



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Development of highly efficient methods for comprehensive pathogen detection using next generation sequencing [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	Reteng, Patrick
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(感染症学)
Dissertation Number	甲第15524号
Issue Date	2023-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/89968
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Patrick_Reteng_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（感染症学）

氏名：Patrick Reteng

審査委員	主査	教授	澤	洋文
	副査	教授	野中	成晃
	副査	准教授	山岸	潤也
	副査	助教	林田	京子

学位論文題名

Development of Highly Efficient Methods for Comprehensive Pathogen Detection Using Next Generation Sequencing (次世代シーケンサーを用いた高効率網羅的病原体検出法の開発)

感染による発熱性疾患は、臨床症状が非特異的である場合が多く、また、病因となりうる病原体も多岐にわたる。従って、その原因特定に際しては、可能性の高い順に限られた数の病原体に絞った検査が行われているのが実情であり、特定に至らない不明熱として扱われる場合も多い。それらの特定を可能とするアプローチとして、近年、次世代シーケンサー（NGS）を応用した **metagenomic NGS (mNGS)** の臨床応用が進みつつある。しかしながら、費用や手技の煩雑さから、標準的な診断方法として利用されるには至っていない。

NGS 分野における技術開発は近年さらに加速しており、mNGS 実用化へ向けた追い風となっている。例えば、Illumina 社が提供するシーケンサーは解析力を著しく高め、塩基あたりの費用も低下している。Oxford nanopore technologies 社のシーケンサーは、精度には劣るものの、装置が安価かつ保守が容易であることもあり、開発途上国等のリソースの限られた環境下でより多くの支持を得ている。このように、シーケンサーの能力は mNGS による診断の実用化に十分な水準に至りつつあると言える。一方、検体調整とライブラリー構築は、高額かつ複雑なままであり、mNGS 診断実用化の妨げになっている。そこで本研究では、その解決に資する各種代替方法の開発を行った。

第 1 章では、発熱性疾患の原因としてよく知られているフラビウイルスをモデルに、同一の属や科に属するウイルスを網羅的に検出するための方法を開発した。具体的にはフラビウイルス属の NS5 遺伝子の保存領域を PCR により増幅し、nanopore シーケンサーで解析することにより、同属ウイルスの網羅的な同定を実

現した。さらに、PCR プライマーにインデックス配列を付与することで、多検体同時解析による費用削減が可能なことを実証した。本技術は研究資源が限られた環境でも実施可能であり、多様な病原体の効率的かつ網羅的な診断が、遠隔地の診療所や保健所でも実施可能となることが期待される。

第 2 章では、全 RNA 増幅法の開発と検証を行った。全 RNA は、RNA ウイルスのゲノムと、DNA/ RNA ウイルスの転写産物を含んでおり、mNGS 解析により全てのウイルスを理論上検出可能である。しかしながら、微量なウイルス由来 RNA を検出するためには、NGS 解析の前に増幅を行う必要があるため、簡便かつ偏りの少ない RNA 増幅法の開発が求められてる。そこで本研究では、cDNA を一本鎖 DNA 特異的なリガーゼにより環状化した後、phi29 で増幅することを着想した。本法（circular whole-transcriptome amplification : cWTA）を用いて、臨床サンプルからデングウイルスとチクングニアウイルスを検出することにも成功した。実施が比較的容易な cWTA と可搬的な nanopore 型 NGS を組み合わせることで、mNGS を用いた感染症診断が場所を問わず実施可能となることが期待される。

第 3 章では、mNGS を用いた網羅的な病原体検出をより効率的に行うためのライブラリー構築法の実証を行った。本研究では、group testing algorithm と呼ばれる検体プール方法を mNGS と組み合わせることを着想した。本法（mNGS screening enhanced by a group testing algorithm : mEGA）を用いることで、 2^n 個の検体に対するライブラリーの数を $2n$ 個に圧縮しつつ、各検体とシーケンス結果を紐付けた解析を行うことができる。実証試験として、発熱患者から採取した血清試料 44 検体から 11 ライブラリーを構築し、シーケンスを行った。その結果、3 検体からそれぞれデングウイルス、B 型肝炎ウイルス、ヒトパルボウイルス B19 の配列を検出することに成功した。第 1 章でのアプローチと比較すると、本アプローチは大規模検体の一括解析に適しており、検体が集積する中核機関での病原体検出、解析能力を向上させることが期待される。

mNGS を用いた感染症診断を行う際には、解析規模や環境に応じてライブラリー調整方法を最適化する必要がある。また、費用の低減も図らなければならない。これらの点について本研究では、種々のライブラリー調整方法を開発することで問題の解決を図り、その結果、mNGS 診断の社会実装を実現する道筋が示された。よって、審査委員一同は、上記学位論文提出者 Patrick Reteng 氏の学位論文は、北海道大学大学院国際感染症学院規程第 10 条の規定による本学院の行う学位論文の審査等に合格と認めた。