

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 鈴木 高子

論 文 題 目

Comprehensive detection of viruses in pediatric patients with acute liver failure using next-generation sequencing

(次世代シーケンスによる小児急性肝不全症例の病原ウイルス検索)

論文審査担当者

名古屋大学教授

主 査 委員

木 村



名古屋大学教授

委員

萩 朋 男



名古屋大学教授

委員

八木 哲也



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

別紙1-2

今回、次世代シーケンス（NGS）を用いて成因不明の小児急性肝不全・重症急性肝炎症例の臨床検体から病原ウイルス検索を行った。事前に手法の検証を行い、DNA シーケンスについては PCR と同等のウイルス検出が確かめられた。RNA シーケンスについては3種類の RNA ライブラリー調整キットが比較され、Ovation で高いウイルス検出力が確認された。小児急性肝不全・急性肝炎 14 例の検討では、3 例で特定のウイルスの配列が検出され、輸血後急性肝不全をきたした 1 例で Torque teno virus（TTV）が検出され関連が示唆された。検出されたウイルスと疾患との関連はさらなる検討を要するが、NGS による網羅的なウイルス検索は有用であ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. 14 例中 2 例で単純ヘルペスウイルス、アデノウイルス由来リードが数リード検出されている。有意と言えない数でリードが検出される原因として、NGS の手法上生じるコンタミネーションを考えた。具体的には、複数のライブラリーをプーリングする過程で他のライブラリーのウイルス由来配列がハイブリダイズし、混入してしまう可能性や、同一レーンを使用することで以前のシーケンスで多く検出されたウイルスを拾ってしまう可能性を指摘した。
2. ホストゲノムや外来のコンタミネーションと比較して、ウイルスの検出力が弱く、未知のウイルス検出を本手法で行うには課題が残る。RNA シーケンスでは DNase 処理や Ovation を使用することで、ホスト由来ゲノムの増幅を抑え、ウイルスの検出力の向上が認められている。ライブラリー作成の段階でヒトゲノムをより効率的に除去できる手法が望まれる。
3. Agrobacterium など土壌由来の細菌のコンタミネーションが他にも多く報告されている。キット製造過程や実験系でのコンタミネーションが指摘されている。サンプル中の核酸濃度が低い場合に、特にこれらの核酸由来配列の増幅が見られやすく、サンプル調製、シーケンスデータの解析をする上での課題と考えられた。
4. TTV 検出例は赤血球輸血後急性肝不全を呈しており、輸血された血球中にウイルスが存在し感染源となった可能性がある。TTV はアジア圏で>50%と広くヒトへの分布が報告されている。現在血液製剤に対し TTV のスクリーニングは行われておらず、本例で使用された血液製剤に TTV が含まれていた可能性はあるが、本研究ではそこまでの確認には至っていない。また TTV の病原性は未だ明確になっておらず、TTV と急性肝不全との関連についてはさらなる検討を要すると考えられた。

本研究は、小児急性肝不全の病態解明、感染症診断の新たな手法を確立する上で、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	鈴木 高子
試験担当者	主査	木村 宏	副査 ₁	萩 明男
	副査 ₂	八木 哲也	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. 有意と言えない数のリードが検出されたウイルスについて2. 全シーケンスリードに占めるウイルス由来リードの割合について3. 検出された土壌由来細菌について4. Torque teno virusの感染経路について <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>				