

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K05687

研究課題名(和文) アライグマとマンゲースをモデルにした侵略的外来哺乳類根絶のための避妊ワクチン開発

研究課題名(英文) The development of immunocontraceptive vaccines for eradication of invasive alien mammals modeled on the raccoon and mongoose

研究代表者

浅野 玄 (ASANO, Makoto)

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：30377692

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：アライグマとマンゲースの新たな個体数管理手法と期待される経口避妊ワクチン開発のため、「卵周囲蛋白(透明帯ZP)由来のワクチン抗原候補の評価」や「避妊効果判定に要する両種の人工繁殖技術に関する研究」を行った。アライグマZP3由来ワクチン抗原候補の1つは有用性が期待されたが、今後も試験個体数を増やした追加実験が必要である。また、ZP3以外にもZP4の遺伝子解析もを行い、より効果的なワクチン抗原の開発継続が求められる。人工繁殖技術開発に関しては、アライグマ精巣上体精子の採取適期やマンゲースの人工的な排卵誘起法に関する知見が得られた。本研究結果は、種特異的な避妊ワクチン開発において有益なデータとなる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

殺処分を必要としない人道性の高い野生動物個体数管理手法として避妊ワクチンが着目されて久しい。現在一部の小規模な野生動物個体群で利用されているものは注射型であり、個体数が多く広範囲に分布する種や個体群へは適用できない。申請者らは、広く野外適用可能な経口型の避妊ワクチン開発に関する研究を行ってきた。本研究では、ワクチン開発の基礎となるワクチン抗原選定や避妊効果判定に必要な実験技術開発の基礎データが得られた。今後もこれらの成果をもとに実験を継続発展し、世界初の野生動物用経口避妊ワクチン開発の研究を進める必要がある。

研究成果の概要(英文)：To develop the oral immunocontraceptive vaccines as a new population control method for the raccoon and mongoose, we conducted 1)evaluation of vaccine antigen candidates derived from the zona pellucida (ZP3) and 2)research on artificial breeding techniques to evaluate contraceptive efficacy. Although one of the vaccine antigen candidates derived from raccoon ZP3 showed promise for usefulness, additional experiments with larger numbers of test animals are needed in the future. In addition to ZP3, genetic analysis of ZP4 is also required for more effective vaccine antigen development. Regarding the development of artificial breeding techniques for raccoons and mongooses, various data were obtained on the optimal timing of epididymal sperm collection for the raccoon and on artificial ovulation-inducing methods for the mongooses. The results of this study provides useful data for the development of species-specific oral immunocontraceptive vaccines for the raccoon and mongoose.

研究分野：野生動物医学

キーワード：アライグマ マンゲース 繁殖抑制 避妊ワクチン 外来種 個体数管理

1. 研究開始当初の背景

近年、個体数が過剰な野生動物による農林水産業被害や人身被害などの人間との軋轢、過剰な採食圧等による生態系への悪影響などが各地で深刻な問題となっている。これらの問題を緩和・解決するため、過剰な野生動物の効率的な個体数管理の需要は高まっている。野生動物の個体数増加を抑制する管理法には、致死的手法と非致死的手法がある。現在主流となっている致死的手法は、科学的・計画的に実施されることで、比較的短期間に個体数を減少させるもっとも有効な手法であるが、近年では動物福祉の観点などから非致死的手法に対する社会の期待も高い。非致死的手法の1つとして、繁殖抑制によって野生動物の個体数増加を食い止める試みが注目されている。

繁殖抑制によって野生動物の個体数管理を成功させるには、対象種の繁殖生態や生息環境を考慮したワクチン開発が必要となる。国外では、野生下のシカやウマなどの一部の小規模な個体群を対象として避妊ワクチンが利用され、一定の成果を得ているが（Kirkpatrick et al., 2011 など）それらは種特異性が低いワクチン抗原（繁殖関連ホルモンやブタ透明帯 pZP など）を利用している。また、いずれも注射投与と製剤であるために捕獲や投薬銃などによるワクチンの遠隔投与が必要で、個体数が多く広範囲に分布する野生動物種や個体群への適用は現実的ではない。そのため、経口投与可能で、種特異性が高い避妊ワクチンの開発が求められている。

