

平成30年1月31日

学 長 殿

主 査 今井邦俊

学位論文審査の要旨及び結果並びに試験の  
結果について（報告）

平成29年12月18日付けで依頼されました下記の者の学位論文審査  
の要旨及び結果並びに試験の結果を別紙1及び別紙2のとおり報告します。

記

専 攻 畜産衛生学専攻(博士後期課程)

氏 名 Dulyatad GRONSA NG

(別紙1)

学位論文審査の結果の要旨		
専攻		畜産衛生学専攻（博士後期課程）
氏名		Dulyatad GRONSANG
審査委員署名	主査	今井 邦俊
	副査	五十嵐 郁男
	副査	井上 昇
	副査	玄 学南
	副査	い、い 晴子
題目		Characterization of monoclonal antibodies against H5N1 subtype highly pathogenic avian influenza virus and their use for analysis of viral antigenicity and diagnosis (H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスに対する単一抗体の特徴づけとこれらの抗体の抗原分析と診断への利用)
審査結果の要旨（1,000 字程度）		

鳥インフルエンザウイルス (AIV) は、赤血球凝集素 (HA) とノイラミニダーゼ (NA) の抗原性から 16 の HA 亜型と 9 の NA 亜型に分類されている。低病原性 AIV (LPAIV) は鶏に病原性を示さないが、高病原性 AIV (HPAIV) は致死性である。しかし、全亜型が HPAIV になる訳ではなく、H5 や H7 亜型 LPAIV の一部の株が変異して HPAIV となり、家禽産業に損失をもたらしている。特に、1997 年に出現した H5N1 亜型 HPAIV が世界的に流行し、人の死亡例もみられたことから公衆衛生上の大きな問題にもなっている。

H5N1 亜型 HPAIV は急速に進化し、現在 HA 遺伝子の系統樹解析により clade 0 ～9 に分類されているが、clade 1、2、7 は更に進化を続けて新たに 2nd-order (clade 1.1、2.2、7.1)、3rd-order (clade 1.1.1、2.2.1)、4th-order (clade 2.2.2.1、2.3.2.1、2.3.4.1)、5th-order (clade 2.3.2.1abc) clade が出現している。日本でも H5 亜型 HPAI の発生があったことから、迅速な診断は HPAI を制御する上で特に重要である。

HPAI の診断法としてウイルス分離や RT-PCR が用いられているが、時間や労力、専門知識や技術、コストまたは BSL-3 施設が必要などの問題がある。一方、検体から直接ウイルス抗原を検出する診断法としてウイルス内部蛋白に対するモノクローナル抗体 (mAb) を用いた方法があるが、亜型を決定できないことから H5 亜型ウイルスの HA 蛋白に対する mAb を用いたウイルス抗原検出法が報告されている。しかし、全ての clade と反応できる mAb は報告されていない。

本研究では、H5N1 亜型 HPAIV に対して広い交差反応性を示す H5 mAb の作出とその性状解析を行った。次に、作出された mAb を用いて迅速且つ簡便な抗原検出法を検討した。

第 1 章では、日本で分離された H5 亜型 HPAIV の HA 蛋白に対する mAb (3B5.1、3B5.2、1G5 mAb) の作出に成功した。全 mAb が赤血球凝集抑制活性を示した。3B5.2 と 1G5 mAb は HA 蛋白の conformational epitope、3B5.1 mAb は linear 及び conformational epitope を認識していた。3B5.1 と 3B5.2 mAb が clade 1、2.2、2.3.2.1、2.3.2.1ac、2.3.4 に属するウイルス 6 株と反応したことから、これらが野外で流行している種々の clade ウイルスに反応する可能性が示唆された。

