

事業区分	経常研究	研究期間	平成 24 年度 ~ 平成 25 年度	評価区分	事前評価
研究テーマ名	E 型肝炎ウイルス(HEV)に対する治療薬スクリーニング系に関する基礎的検討				
(副題)	(E 型肝炎ウイルスの謎に迫る)				
主管の機関・科(研究室)	研究代表者名	環境保健研究センター 保健科 吾郷昌信			

<県総合計画等での位置づけ>

長崎県総合計画	政策 2 : 一人ひとりをきめ細かく支える 施策 1 : 医療をみんなで支える体制づくり 主要事業 6 : 感染症対策の充実・強化 施策 4 : 食の安全・安心の確保 主要事業 1 : 食品の安全・安心の確保
長崎県環境保健研究センター運営計画 <重点目標> 感染症の究明・拡大防止を図る	感染源及び病原性の解明等に関する研究 感染症の高感度迅速診断法ならびに予防、治療に関する研究

1 研究の概要

選択的な抗 HEV 活性を示す物質を見出すスクリーニング系の構築に必要な HEV の効率の良い感染培養系、複製系、定量系の構築並びに HEV の複製に必須な HEV 酵素タンパク質の作製及び活性測定系に関する基礎的検討を行う。	
研究項目	HEV の効率的な感染培養系の確立、感染性クローンの構築及びこれらを用いた定量系・スクリーニング系に関する検討 HEV レプリコンの作製及び高効率培養系を用いた定量的スクリーニング系に関する検討 分子標的とする HEV 酵素タンパク質組換え体の作製、酵素性状解析及びこれを用いたスクリーニング系に関する検討

2 研究の必要性

1) 社会的・経済的背景及びニーズ HEV は急性肝炎、劇症 E 型肝炎の原因ウイルスであり、我が国における感染症例は HEV に感染したブタやイノシシを摂食することによる動物由来感染が大部分を占める。HEV 感染の効果的予防法(ワクチン)や HEV による急性肝炎、劇症肝炎の原因療法となる治療薬(抗ウイルス剤)が待望されているが、HEV には効率の良い感染培養系がないことからウイルス学的研究並びに HEV ワクチンや抗ウイルス剤(抗 HEV 剤)の開発研究を展開する上で大きな障壁となっている。
2) 国、他県、市町、民間での実施の状況または実施の可能性 培養細胞で活発に増殖する従来のウイルスのような定量可能で効率の良い HEV の感染培養系及び複製系は開発されてない。また、HEV 遺伝子上にウイルス複製に必須な幾つかの酵素タンパク質がコードされることが推定されているが、研究は緒に就いたばかりでその実態は殆ど明らかにされていない。

3 効率性(研究項目と内容・方法)

研究項目	研究内容・方法	活動指標	H					単位	
			24	25	26	27	28		
高効率感染培養系及びウイルス感染力価測定系の構築		達成率	目標	80	20	/	/	/	%
		実績			/	/	/		
HEV 感染性クローンの構築		達成率	目標	60	40	/	/	/	%
		実績			/	/	/		
HEV レプリコンの構築		達成率	目標	60	40	/	/	/	%
		実績			/	/	/		
酵素機能を有する HEV 組換えタンパク質の作製および精製法の確立、高効率活性測定系の構築		達成率	目標	50	50	/	/	/	%
		実績			/	/	/		
アッセイ(スクリーニング)系の構築		達成率	目標	20	80	/	/	/	%
		実績			/	/	/		

- 1) 参加研究機関等の役割分担
 大阪大学微生物病研究所：各種肝細胞由来細胞株、抗体の分与及びレプリコンの構築に関する協力
 東京都医学総合研究所：HEV 感染性クローン作製協力
 国立感染症研究所；HEV レプリコンの構築に関する協力

2) 予算

研究予算 (千円)	計 (千円)	人件費 (千円)	研究費 (千円)	財源			
				国庫	県債	その他	一財
全体予算	25,076	18,076	7,000				7,000
24年度	12,538	9,038	3,500				3,500
25年度	12,538	9,038	3,500				3,500
26年度							
27年度							
28年度							

過去の年度は実績、当該年度は現計予算、次年度以降は案
 人件費は職員人件費の見積額

(研究開発の途中で見直した事項)