2. 研究の目的

申請者らは、個体数管理が必要な野生動物として、特定外来生物のアライグマとマングースをモデルに、両種の透明帯を抗原とした種特異性の高い経口避妊ワクチン開発を最終目標とした研究を進めてきた。透明帯は卵母細胞を取り囲む複数の蛋白からなるマトリックスである。未解明であった両種の透明帯構成蛋白質の1つである ZP3 の塩基配列を解読し、種特異性や抗原性を有すると期待されるアミノ酸配列部位を基に合成ペプチドを作成してワクチン抗原候補とし、作成したワクチン抗原候補の抗原性や避妊効果の間接的評価をこれまで試みてきた。本研究では、種特異的なワクチン抗原および捕獲不要な経口による免疫誘導技術（デリバリーシステム）の開発を目的とした。



3. 研究の方法

本研究課題では、採択後に COVID-19 の感染拡大により、申請時に計画していた野外調査の実施に大きな支障が発生し、研究計画の変更を余儀なくされたため、研究内容を一部見直して実施した。実施した研究項目と方法の概要は以下のとおりである。

(1) アライグマ透明帯 ZP3 由来のワクチン抗原候補の抗原性に関する研究

申請者らが過去に解明したアライグマ ZP3 塩基配列と報告されている他種の配列を参照し、3種類の避妊ワクチン抗原候補となる合成ペプチド（ペプチド - 、10-13AA）を作成した。学術捕獲で得た生体雌アライグマ3頭を用い、1頭ずつに KLH コンジュゲートされた各ペプチド 300 μ g とアジュバント TiterMax®Gold (TiterMax, USA, Inc.) 300 μ g とを混合してエマルジョン化して2週間おきに4回免疫（皮下投与）し、経時的に初回投与12週間まで抗血清を得た。得られた血清中の各ペプチドに対する抗体の有無を ELISA にて評価した。また、有害鳥獣捕獲された別のアライグマ（n=4）から採取した卵巣を用い、各血清中抗体と透明帯との結合性を免疫組織化学的解析にて評価した。また、ペプチド接種部位の外傷の程度も評価した。

(2) アライグマ透明帯 ZP4 の塩基配列の解読と種特異性に関する研究

複数の避妊ワクチン抗原を開発するため、透明帯を構成する ZP3 以外の蛋白である ZP4 に着目し、未解明であるアライグマ ZP4 の存在の確認と塩基配列解読を試みた。有害鳥獣捕獲後に安楽殺された成獣のアライグマより採取した卵巣から、定法に従って total RNA を抽出して逆転写反応により cDNA を得た。既報の近縁種の ZP4 塩基配列を参照して複数のプライマーを設計して PCR を行い、産物をアガロースゲルで電気泳動して DNA を精製した。精製 DNA をシーケンス解析して塩基配列を解読した。解読した塩基配列を他種と比較し、種特異性やワクチン抗原としての有用性を評価した。



(3) アライグマ精巣上体精子の採取および凍結保存のための適期の検討

避妊ワクチン抗原の繁殖抑制効果の評価は、雄とワクチン抗原により免疫した雌とを飼育下で交配させて検証することが理想であるが、飼育下でのアライグマの自然交配は容易ではない。そ

のため、繁殖抑制効果の検証に必要な人工授精などの技術の確立のため、捕獲個体からも採材が可能な精巣上体精子の採取や凍結保存に関する研究を行なった。すなわち、2-10月に有害鳥獣捕獲後に安楽殺された成獣のアライグマ47頭より得られた精巣から、イヌにおける方法を参考にして精巣上体精子を採取した。繁殖期(2-3月)と非繁殖期(4-10月)における精巣上体精子の濃度および凍結前後の精子性状を検査し、精巣上体精子の採取および凍結保存に適した時期の解明を行った。



