

別紙1-1

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	甲	第	号
------	---	---	---	---

氏 名 堀場 千尋

論 文 題 目

Comprehensive detection of pathogens in immunocompromised children with bloodstream infections by next-generation sequencing

(小児血流感染症における病原微生物診断への次世代シーケンスの応用)

論文審査担当者

名古屋大学教授

主 査 委員

木 村 宏 


名古屋大学教授

委員

西 川 尚 希 

名古屋大学教授

委員

内 田 広 夫 

名古屋大学教授

指導教授

高 橋 義 行 

論文審査の結果の要旨

今回、血流感染症（BSI）が疑われ血液培養陽性であった小児患者 12 例（BSI 群）の発症前、発症時（血液培養採取時）、抗菌薬治療後の血液検体 36 検体と、BSI が疑われたが血液培養陰性であった小児患者 23 例（BSI 疑い群）の発症時の血液検体 23 検体についてショットガンシーケンス法による次世代シーケンス（NGS）解析を行い、病原微生物検索を行った。NGS による病原菌の検出基準を 100 万リードあたりの細菌由来リード数が 200 より大きく、最も検出された微生物の相対優占度が 0.50 未満と設定したとき、BSI 群 12 例中 8 例より病原菌を検出し、そのうち 7 例が血液培養の結果と一致した。また、同基準により BSI 疑い群 23 例中 3 例で、*Tatlockia micdadei*、*Escherichia coli*、アデノウイルスをそれぞれ有意な病原微生物として検出した。以上より、NGS は BSI の病原微生物を検出する新しい方法として臨床応用可能であり、BSI 発症の予測や病原菌の耐性遺伝子検出ができることが示唆された。

本研究に対し、以下の点を議論した。

1. NGS により微量に検出された微生物の塩基配列は、類似配列検索の際に生じたミスアライメント、血液採取時に混入した皮膚常在菌、または口腔内常在菌や腸内細菌の一時的な血流への混入に由来すると考えられる。前者についてはデータ解析法の改良、後者については血液採取時に患者の常在菌解析を追加することで改善が期待できる。
2. ショットガンシーケンスの利点は、網羅的に検体中の核酸を解析するため、16SrRNA 解析とは異なり細菌以外の微生物も検出対象にできることである。今後の課題は、病原微生物検索に必要な出力量が大きく高コストとなるため、臨床診断として利用できる必要十分な出力量を決定することである。
3. 今回の検討では未知の病原微生物と考えられる塩基配列はなかった。未知の微生物が想定される場合、塩基配列の断片をアセンブルすることで対象のゲノムを再構成し、近縁となる微生物を検索し未知の対象となる微生物の分類を試みる方法を考えている。病原性の検証には動物実験などさらなる検討が必要である。
4. NGS の検出基準を満たさない症例は存在したが、血液培養で検出された細菌の DNA はすべての症例で検出できていた。血液培養の結果は、培養 1 セットからの検出で陽性としていることから、コンタミネーションを検出していた可能性が考えられた。
5. 今回の研究は解析対象を DNA としていた。実際には RNA ウイルスも病原微生物に含まれているため、RNA も対象とした NGS 解析も追加し、より網羅的な病原微生物検出法の開発を考えている。

本研究は、NGS による血流感染症の病原微生物診断法を確立する上で、重要な知見を提供した。

以上の理由により、本研究は博士（医学）の学位を授与するに相応しい価値を有するものと評価した。

試験の結果の要旨および担当者

報告番号	※ 甲 第	号	氏 名	堀場千尋
試験担当者	主査	木村 宏	副査 ₁	西川 尚壽
	副査 ₂	内田 広夫	指導教授	高橋 義行
(試験の結果の要旨)				
<p>主論文についてその内容を詳細に検討し、次の問題について試験を実施した。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 次世代シーケンスで微量に検出された微生物の解釈について 2. ショットガンシーケンスを用いた血液検体からの病原微生物解析を行う利点と今後の課題について 3. 未知の病原微生物を検出するための解析方法について 4. 血液培養陽性症例のなかで次世代シーケンスの病原菌検出基準を満たさなかった症例の解釈について 5. 次世代シーケンスによる病原微生物診断の今後の展望について <p>以上の試験の結果、本人は深い学識と判断力ならびに考察力を有するとともに、小児科学一般における知識も十分具備していることを認め、学位審査委員合議の上、合格と判断した。</p>				