, Georgia USA (国際学会)
- 13) Risa Nakamura, Sharmina Deloer, Kazuyo Moro, Shinjiro Hamano: IFN-controls amebic liver abscess and the function of type 2 innate lymphoid cells in mice intraportally inoculated with Entamoeba histolytica. ASTMH 65th 2016 Annual Meeting, 2016年11月13~17日, Atlanta, Georgia USA (国際学会)
- 14) Sharmina Deloer, Risa Nakamura, Mihoko Kikuchi, Masachika Senba, Shinjiro Hamano, Intestinal amebiasis : Does IL-17 play any role? 第15回あわじしま感染症・免疫フォーラム, 2016年9月6~9日, 淡路夢舞台国際会議場(国際学会)
- 15) Sharmina Deloer, Risa Nakamura, Mihoko Kikuchi, Masachika Senba, Shinjiro Hamano: Intestinal amebiasis : Does IL-17 play any role? 第5回感染症若手フォーラム, 2016年9月4~6日, 淡路夢舞台国際会議場(国内学会)
- 16) 中村梨沙, Sharmina Deloer, 見市文香, 下川周子, 千馬正敬, 吉田裕樹, 濱野真二郎: 赤痢アメーバのマウス腸管定着を規定する遺伝子領域の解析, 第85回日本寄生虫学会大会, 2016年3月19~20日, 宮崎市民プラザ(国内学会)
- 17) Sharmina Deloer, Risa Nakamura, Mihoko Kikuchi, Shinjiro Hamano: Roles of IL-17 in amebiasis. 第85回日本寄生虫学会大会, 2016年3月19~20日, 宮崎市民プラザ(国内学会)
- [図書](計14件)
- 1) 濱野真二郎: 第40章 寄生虫と宿主, 第41章 原虫学, 第42章 蠕虫学, **標準微生物学 第13版**, 医学書院, 2018, 519-554. 査読無
- 2) Hamano, S. and William A. Petri Jr.: Chapter 209: Amoebiasis in “**Feigin, Cherry, Demmler, Kaplan: Textbook of Pediatric Infectious Disease, 8th edition**” Elsevier, London, 2018, 2118-2123. 査読無
- 3) 濱野真二郎: 鞭虫症、**今日の治療指針 2018**, 医学書院, 239. 査読無
- 4) Hamano, S. Protozoan Diseases: Amebiasis. In: Quah, S.R. and Cockerham, W.C. (eds.) **The International Encyclopedia of Public Health, 2nd edition**. vol. 6, pp. 64-69. Oxford: Academic, 2017. 査読無
- 5) 濱野真二郎: リーシュマニア症、**今日の治療指針 2017**, 医学書院, 2017, 241-243. 査読無
- 6) 濱野真二郎: 吸虫症、**内科学 第11版**, 朝倉書店, 2016, 354-360. 査読無
- 7) 濱野真二郎: リンパ系系状虫症、イヌ系状虫症、**寄生虫症薬物治療の手引き 改訂9.0版**, 熱帯病治療薬研究班, 2016, 62-63, 68. 査読無
- 8) 濱野真二郎: 鉤虫症、**今日の治療指針 2016**, 医学書院, 2016, 292. 査読無
- 9) Hamano, S.: Protozoan Diseases: Amebiasis, **Reference Module in Biomedical Sciences. International Encyclopedia of Public Health (Second Edition)**, 2017, Pages 64-69. Elsevier. doi.org/10.1016/B978-0-12-803678-5.00356-8. 査読無
- 10) 濱野真二郎: アメーバ症、**今日の診断指針 (第7版)**, 医学書院, 2015, 1422-1425. 査読無
- 11) 濱野真二郎: 第42章 蠕虫学、**標準微生物学 第12版**, 医学書院, 2015, 551-564. 査読無
- 12) 濱野真二郎: 住血吸虫症、**今日の治療指針 2015**, 医学書院, 2015, 278. 査読無
- 13) 濱野真二郎: リンパ系系状虫症、イヌ系状虫症、**寄生虫症薬物治療の手引き 改訂8.0版**, 熱帯病治療薬研究班, 2014, 62-63, 68. 査読無
- 14) 濱野真二郎: アメーバ症、**今日の治療指針 2014**, 医学書院, 2014, 255. 査読無

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

濱野 真二郎 (HAMANO, Shinjiro)  
長崎大学・熱帯医学研究所・教授  
研究者番号：70294915

### (2)研究分担者

菊池 三穂子 (KIKUCHI, Mihoko)  
長崎大学・熱帯医学研究所・講師  
研究者番号：40336186

中村 梨沙 (NAKAMURA, Risa)  
長崎大学・熱帯医学研究所・助教  
研究者番号：50645801

### (3)連携研究者

見市 文香 (MI-ICHI, Fumika)  
佐賀大学・医学部・助教  
研究者番号：70576818

### (4)研究協力者

William A. Petri Jr.  
University of Virginia・Professor

Rashidul Haque  
Icddr,b, International Scientist

Dinesh Mondal  
Icddr,b, International Scientist

Sharmina DeLoer  
長崎大学・医歯薬学総合研究科・大学院生