

事業区分	経常研究(基盤)	研究期間	平成 24 年度～平成 25 年度	評価区分	事後評価
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)	()				
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			

＜県長期構想等での位置づけ＞

長崎県における食品の安全安心確保基本方針 長崎県食品の安全・安心アクションプラン(平成 23～27 年度)	1 生産から消費までの食品の安全性の確保 3 食品の安全性確保体制の充実 ①食品の安全管理に関する調査・研究の推進 ②試験検査体制の充実 6 消費者に対する安全・安心への理解促進 ①正確な情報の公開
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	①感染源及び病原性の解明等に関する研究 ②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	①HEV 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 ②HEV 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 ③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いない。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		
①	高効率感染培養系及びウイルス感染力価測定系の構築に関する検討	達成率	目標	95	5	/	/	/	%
			実績	95	5	/	/	/	
②	HEV 感染性クローンの構築に関する検討	達成率	目標	50	50	/	/	/	%
			実績	50	0	/	/	/	
③	HEV レプリコンの構築に関する検討	達成率	目標	50	50	/	/	/	%
			実績	40	20	/	/	/	
④	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に関する検討	達成率	目標	50	50	/	/	/	%
			実績	50	50	/	/	/	
⑤	アッセイ(スクリーニング)系の構築に関する検討	達成率	目標	20	80	/	/	/	%
			実績	20	80	/	/	/	

- 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、発現プラスミド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	24,134	18,560	5,574				5,574
24年度	12,067	9,280	2,787				2,787
25年度	12,067	9,280	2,787				2,787
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)

供試した細胞の中にはウイルス感染性あるいは抗原性でHEV増殖量を判定することが可能な高効率培養細胞系が見出せなかったため、それ以降の検討に使用する HEV 感染性クローンの構築に関する検討は中断した。

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	
①	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関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。 学会発表実績 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 (H25) 第 54 回日本臨床ウイルス学会 (H25)
②	論文発表	1報			○	/	/		
③						/	/		
④						/	/		
⑤						/	/		

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)

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> <ul style="list-style-type: none"> ・必要性 S <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> <ul style="list-style-type: none"> ・効率性 A <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> <ul style="list-style-type: none"> ・有効性 A <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> <ul style="list-style-type: none"> ・必要性 S <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> <ul style="list-style-type: none"> ・効率性 A <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> <ul style="list-style-type: none"> ・有効性 A <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> <ul style="list-style-type: none"> ・総合評価 A <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 ・効率性 ・有効性 ・総合評価</p>	<p>(年度) 評価結果 (総合評価段階:)</p> <p>・必要性 ・効率性 ・有効性 ・総合評価</p>
	対応	対応
事 後	<p>(26 年度) 評価結果 (総合評価段階: B)</p> <p>・必要性 A 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。これを打開する新たな取り組みが必要。</p> <p>・効率性 B 期間内に検討できない項目もあったが、協力研究機関の支援を受け、進めることができた。</p> <p>・有効性 B NTPase 活性測定系は、抗 HEV 候補物質の 1 次スクリーニング系として有用と思われる。</p> <p>・総合評価 B 抗 HEV 剤開発における増殖阻害や診断系ワクチン開発に最も重要なウイルス中和反応を測定するための HEV 増殖量を生物学的に直接定量するアッセイ系は構築できなかったものの、ウイルス遺伝子(RNA)複製に必須である RNA ヘリカーゼと推定されるウイルスタンパク質の</p>	<p>(26 年度) 評価結果 (総合評価段階: B)</p> <p>・必要性 A 公衆衛生上重要な感染症の原因ウイルスでありながら効率の良い複製手段がないためにウイルス学的な研究が困難である EHV の感染培養系を確立することを目的とした研究で、EHV の治療薬、ワクチン等の開発に有用である。また、研究員の技術力アップという観点でも必要性は高いと思われる。</p> <p>・効率性 B 他の研究機関との連携により、目処が立った研究項目もあるが、目標とした感染培養・複製系の確立には至らず、また、活性測定系の確立にも至っておらず、研究が完成するまでには、更に多くの時間が必要で計画が甘かったと言わざるをえない。</p> <p>・有効性 B スクリーニング系が完成されると、医薬品の開発にもつながり、成果が期待されるが、一部有効な検出手段が開発されつつあるものの、研究内容が多すぎて得られた成果の十分な整理がついておらず、今後の展開が不明瞭である。</p> <p>・総合評価 B 国や大学等との研究協力体制の中で、多項目にわたって高度な研究が実行され一定の成果が得られている。しかしながら、当初の目的を達成するには至っていない。</p>

<p>RNA ヘリカーゼ活性に不可欠の NTPase 活性の検出および酵素活性測定系の構築に成功した。本アッセイ系は、抗 HEV 剤探索における1次スクリーニング系として応用可能であると思われる。</p>	
<p>対応</p>	<p>対応</p> <p>本研究において、国や大学等との研究協力体制の中で導入を図ってきた遺伝子組換え技術は、ウイルスや細菌等の微生物分野での応用はもちろんのこと、ツシマヤマネコの保護増殖事業等、多岐にわたって有益な技術であり、適用範囲が非常に広い。</p> <p>現在、H26～27年度の経常研究事業「ヒスタミン産生菌及びそのヒスチジン脱炭酸酵素(HDC)の性状に関する検討」に取り組む中で、組換え技術に関する研究員の育成や必要機器の整備を行っている。さらに、これまで実施してきた研究事業の成果を、目に見える形で県民に還元し、公衆衛生の向上に寄与する取り組みとして、新たな事業を提案している。</p>