第 2 章では、7 clade に属する H5N1 亜型 HPAIV または Eurasian-及び American-origin の H5 亜型 LPAIV に対する mAb の反応性と HA 蛋白上の epitope 解析を行った。その結果、3B5.1 と 3B5.2 mAb は 7 clade (1、2.2、2.3.2.1、2.3.2.1abc、2.3.4) に属する 26 株全てを認識した。以上、3B5.1 や 3B5.2 mAb によって認識される epitope が H5N1 亜型間で高度に保存されている可能性が示唆された。これらの mAb に対する escape mutant による解析の結果、mAb は HA 蛋白のアミノ酸残基 R162 あるいは K162 を含む epitope を認識していた。次に、R162/K162 が既報の 43 の H5 亜型 clade で保存されているか調べたところ 36 の clade で保存されていた。一方、mAb は R162 を持つ Eurasian-origin LPAIV に反応したが、American-origin LPAIV を認識できなかった。H5N1 HPAIV の HA 蛋白に高度に保存されている epitope (158 PTIKRSYNNTNQE 170) が報告されているが、3B5.1 と 3B5.2 mAb も本 epitope を認識している事が示唆された。

第 3 章では、3B5.1 mAb を用いたラテックス凝集試験の抗原検出法としての有用性を評価した。3B5.1 mAb を結合させたポリスチレンビーズを H5N1 亜型 HPAIV、Eurasian-origin LPAIV 及び HPAIV を鶏糞に加えた検体と反応させたところ凝集

がみられた。本法は、 $10^{8.8}$  EID<sub>50</sub>/ml 以上のウイルスを含む検体しか検出できなかったことから感度は低かったが、現在流行している clade 2.3.2.1ac ウイルスを検出できた。

HPAI の早期封じ込めには発症鳥から H5 抗原を迅速に直接検出する方法が有用であるが、H5 亜型ウイルスの HA 蛋白の変異が著しいことから、異なる epitope を認識する複数の mAb の組み合わせにより全ての clade ウイルスを検出できる迅速診断法の開発が求められている。

以上について、審査委員全員一致で本論文が帯広畜産大学大学院畜産学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

#### 学位論文の基礎となる学術論文

題目 Characterization of cross-clade monoclonal antibodies against H5N1 highly pathogenic avian influenza virus and their application to the antigenic analysis of diverse H5 subtype viruses

著者 Dulyatad Gronsang, Anh N. Bui, Dai Q. Trinh, Vuong N. Bui, Khong V. Nguyen, Minh X. Can, Tsutomu Omatsu, Tetsuya Mizutani, Makoto Nagai, Yukie Katayama, Rapeewan Thampaisarn, Haruko Ogawa, and Kunitoshi Imai.

学術雑誌 Archives of Virology

(巻・号・頁) (162 巻・8 号・2257~2269 頁)

発行年 2017 年 8 月

(別紙2)

最終試験の結果の要旨											
専攻	畜産衛生学専攻（博士後期課程）										
氏名	Dulyatad GRONSANG										
審査委員署名	<table><tr><td>主査</td><td>今井邦俊</td></tr><tr><td>副査</td><td>五十嵐 郁男</td></tr><tr><td>副査</td><td>井上 昇</td></tr><tr><td>副査</td><td>玄 学海</td></tr><tr><td>副査</td><td>小川 晴子</td></tr></table>	主査	今井邦俊	副査	五十嵐 郁男	副査	井上 昇	副査	玄 学海	副査	小川 晴子
主査	今井邦俊										
副査	五十嵐 郁男										
副査	井上 昇										
副査	玄 学海										
副査	小川 晴子										
実施年月日	平成30年1月24日										
試験方法 (該当のものを○で囲むこと)	<input checked="" type="radio"/> 口頭 <input type="radio"/> 筆記										
要旨											
<p>主査および副査の5名は、学位申請者に対し、総合研究棟 IV 号館 S113, S114 において、学位申請者本人に口頭発表による学位論文内容の説明を行わせ、その内容について質疑応答を行った。また、関連する専門知識について口頭により試問を行った。</p> <p>その結果、学位申請者が帯広畜産大学大学院畜産学研究科の論文博士としてふさわしい学力および見識を有すると判断し、博士（畜産衛生学）の学位を授与するに値すると判断した。</p>											