The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Direct Metagenomic Detection of Viral Pathogens in Nasal and Fecal Specimens Using an Unbiased High-Throughput Sequencing Approach
Author(s)	楊, 成松
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58188
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【47】

氏　　名	楊（よう）　成（せい）　松（しょう）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　２４３６９　号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 23 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第４条第１項該当 医学系研究科予防環境医学専攻
学　位　論　文　名	Direct Metagenomic Detection of Viral Pathogens in Nasal and Fecal Specimens Using an Unbiased High-Throughput Sequencing Approach （次世代型シーケンサーを用いた、鼻汁および糞便中からの病原ウイルスゲノムの網羅的検出）
論 文 審 査 委 員	（主査） 教　授　生田　和良 （副査） 教　授　松浦　善治　　教　授　塩田　達雄

論 文 内 容 の 要 旨

〔　目　　的　〕

新興・再興ウイルス感染症の流行時には、迅速にウイルスを同定し、その遺伝子配列を決定することが重要である。本研究では、次世代型シーケンサー（GS FLX; 454 LifeSciences）を用いて、

患者由来試料（鼻汁および糞便）よりウイルスゲノムの迅速同定系を確立することを目的とし、454シーケンサーのテンプレート調製方法について検討した。

〔　方法ならびに成績　〕

2005年から2007年の国内インフルエンザ（Flu）A型感染者の鼻汁サンプル（n=3）およびノロウイルス感染者の糞便サンプル（n＝5）各0.1-0.2mlを試料とした。核酸（RNA）抽出はTRI LS（フェノール及びチオシアン酸グアニジン）を用いて感染性失活条件下で行った。454シーケンサーのテンプレートとして数マイクログラムのcDNAが必要なことから、TransPlex Whole Transcriptome Amplification（WTA）キットを用いたランダムPCRによるcDNA合成・増幅を行った。

調製したcDNAは塩基長が数百から1,000bpまでであり、cDNA量は1E＋02-03まで上昇することが確認できた。シーケンスにより得られた各試料のリード数は15Kから32Kであり、リード当たり約250塩基が解析可能であった（70x75 PicotiterPlate 1枚で8試料を解析）。鼻汁由来検体では3検体すべてからインフルエンザウイルスゲノムが検出され、その遺伝子配列からサブタイピングが可能であった。しかしながらヒト由来遺伝子が大部分であり、適切なサブトラクションが必要であると思われた。一方、糞便5検体では核酸抽出前に15Krpmの遠心分離により細菌およびヒト細胞を除去した結果、E+06-07コピーのノロウイルスについては500から15,000リードがウイルスゲノム由来であり、全ゲノムの78-98%をカバーすることができた。さらにノロウイルスゲノム以外にも他のヒト病原ウイルスおよび種々の植物由来および細菌由来のウイルス、ファージゲノムが検出され、本方法がウイルスゲノムの網羅的な解析に有効であることが示唆された。

〔　総　　括　〕

以上の結果から、本研究において、臨床検体からのウイルスゲノムの検出、GS FLXを用いた遺伝子解読のための技術基盤を確立することができたと考えられた。

論文審査の結果の要旨

本研究は原因不明な疾患で、感染症が疑われる症例において、迅速かつ網羅的にウイルスを含む微生物の遺伝子配列を決定し、病原微生物の同定につなげる新しい方法を開発したものである。特に、ヒト病原ウイルスの迅速同定系を確立することを目的とし、次世代シーケンサーを用いて、インフルエンザウイルス感染者の鼻汁サンプルおよびノロウイルス感染者の糞便サンプルを用いた試験を行った。

その結果、インフルエンザウイルスおよびノロウイルス由来の遺伝子が検出されたことに加え、他のヒト病原ウイルス、植物由来ウイルス、およびバクテリオファージゲノムが検出された。これらのことから、申請者が構築した検出システムが、臨床検体中のウイルスゲノムの網羅的な解析に有効であることが示唆された。

本研究の成果は、新規病原体の発見にも大いに貢献すると考えられることから、博士（医学）の学位に値すると考えられる。