

学位論文題名

Studies on the role of antigenic components
of *Chlamydia psittaci*
in the infection process to host cells

（オウム病クラミジアの感染過程における各種抗原物質の機能解析）

学位論文内容の要旨

クラミジアは偏性細胞内寄生性の病原体であって、感染力をもつ直径0.2～0.4 μ mの基本小体（Elementary body: EB）が感受性細胞に取り込まれた後、細胞質内空胞において非感染性の直径0.6～1.5 μ mの網様体（Reticulate body: RB）に変化する。ここでRB粒子は2分裂増殖を反復した後再びEB粒子に変化し、増殖サイクルを完結する。このために宿主細胞への感染に関してはEB粒子を覆う外膜が主役を演ずると考えられ、これまで外膜構成蛋白の60%を占める分子量約40 kilodaltons (kDa)の主要外膜蛋白（Major outer membrane protein: MOMP）を中心に生化学的研究がなされてきた。しかしクラミジア粒子外膜の抗原物質の分布や機能についてはほとんど知られていない。

本論文ではオウム病クラミジアに対する単クローン性抗体を用い、細胞質内封入体内に形成されるクラミジア粒子の形態変化に伴う外膜の抗原性の変化ならびに感染に関与する抗原（またはエピトープ）の種類と分布を検討し、クラミジアの感染と中和反応の機序について解析した。

第1章では、オウム病クラミジアの特異的な増殖サイクルに伴って発現する粒子形態の変化と各種抗原物質との対応関係について検討した。すなわち感染細胞でのクラミジアの外膜抗原の産生時期を2種類の鳥類

由来株に対する各種単クローン性抗体を用いて間接蛍光抗体法により経時的に測定すると同時に、感染細胞内のクラミジア粒子の増殖サイクルを電子顕微鏡により観察し、RB粒子からEB粒子への変換と両粒子外膜の各種抗原物質との対応関係を検討した。

まず、リポ多糖類 (Lipopolysaccharide: LPS) 上に存在する3種類の属特異的エピトープおよび単クローン性抗体3E9によって認識される90/50kDaの蛋白上のエピトープはすべてRB粒子からEB粒子への増殖サイクルを通じて観察された。一方、供試した他の大部分の単クローン性抗体の認識する外膜蛋白上のエピトープはRB粒子からEB粒子への変化に伴ってエピトープ毎に出現時期が相違した。すなわち感染細胞内におけるオウム病クラミジアの増殖過程において外膜上の抗原物質の各エピトープの構築にはそれぞれ時間的差異のあることが示唆された。

第2章では、EB・RB両粒子の表面に配列するエピトープを抗クラミジアIgG単クローン性抗体を用いて免疫電子顕微鏡法により観察し、超微形態学的にエピトープの分布を検討した。

単クローン性抗体によって検出されたLPS上の3種類のエピトープの内、1種類は精製されたEBとRBの両粒子の表面で検出されたが他の2種類のエピトープはRB粒子表面でのみ認められた。しかし、感染細胞の超薄切片を用いてエピトープの所在を検索したところ、精製EB粒子の表面では観察できなかった2種類のエピトープが細胞質内封入体内ではEB・RB両粒子の膜内に存在することが明かとなった。また、蛋白性抗原に対する単クローン性抗体で検出されたエピトープの大部分はEB・RB両粒子の外膜表面にも認められたが、90/50kDaの蛋白に特異的な単クローン性抗体3E9に対するエピトープはRB粒子表面でのみ観察され、EB粒子では全く認められなかった。すなわち本章で供試されたりポ多糖類と膜蛋白に対する各単クローン性抗体の認識するエピトープは、すべてRB粒子表面に露出しているが、これらの中にはEB粒子への構造変化に伴って粒子

表面から失われるものもあることが判明した。

第3章では、液性免疫によるオウム病クラミジアの感染防御の機序を検討するために、まず単クローン性抗体、補体およびL929細胞を用いて *in vitro* 中和試験を行った。また中和に関与する抗原物質として同定されたMOMPの表面に配列するエピトープの相対的位置関係は単クローン性抗体を用いて競合ELISAにより解析した。

