

NGSによる原因不明疾患の 病原体検索法の確立

微生物部

○成田 翼 新田真依子 津路優葉
水流奈己 鬼塚咲良 矢野浩司

1

マダニ媒介性感染症患者数

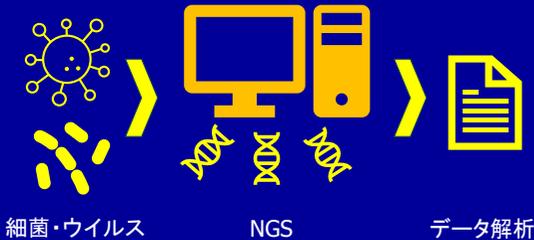
衛生環境研究所には多数マダニ媒介性感染症疑いの検体が来るが、その一部は陰性



2

メタゲノム解析

検体の中にある細菌やウイルスのゲノムをNGSで網羅的に検索。腸内細菌叢解析などに用いられる



3

細菌とウイルスのメタゲノム解析

細菌 Bacteriome



16S領域のゲノム解析による推定

リケッチアについては、当所で検査方法確立済み

ウイルス Virome



RNA断片による推定

全ゲノムの解析ではなく、病原体の種類を推定するのが目的

4

シーケンサー(NGS)について

世代	第一世代	第二世代	第三世代	第四世代
PCR増幅	必要	必要	不要 (単分子計測)	不要 (単分子計測)
検出手法	蛍光	蛍光	蛍光	蛍光色素不要 (イオン電流など)
代表手法	サンガー法 + キャピラリー電気泳動	ブリッジPCR法 + シーケンスByシンセシス	微小ワット内DNA伸長反応	バイオポア, ソリッドナノポア, ナノキャップなど
模式図				
特徴	・読取誤差が小さい ・読取塩基長が比較的長い (~1000塩基)	・超並列処理による高スループット ・読取塩基長が短い (~200塩基)	・塩基毎の識別が可能 ・読取塩基長が長い (平均10k塩基) ・読取誤差が大きい	・塩基毎の識別可能 ・読取塩基長が長い (平均10k塩基) ・読取誤差が大きい
代表機種	SeqStudio (Thermo Fisher Scientific)	NovaSeq 6000 (Illumina)	Sequel II (Pacific Biosciences)	PromethION (Oxford Nanopore Technology)

キャピラリーシーケンサー

次世代シーケンサー(NGS)
出典: 応用物理学会HP

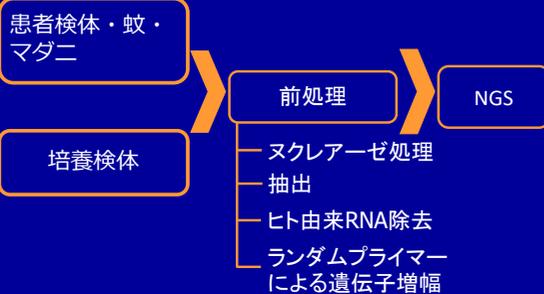
5

目的

- ・ ウイルスの網羅的検索を行う技術の確立
- ・ 原因不明となっているウイルス性感染症を疑う症例の解明
- ・ 新規ウイルスの検出は考えていない

6

方法



7

検討事項

1. 検体の種類
2. 抽出の方法
3. ヒト由来RNA除去の必要性
4. 前処理法 (RDV/SISPA)
5. 最適なデータ解析方法

8

1. 検体の種類

- NGSは遺伝子量の多いものを優先的に解釈
 - ヒト由来の遺伝子が大量にある場合、病原体の遺伝子が読めない
 - 細胞培養により病原体の遺伝子を増やせる
- 培養が必用か検討

9

2. 抽出の方法

- 抽出にはカラム法とグアニジン法がある
 - カラム法
- 手順は簡単だが、DNAが混在する可能性
- グアニジン法
- RNAのみ抽出できるが、作業に慣れが必要



10

3. ヒト由来RNA除去の必要性

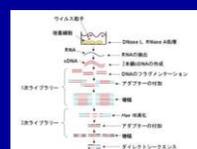
- 試薬により、ヒトの由来のRNA遺伝子を除去可能
- 細胞培養をすれば、この工程は必要ない
- 工程の追加はコンタミネーション(DNA汚染)のリスク↑
- ヒト由来RNAは解析の時点で一定量除去可能
- 培養とRNA除去の比較

11

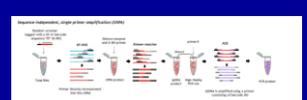
4. 前処理法

不明病原体の解析方法にはRDV法とSISPA法がある

RDV法



SISPA法



Klaudia Chrzastek, Dong-hun Lee, Diane Smith, et al. Use of Sequence-Independent, Single-Primer Amplification (SISPA) for rapid detection, identification, and characterization of avian RNA viruses. *Virology* 2017;509:159-166 より引用

参考 首巻 新興ウイルス感染症の調疫的検出方法 (RDV法) の確立と応用. ウイルス 2007;57(2):217-226 より引用

本法では、1次ライブラリー作成の後、NGSの工程に入る

12

5. 最適なデータ解析方法

- 無料ソフトKraken2を使用予定
- 他にもQIIME2など様々な無料ソフトが存在
- 使用するウイルスゲノムのデータベースによっても精度が変わる

13

適用

- マダニ媒介性疾患が疑われたもののうち原因不明のもの
- サーベイランスなどで原因不明の疾患
- 蚊やマダニなどの虫体からの病原体検出

14

研究の効果

- 原因不明な病気の実態解明
- 新たな検査体制の提供
- 今まで原因不明で終了していた疾患の解明

県民の健康福祉の向上

15