アライグマの精巣および精巣上体

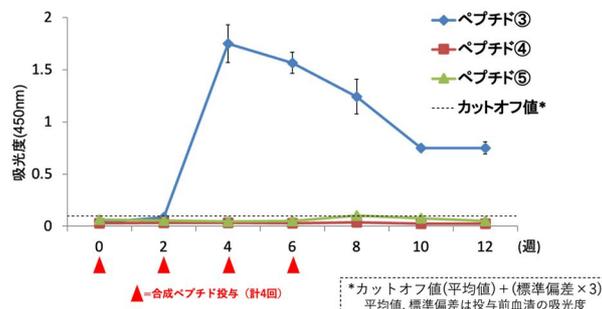
(4) ホルモンを用いたマングースの排卵誘起に関する研究

マングースは、その生態的性質から雌雄同居飼育すること自体が困難で、飼育下での繁殖報告もほとんどない。そのため、繁殖抑制評価に必要な人工授精などで求められる、ホルモンによる排卵誘起法の開発を試みた。すなわち、沖縄県内で2-3月に捕獲されて飼育されていた雌マングース33頭を無作為に6群(各群n=3-5)に分け、妊馬血清性ゴナドトロピン(eCG)を50、100、200IU投与し、48-72時間後にヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG)を50、100、200IU投与した。16-20時間後に安楽殺処分を行って卵巣・子宮を摘出し、卵胞成長の有無の評価とキャピラリーを用いた卵管灌流による卵の回収を試みた。

4. 研究成果

(1) アライグマ透明帯 ZP3 由来のワクチン抗原候補の抗原性に関する研究

各合成ペプチド(ペプチド -)を投与したアライグマの血清中抗体価(ELISA)の推移を図1に示した。ペプチド 投与後血清で抗体価の上昇が確認されたのに対し、ペプチド または 投与後血清では明らかな抗体価上昇は確認されなかった。免疫組織化学的解析では、ペプチド 投与後血清で抗体の透明帯への結合が確認されたが、ペプチド または 投与後血清では透明帯への結合は確認されなかった(図2)。以上の結果より、ペプチド はアライグマに対する免疫原性を有し、かつ産生抗体はアライグマの透明帯に対する結合性を有していると考えられた。ペプチド または では抗体産生は認められず、避妊ワクチン抗原としての有用性について再検討する必要があると考えられた。また、ペプチド投与時に実施した身体検査の結果、接種部位に軽度の腫瘍や自潰等の反応は認められたものの、いずれも一過性で運動機能や一般状態に影響も認められなかったことから、ペプチド投与およびアジュバントの副次的反応は小さいものと考えられた。



1. 各合成ペプチド投与アライグマ血清中抗体価の推移 (ELISA)

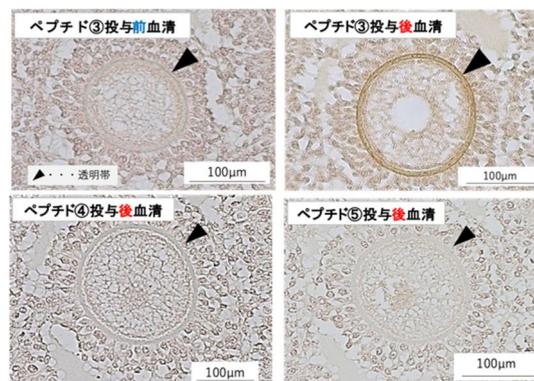


図2. 各合成ペプチド投与アライグマ血清とアライグマ卵巣との免疫組織化学検査結果

本研究では、飼養条件等の制約から各ペプチドにつき1個体ずつしか免疫実験に供することができなかった。そのため、今後は複数個体を用いてワクチン抗原候補の免疫原性や産生抗体の透明帯への結合性の詳細な評価が必要である。また、透明帯への結合が確認されたペプチド においては、人工繁殖試験や受精阻害試験等により免疫雌における繁殖抑制効果の評価を行う必要がある。