4 有効性

研究 項目	成果指標	目標	実績	H	H	H	H	H	得られる成果の補足説明等
				24	25	26	27	28	
	学会発表	1回							HEV の定量的感染培養系、複製系の構築あるいは複製に關与するウイルスタンパク質の酵素性状等に関する科学的な根拠に基づいた情報を発信をすることにより HEV 複製メカニズムの解明、ワクチン開発、抗ウイルス剤開発の進展を図る。
	論文発表	1報							

1) 従来技術・先行技術と比較した新規性、優位性

当センターでは以前よりブタ、イノシシにおける HEV 感染の分子疫学研究を継続して実施してきており、ウイルス粒子が存在すると考えられる HEV 遺伝子が確認された検体を多数保有し、ピコルナウイルス研究で培った感染性 cDNA クローンの構築技術を有する。加えて、感染性 cDNA クローンやレプリコン構築において突出した実績を有する東京都医学総合研究所や国立感染症研究所の協力が得られることや 大阪大学微生物病研究所には C 型肝炎ウイルス研究で用いた多数のヒト肝由来細胞株やその変異株を多数保有しており、HEV の感染培養系、複製系を構築するには優位である。

また、分子標的となる組換えウイルス酵素タンパク質の作製法や活性を保持した状態での精製法並びに抗ウイルス活性測定系及び酵素阻害活性の高効率測定系の構築に関するノウハウの蓄積は、明らかな独創性と優位性をもたらす。

2) 成果の普及

研究成果の社会・経済への還元シナリオ

研究成果を論文・学会発表することにより HEV の感染・複製メカニズムの解明の飛躍的な進展、感染モデル動物の開発、中和抗体測定に基づく診断系の確立、ワクチン、抗ウイルス剤開発の促進

研究成果による社会・経済への波及効果の見込み

- ・経済効果：ブタ、イノシシの精肉提供における安全性の向上、患者発生の防止

(研究開発の途中で見直した事項)

(脚注説明)

感染性 cDNA クローン

RNA を遺伝子とするウイルスは、遺伝子が RNA であるがためにそのままでは DNA のように人為的に遺伝子を加工することはできない。このため、ウイルス遺伝子と相補的な配列を持つ完全長の cDNA を逆転写酵素を使って試験管内で合成し、更に 2 本鎖 DNA にした上で大腸菌の中で独自に増えることができるプラスミドという核外遺伝子に組み込んだものを感染性 cDNA クローンと呼ぶ。ここで使用するプラスミドには、ウイルスの遺伝子を挿入する部位の上流に試験管内で RNA を合成できるようにする特殊な配列が存在する。したがって、大腸菌で増やした感染性 cDNA クローンから RNA ポリメラーゼという酵素を用いてウイルス遺伝子と同じ RNA を大量に合成し、これを細胞内に導入することによってウイルスとして回収することができる。また、感染性 cDNA を構築することでウイルス遺伝子の中に人為的に手を加える遺伝子操作が可能となる。

レプリコン

感染性 cDNA クローンと同様にウイルス遺伝子と相補的な配列を持つ完全長の cDNA を逆転写酵素を使って試験管内で合成し、更に 2 本鎖 DNA にした上でプラスミドに組み込み、大腸菌の中でウイルス遺伝子を含むプラスミドを大量に増やす。このプラスミドからウイルス遺伝子のウイルス粒子構成タンパク質をコードする部分を制限酵素と呼ばれる DNA の配列を特異的に認識して切断する酵素を用いて選択的に除いて切り出し、ウイルスの遺伝子を挿入する部位の上流に GFP(オワンクラゲ緑色蛍光タンパク質)やルシフェラーゼの遺伝子とさらに上流に試験管内で RNA を合成できるようにする特殊な配列が存在するプラスミドに挿入しこれを大腸菌の中で増やす。このプラスミドから RNA ポリメラーゼを用いて GFP あるいはルシフェラーゼ遺伝子と非構造タンパク質をコードするウイルス遺伝子が繋がった RNA を大量に合成し、これを細胞内に導入するとウイルス非構造タンパク質が合成されてこの RNA の複製が起こる。同時に GFP またはルシフェラーゼも合成されるので GFP の蛍光強度あるいはルシフェラーゼの活性を測ることでウイルス遺伝子の複製程度を測定することができる。このような加工を施したウイルス遺伝子をレプリコンと称する。レプリコンからはウイルスの構造タンパク質は合成されないためウイルス粒子は形成されないことからレプリコンを導入した細胞でのみ RNA の複製が起こる。したがって、レプリコンを細胞内に導入することによりウイルス遺伝子の一過性の複製を定量的に測定できる。