種々の抗原物質に対する11種類の単クローン性抗体について中和活性を測定したところ、抗MOMP単クローン性抗体3種類、抗LPS単クローン性抗体1種類、ならびに外膜に含まれる他の2種類の蛋白分子(90kDaおよび50/90kDa)に反応する単クローン性抗体2種類、計6種類の抗体が中和活性を示した。また6種類の抗体のうち5種類が属特異的あるいは亜種特異的抗体であった。さらに中和活性を示した6種類の単クローン性抗体によって認識されるエピトープはすべてクラミジアのEB粒子表面に露出していることが判明した。

中和活性を有する単クローン性抗体の大部分は補体の添加によって中和活性が増強される補体依存性の抗体であった。しかし、90kDaの蛋白に対する株特異的単クローン性抗体2 B 5は補体なしでも中和活性を示した。さらに単クローン性抗体によるMOMPのエピトープ・マッピングでは、中和関連のエピトープがクラミジア外膜上で非常に近接した位置にまとまって配列していることが判明した。

第3章の結果から、オウム病クラミジアの中和はトラコーマ・クラミジアに比較して補体依存性が強く、外膜に存在する多くの抗原物質上のエピトープも中和に関与していることが示された。

本研究はオウム病クラミジアの細胞内増殖過程におけるクラミジア粒子表面の抗原物質の経時的な産生状況と感染に関与する外膜抗原上のエピトープの分布を示したものである。すなわちMOMP、90kDa蛋白、90/50kDa蛋白及びLPSはいずれもオウム病クラミジアの中和反応に関連し

た標的物質であり、しかもこれらの中和関連エピトープのすべてがクラ
ミジア感染型粒子であるEBの表面に露出していることが確認された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 橋 本 信 夫
副 査 教 授 板 倉 智 敏
副 査 教 授 小 沼 操
副 査 助 教 授 高 島 郁 夫

学位論文題名

Studies on the role of antigenic components of *Chlamydia psittaci* in the infection process to host cells

(オウム病クラミジアの感染過程における各種抗原物質の機能解析)

クラミジアは偏性細胞寄生性で特異な発育環をもつ病原体である。すなわち感染力をもつ基本小体が細胞質内に取り込まれると非感染性の網様体に変換して2分裂増殖を反復し、その後網様体から基本小体に変化して発育環が完結する。しかしこれまで宿主細胞へのクラミジアの吸着と感染にはクラミジア粒子外膜の機能が重視されながらも、クラミジアの形態変化と外膜との関係は長く不明のままであった。

申請者はクラミジア粒子外膜の主構成成分である分子量約40kDの主要外膜蛋白を中心に抗オウム病クラミジア単クローン性抗体を用いて宿主細胞におけるクラミジアの形態変化に伴う外膜の抗原物質の出現・消長と分布を検討し、それらの機能を解析した。本論文はこれらの成果をまとめたもので英文64頁からなり、参考論文4編を付している。

まず、外膜のリボ多糖類と90kD蛋白上のエピトープは基本小体から網様体への変換を通じて存在が観察された。しかし、40kDの主要外膜蛋白の各エピトープの出現時期は基本小体から網様体への変化に伴って様々であった。また、免疫電顕法によるクラミジア粒子外膜の検索では40kD蛋白上の各エピトープはすべて基本小体と網様体の両粒子表面に露出していた。

次に単クローン性抗体を用いて中和試験を行ったところ、オウム病クラミジア外膜のリボ多糖類および90kDと40kDの蛋白はいずれもクラミジアの中和に関連した標的物質であって基本小体粒子の表面に露出していることが立証された。さらに、40kD蛋白上のエピトープは3つのクラスターに区別され、中和関連エピトープはクラスター内でそれぞれ近接して存在することが判明した。

以上のように申請者は宿主細胞におけるオウム病クラミジアの感染過程に関して幾つかの新知見をもたらしておりクラミジアの発育環の研究に貢献するところ大である。

よって審査員一同は安藤秀二氏が博士（獣医学）の学位を受ける資格を有するものと認めた。