(2) アライグマ透明帯 ZP4 の塩基配列の解読と種特異性に関する研究

PCRの結果、アライグマにおいてもZP4が存在することが確認された。これまで、イヌ亜目のうちアライグマ科とクマ科を除く動物ではZP4の存在が報告されていたことから、クマ科を含むイヌ亜目はZP4を保有している可能性が高いものと推察された。また本研究により、アライグマZP4塩基配列も一部(771bp)解読された。解読部分の塩基配列における他種との相同性は、オコジョと92.1%、ケナガイタチ91.9%、イヌ89.6%、キツネ88.6%、ネコ86.4%、ヒト80.9%で、アミノ酸配列の相同性は、オコジョ87.1%、ケナガイタチ85.9%、イヌ85.5%、キツネ83.6%、ネコ80.1%、ヒト74.7%であった(表1)。解読部分は、ZP4配列が報告されている動物のうちでア

ライグマ科と最も近縁な科に属するオコジヨ(1,797bp)の516-1,286塩基に相当すると推察され、オコジヨでは蛋白質に翻訳される153-408番目のコドンに相当する。解読部分の配列のみからは、種特異性の点ではワクチン抗原としての可能性は必ずしも高くはなかった。

今後は、ZP4の全塩基配列とアミノ酸配列の解読を行い、種特異性と抗原性が高いワクチン抗原候補部位の検索が必要である。また、ZP3あるいはZP4単一の遺伝子を由来とするだけでなく、複数のZP遺伝子を組み合わせたワクチン抗原の開発も選択肢となりうるだろう。

表1 アライグマZP4部分配列と他種同部位の塩基配列およびアミノ酸配列の比較(相同性)

	塩基配列の相同性	アミノ酸配列の相同性
オコジヨ	92.1%	87.1%
ケナガイタチ	91.9%	85.9%
イヌ	89.6%	85.5%
キツネ	88.6%	83.6%
ネコ	86.4%	80.1%
ヒト	80.9%	74.7%

(3) アライグマ精巣上体精子の採取および凍結保存のための適期の検討

47頭中40頭から精巣上体精子を採取できた。精子が採取できなかった7個体は全て非繁殖期(4-10月)の捕獲個体であった(表2)。凍結前の精子性状は、精子濃度(図3)、運動率、生存率(図4)、先体保有率のいずれも繁殖期(2-3月)およびその直後にあたる2-4月に最高値となり、その後低下する傾向がみられた。奇形率(図4)は4月に最低値となり、その後上昇する傾向がみられた。凍結後についてもほぼ同様の傾向がみられた(図4)。凍結前後の精子性状の変化率は、運動率、生存率および先体保有率は繁殖期が非繁殖期より有意に高く、繁殖期に捕獲された個体から採取した精巣上体精子がより耐凍性が高いことが示唆された(図5)。

表2 月別の検査個体数と精巣上体精子の有無

捕獲月	個体数	精巣上体精子	
		有	無
繁殖期	2月	6	0
	3月	10	0
	4月	8	0
非繁殖期	5月	5	0
	6月	3	1
	7月	2	0
	8月	2	0
	9月	3	2
	10月	8	4
	計	47	40

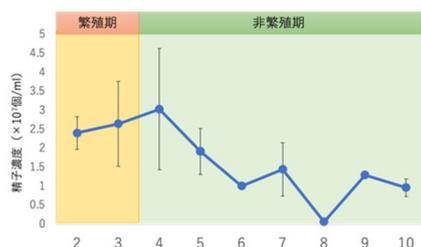


図3. 精子濃度(凍結前)の月別変化

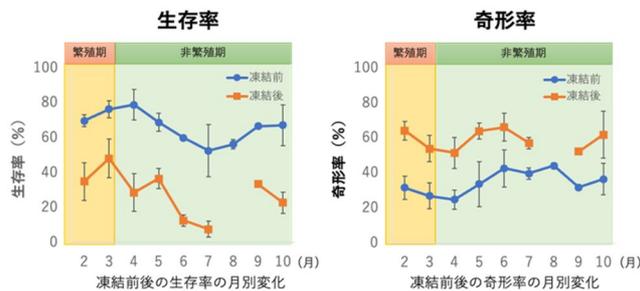


図4. 凍結前後の精子生存率(左)と奇形率(右)の月別変化

これらのことから、アライグマ精巣上体精子の採取および凍結保存は、繁殖期の捕獲個体の精巣を利用することが推奨された。しかし、繁殖期を含む冬期はアライグマの捕獲効率が一般的に低下するため、精巣の確保は必ずしも容易ではないことは考慮しておく必要がある。また、繁殖期に採取した精巣上体精子が実際に人工授精に利用可能かは本研究では試験することができなかった。今後は、繁殖期に採取および凍結保存した精巣上体精子を用い、人工授精法を確立することが課題となる。