中和抗体

生体内にタンパク質のような異物が侵入すると免疫応答により抗体が産生される。ウイルスが感染した際もウイルス粒子を構成するタンパク質に対する種々の抗体が産生される。このうち、ウイルスの細胞への感染を阻止することができる抗体を中和抗体と呼ぶ。

種類	自己評価	研究評価委員会
事前	<p>(23年度) 評価結果 (総合評価段階: A)</p> <p>・必要性 S</p> <p>HEV は急性肝炎、劇症 E 型肝炎の原因ウイルスであり、我が国における感染症例は HEV に感染したブタやイノシシを摂食することによる動物由来感染が大部分を占める。HEV 感染の効果的予防法(ワクチン)や HEV による急性肝炎、劇症肝炎の原因療法となる治療薬(抗ウイルス剤)が待望されているが、HEV には効率の良い感染培養系がないことからウイルス学的研究並びに HEV ワクチンや抗ウイルス剤(抗 HEV 剤)の開発研究を展開する上で大きな障壁となっている。したがって、この問題を克服することが HEV 研究における最重要課題である。</p> <p>・効率性 A</p> <p>HEV の効率的な感染培養系の確立、感染性クローンの構築及びこれらを用いた定量的スクリーニング系の構築</p> <p>HEV レプリコンの作製及び高効率培養系を用いた定量的スクリーニング系の構築</p> <p>分子標的とする HEV 酵素タンパク質組換え体の作製、酵素性状解析及び高効率活性測定系の構築及びこれらを用いたスクリーニング系の構築。基本的には当該部署単独で実施するが、以下の内容で 3 研究機関に協力を仰ぐ。大阪大学微生物病研究所: 各種肝細胞由来細胞株、抗 HEV モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの分与及びレプリコンの構築に関する協力。東京都医学総合研究所: HEV 感染性クローン作製協力。国立感染症研究所: HEV レプリコンの構築に関する協力。</p> <p>・有効性 A</p> <p>当センターでは以前よりブタ、イノシシにおける HEV 感染の分子疫学研究を継続して実施してきており、ウイルス粒子が存在すると考えられる HEV 遺伝子が確認された検体を多数保有し、ピコルナウイルス研究で培った感染性 cDNA クローンの構築技術を有する。加えて、感染性 cDNA クローンやレプリコン構築において突出した実績を有する東京都医学総合研究所や国立感染症研究所の協力が得られることや 大阪大学微生物病研究所には C 型肝炎ウイルス研究で用いた多数のヒト肝由来細胞株やその変異株を多数保有しており、HEV の感染培養系、複製系を構築するには優位である。また、分子標的となる組換えウイルス酵素タンパク質の作製法や活性を保持した状態での精製法並びに抗ウイルス活性測定系及び酵素阻害活性の高効率測定系の構築に関するノウハウの蓄積は、明</p>	<p>(23年度) 評価結果 (総合評価段階: A)</p> <p>・必要性 S</p> <p>感染症の究明・拡大防止は県の行政施策に沿っており、治療薬の開発や、食の安心・安全の上からも重要な研究であり、県民及び保健医療界のニーズが高いと思われる。また、長崎県のレベル向上につながる事が期待される。高度の研究体制を確立していくことは研究ポテンシャルの向上に直結する。しかし、通常では国あるいは大学で行われる高いレベルの研究であり、地方の環境研究所で短期間(2年間)の研究となることへの懸念がある。</p> <p>・効率性 A</p> <p>研究目標を確立し、その研究連携体制も具体的役割を明確にするなど、研究体制が十分配慮されており、これまでの知識や準備状態も整っているため効率性では問題ないとする。</p> <p>・有効性 A</p> <p>難しいテーマであるが、全体のベースアップができるとともに、この世界の疫学、感染症対策への大きな前進となる。アッセイキットの開発までできれば非常に有効性の高い研究となり、今後の発展が期待できる。研究成果の移転、普及、実用化にはさらに多くの時間が必要と思われるが、それぞれの機関の研究蓄積を有効的に活用するシステムは独創性と優位性に繋がると評価する。</p> <p>・総合評価 A</p> <p>長崎県だけでなく様々な地域において利用可能なアッセイと考えられ、センターの研究ポテンシャルの向上や世界に貢献する成果に結びつくなど、大いに期待される研究課題である。</p>