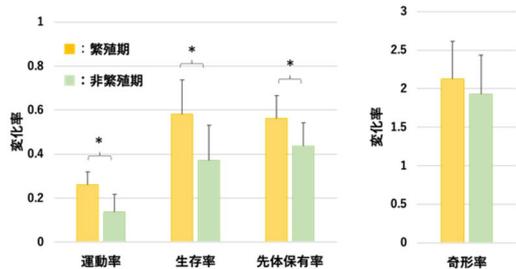


図5. 繁殖期と非繁殖期における凍結前後での精子性状(運動率・生存率・先体保有率・奇形率)の変化率 * : P < 0.05

(4) ホルモンを用いたマンガースの排卵誘起に関する研究

全6群はそれぞれ薬剤(eCGおよびhCG)の投与量(50、100、200IU)と投与間隔(S:short、M:medium、L:long)に従い、50IU(S)群、50IU(L)群、100IU(S)群、100IU(M)群、100IU(L)群、200IU(L)群とし、ホルモンではなくPBSで処置した個体(3月捕獲)を対照群とした(表3)。

実験の結果、中用量のeCG(50または100IU)処置による全群で排卵は確認できなかったが、個体差はあるが全ての処置群で卵胞の顕著な成長が誘起されていた(図6)。一方、eCG 50、100、200IUを投与したのち、長時間(72時間)経過後にhCGを投与した50IU(L)群、100IU(L)群、200IU(L)群では、eCGの投与量によらず顕著な卵胞の発育が観察された。しかし、いずれの個体からも排卵卵子を回収することは

表3 各群の名称とホルモン処置プロトコール

実験群名	eCG (IU)	間隔 (h)	hCG (IU)	間隔 (h)
50 IU (S) 群	50	48	100	16
50 IU (L) 群	50	72	50	20
100 IU (S) 群	100	48	100	16
100 IU (M) 群	100	48	100	20
100 IU (L) 群	100	72	100	20
200 IU (L) 群	200	72	200	20
対照群	0	48	0	20

できなかった。100IU(L)群の1個体で妊娠と妊娠黄体の存在が確認されたが、同時に卵胞の発育が観察された(表4)。

低用量(50IU)以上のeCG処置全群で、個体差はあるものの概して顕著な卵胞の発育が認められたことから、FSH様作用を持つeCGの投与による影響とその有効性が示された。eCG投与48時間後のhCG投与では排卵が認められなかったことから、より長時間(72時間)eCGを作用させたものの結果が改善することはなかった。これはマンガースと比較的近縁と考えられるフェレットにおける排卵誘起プロトコル(Li et al., 2001)を参考にしたものであったが、フェレットとマンガースとでは結果が大きく異なった。マンガースが交尾排卵動物であることを考慮すると、本研究で行ったhCGの作用時間(最大で20時間)では不十分で、より長時間(25-36時間程度)作用させることで排卵誘起が可能かも知れない。長日繁殖動物のマンガースの生態を考慮して、光刺激のコントロールも排卵誘起の成功度に影響することも考えられる。また、本研究では、いくつかの制約により繁殖期から繁殖後期の捕獲個体を用いたが、過排卵誘起実験には繁殖期前に捕獲した個体を用いるのが適当だと思われる。

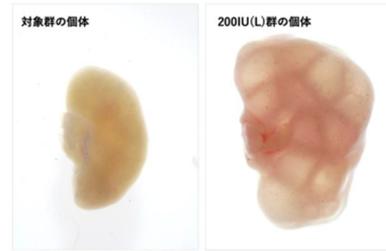


図6. ホルモン処置により過排卵したマンガースの卵胞の例

表4 短時間(SまたはM群;左)および長時間(L群;右)のホルモン処置による過排卵誘起の結果

実験群名	個体番号	卵胞数	排卵数	実験群名	個体番号	卵胞数	排卵数	備考
50 IU (S) 群	50S-①	9	-	50 IU (L) 群	50L-①	17.5	-	
	50S-②	12	-		50L-②	16	-	
	50S-③	6.5	-		50L-③	11.5	-	
	50S-④	5.5	-		50L-④	12.5	-	
	50S-⑤	10	-		50L-⑤	20	-	
100 IU (S) 群	100S-①	14	-	100 IU (L) 群	100L-①	19.5	-	
	100S-②	11	-		100L-②	ND	-	
	100S-③	3	-		100L-③	13	-	
	100S-④	3	-		100L-④	6(黄体:左右各1)	-	妊娠(左:1頭)
	100S-⑤	11.5	-		100L-⑤	18.5	-	
100 IU (M) 群	100M-①	16	-	200 IU (L) 群	200L-①	ND	-	
	100M-②	0	-		200L-②	17.5	-	
	100M-③	1	-		200L-③	9.5	-	
	100M-④	7	-		200L-④	14	-	
	100M-⑤	8.5	-		200L-⑤	18.5	-	
				対照群	CTL-①	0.5	-	
					CTL-②	0	-	
					CTL-③	ND	-	

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 KUNINAGA Naotoshi, ASANO Makoto, MATSUYAMA Ryota, MINEMOTO Takahiro, MORI Takayuki, SUZUKI Masatsugu	4. 巻 81
2. 論文標題 Serological and histological evaluation of species-specific immunocontraceptive vaccine antigens based on zona pellucida 3 in the small Indian mongoose (<i>Herpestes auro punctatus</i>)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 328 ~ 337
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.17-0605	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 浅野玄, 木村聡志, 國永尚稔, 渡辺健太, 小林友理子
2. 発表標題 アライグマ(<i>Procyon lotor</i>)における3種の避妊ワクチン抗原候補の有用性評価
3. 学会等名 日本哺乳類学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 國永尚稔, 浅野玄, 鈴木正嗣
2. 発表標題 フイリマングースの避妊ワクチン抗原候補ペプチドの免疫組織化学的評価および過排卵誘起実験
3. 学会等名 日本哺乳類学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 浅野玄
2. 発表標題 野生動物における動物福祉に関する指針作成の方針
3. 学会等名 日本野生動物医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池田透, 小林あかり, 鈴木崇彬, 浅野玄, 國永尚稔
2. 発表標題 アライグマ地域的根絶に関するフィージビリティスタディ
3. 学会等名 日本哺乳類学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林友理子, 渡辺健太, 鈴木和男, 浅野玄
2. 発表標題 アライグマ(Procyon lotor)精巢上体精子の採取および凍結保存のための適期の検討
3. 学会等名 日本哺乳類学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池田透, 小林あかり, 鈴木高彬, 浅野玄, 國永尚稔
2. 発表標題 実現可能なアライグマ防除戦略構築のための必要条件の検討
3. 学会等名 第66回日本生態学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浅野玄
2. 発表標題 外来哺乳類防除の新規手法開発ー避妊ワクチン開発の現状と課題ー
3. 学会等名 日本哺乳類学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 ASANO Makoto, KIMURA Satoshi
2. 発表標題 Evaluation of zona pellucida antigens as oral contraceptive vaccine for feral raccoons (Procyon lotor) in Japan
3. 学会等名 9th International Conference on Wildlife Fertility Control (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 浅野玄
2. 発表標題 野生動物の個体数管理における避妊ワクチンの可能性
3. 学会等名 第37回日本生殖免疫学会総会・学術集会(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 浅野玄、佐藤広大、木村聡志
2. 発表標題 アライグマ卵透明帯ZP3由来避妊ワクチン抗原に対する雌アライグマの免疫反応
3. 学会等名 日本哺乳類学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 ASANO Makoto
2. 発表標題 Current status and issues of immuno-contraceptive vaccines on management of invasive alien mammals
3. 学会等名 Advances in the Management of Invasive Alien Mammals 2023 (AMIAM2023)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
ニュージーランド	Landcare Research			