	<p>らかな独創性と優位性をもたらす。</p> <p>・総合評価 A 本研究の成果を論文・学会発表することにより HEV の感染・複製メカニズムの解明の飛躍的な進展、感染モデル動物の開発、中和抗体測定に基づく診断系の確立、ワクチン、抗ウイルス剤開発の促進等に幅広く貢献していくものと思われる。</p>	
	対応	<p>対応</p> <p>アッセイ系の基本的な構築及び評価は既に完了し、完成している。したがって、HEV への応用にのみ時間を費やせば良いので、計画した時間内に十分収められるものと思われるが、綿密な計画の基に効率的に実施していきたい。</p>
途中	<p>(年度) 評価結果 (総合評価段階:)</p> <p>・必要性</p> <p>・効率性</p> <p>・有効性</p> <p>・総合評価</p>	<p>(年度) 評価結果 (総合評価段階:)</p> <p>・必要性</p> <p>・効率性</p> <p>・有効性</p> <p>・総合評価</p>
	対応	対応
事後	<p>(年度) 評価結果 (総合評価段階:)</p> <p>・必要性</p> <p>・効率性</p> <p>・有効性</p> <p>・総合評価</p>	<p>(年度) 評価結果 (総合評価段階:)</p> <p>・必要性</p> <p>・効率性</p> <p>・有効性</p> <p>・総合評価</p>
	対応	対応

総合評価の段階

平成20年度以降

(事前評価)

- S = 積極的に推進すべきである
- A = 概ね妥当である
- B = 計画の再検討が必要である
- C = 不相当であり採択すべきでない

(途中評価)

- S = 計画以上の成果をあげており、継続すべきである
- A = 計画どおり進捗しており、継続することは妥当である
- B = 研究費の減額も含め、研究計画等の大幅な見直しが必要である
- C = 研究を中止すべきである

(事後評価)

- S = 計画以上の成果をあげた
- A = 概ね計画を達成した
- B = 一部に成果があった
- C = 成果が認められなかった

平成19年度

(事前評価)

- S = 着実に実施すべき研究
- A = 問題点を解決し、効果的、効率的な実施が求められる研究
- B = 研究内容、計画、推進体制等の見直し求められる研究
- C = 不相当であり採択すべきでない

(途中評価)

- S = 計画を上回る実績を上げており、今後も着実な推進が適当である
- A = 計画達成に向け積極的な推進が必要である
- B = 研究計画等の大幅な見直しが必要である
- C = 研究費の減額又は停止が適当である

(事後評価)

- S = 計画以上の研究の進展があった
- A = 計画どおり研究が進展した
- B = 計画どおりではなかったが一応の進展があった
- C = 十分な進展があったとは言い難い

平成18年度

(事前評価)

- 1: 不相当であり採択すべきでない。
- 2: 大幅な見直しが必要である。
- 3: 一部見直しが必要である。
- 4: 概ね適当であり採択してよい。
- 5: 適当であり是非採択すべきである。

(途中評価)

- 1: 全体的な進捗の遅れ、または今後の成果の可能性も無く、中止すべき。
- 2: 一部を除き、進捗遅れや問題点が多く、大幅な見直しが必要である。
- 3: 一部の進捗遅れ、または問題点があり、一部見直しが必要である。
- 4: 概ね計画どおりであり、このまま推進
- 5: 計画以上の進捗状況であり、このまま推進

(事後評価)

- 1: 計画時の成果が達成できておらず、今後の発展性も見込めない。
- 2: 計画時の成果が一部を除き達成できておらず、発展的な課題の検討にあたっては熟慮が必要である。
- 3: 計画時の成果が一部達成できておらず、発展的な課題の検討については注意が必要である。
- 4: 概ね計画時の成果が得られており、必要であれば発展的な課題の検討も可。
- 5: 計画時以上の成果が得られており、必要により発展的な課題の推進も可。