

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23510293

研究課題名(和文) 特定外来生物アライグマの排除のための新手法となる避妊ワクチンの開発

研究課題名(英文) Approaches to the development of oral contraceptive vaccines for invasive raccoons (Procyon lotor)

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) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では野外で適応可能な野生アライグマに対する経口の避妊ワクチン開発にむけた基礎研究を行った。特に、ワクチン抗原として卵透明帯蛋白質(ZP3)に着目し、まずアライグマZP3の全遺伝子配列を解明した。次に、解読した塩基配列を元にしてZP3中の精子-卵結合部位の塩基配列を含む合成蛋白2種を作成し、それぞれ2羽のウサギに免疫した。合成蛋白を免疫して得られた1羽のウサギ抗体が、アライグマの卵透明帯に結合することが組織学的に確認された。しかし、同抗体はアライグマ以外の食肉目動物の卵透明帯蛋白にも結合し、種特異的な抗原候補としての課題が残り、さらなる研究が必要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we conducted the fundamental research about immunological fertility-control for introduced raccoons (*Procyon lotor*), particularly the zona pellucida 3 protein (ZP3) based oral vaccines. The full ZP3 gene including sperm combining site was sequenced. The synthetic peptides were designed on the basis of the amino acid sequence of ZP3 sperm combining site. The synthetic peptide vaccine was injected into four rabbits and the serum was obtained that contained the antibody to raccoon ZP3 sperm combining site. To verify the binding of the antibody to ZP, immune-histochemistry was performed using a variety of raccoon, dog, cat, raccoon dog, Japanese badger, Japanese black bear and small Indian mongoose. The antibody obtained from one rabbit was able to bind raccoon ZP. However, the antibody-ZP binding was confirmed also in some other animals. The synthetic peptide vaccine used in this study had some issue as species-specificity, so further research should be needed.

研究分野：動物生命科学

科研費の分科・細目：統合動物科学

キーワード：アライグマ 避妊ワクチン 特定外来生物 外来種 繁殖抑制 個体数管理

1. 研究開始当初の背景

個体数が増加しすぎて農林業や生態系に問題を生じている野生動物では、被害防除対策とともに個体数管理が必要となる。一般に、増加した種の個体数管理は捕獲(駆除)によって行われる。駆除に代わる1手法として、国外では免疫学的に繁殖を抑制する避妊ワクチンの研究が、限られた少数の動物園動物などで試みられている。しかし、それらは基礎研究もしくは臨床試験の段階に留まっている。一方、日本各地の固有生態系への悪影響が顕著になっている外来種では避妊ワクチンに関する研究報告が国内外を通じて見あたらない。本研究にて避妊ワクチンが開発されれば、動物福祉にも配慮した駆除に代わる外来種の画期的な個体数制御のモデル研究として学術的な意義は極めて大きい。

2. 研究の目的

外来種対策は、生物多様性保全のためのわが国の国家的戦略において緊急課題の1つとなっている。現行の外来種対策では、駆除による完全排除が達成されておらず、新技術の開発が必要となっている。本研究の最終目的は、外来種の個体数を制御する新手法としての避妊ワクチンの開発である。本研究は避妊ワクチン実用化のための基礎研究と位置づけ、とくに深刻な影響を与えている特定外来生物のアライグマに着目し、避妊効果のある抗原の選定とその避妊効果の評価を行う。

3. 研究の方法

(1) 避妊効果のある抗原の選定

アライグマの卵巣から RNA を抽出し、PCRにより卵透明帯蛋白(ZP3)の遺伝子配列を解読し、既報の他種との相同性を比較した。また、精子卵結合部位の遺伝子配列から、ワクチンの抗原候補となる配列部位を決定した。

抗原候補となる合成蛋白を作出し、ウサギに免疫して抗血清を作成した。

抗体を含んだウサギ抗血清を用い、アライグマの標的組織(卵透明帯)への結合(認識)を免疫組織化学的解析により評価し、抗原候補を選定した。

(2) 種特異性に関する検証

上記で得られた抗原候補の種特異性を他の動物種(イヌ、ネコ、タヌキ、アナグマ、ツキノワグマ、フィリマンゲース)についても評価した。方法は、標的組織(卵透明帯)への結合(認識)免疫組織化学的解析により行った。

4. 研究成果

(1) 避妊効果のある抗原の選定

アライグマ ZP3 塩基配列、アミノ酸配列および他種との相同性の比較

アライグマ ZP3 塩基配列(1,270bp)を解読した。また、他種との塩基配列の相同性を比較した結果、アライグマ ZP3 塩基配列はネコ

と 82.9%、オコジョと 92.2%、イヌと 86.4%、ヒトと 78.5%、マウスと 72.2%、マンゲースと 85.4%一致していた。さらに、予測したアミノ酸配列(426AA)と他種とのアミノ酸配列の相同性を比較し、精子卵結合部位における他種とのアミノ酸配列の相同性を比較した。その結果、アライグマのアミノ酸配列は、ネコと 78.2%、オコジョと 89.7%、イヌと 80.3%、ヒトと 65.0%、マウスと 63.6%、マンゲースと 82.7%一致していた。また、精子卵結合部位におけるアミノ酸配列は、ネコと 47.8%、オコジョと 91.3%、イヌと 82.6%、ヒトと 34.8%、マウスと 17.4%、マンゲースと 73.9%一致していた。

他種との相同性について、アライグマとネコ、ヒト、マウス、マンゲース間の比較では精子卵結合部位におけるアミノ酸配列の種特異性は完全長アミノ酸配列の種特異性よりも高く、精子卵結合部位のアミノ酸配列は比較的種特異性が高いという過去の報告と矛盾しなかった。しかし、アライグマとオコジョ、イヌ間の比較では精子卵結合部位におけるアミノ酸配列の種特異性は完全長アミノ酸配列の種特異性よりも低かった。さらに、オコジョ、イヌ、マンゲースではエプトープとして機能すると予想される部位においてアライグマと同一のアミノ酸配列(GLPG)を有していた。これらの種はいずれも食肉目であることから、精子卵結合部位のアミノ酸配列を元にした避妊ワクチンの開発にあたっては、対象種と同所性に生息する他の食肉目の種に対して、避妊ワクチン抗原の候補となる蛋白を用いた免疫組織化学的解析による交差反応試験を行い、種特異性を評価することが必須であると考えられた。

上記の結果を参考にして、抗原性などの予測データを基に、アライグマの精子卵結合部位を含む2種類の合成蛋白(:11AA, :18AA)を作成した(SIGMA Aldrich)。ウサギへの免疫には、合成蛋白にキャリアーとして Keyhole limpet hemocyanin(KLH)を結合させたものを用いた。2種類の合成蛋白をそれぞれ2羽のウサギ(-1,2と -1,2)に2週間間隔で4回、その後1週間後に1回投与した。また、各投与前と最終投与3日後に採血を行って抗血清を得た。抗体価の上昇はELISAを用いて評価した。合成蛋白を投与した4羽のウサギいずれの100倍血清においても、投与後4週目、6週目、7週目での抗体価の上昇が認められた。

合成蛋白を投与したウサギ4羽(-1,2 -1,2)の7週目の血清を用いて免疫組織化学的解析を行った結果、合成蛋白を投与したウサギ1羽(-2)の血清を用いた解析で5個体のうち4個体のアライグマの卵巣において透明帯への特異的な抗体の結合が認められた。その他のウサギ血清においてはアライグマ透明帯への特異的な抗体の結合は認められなかった(図1)。この結果、少なくとも合成蛋白はワクチン抗原候補として

有用である可能性が示された。

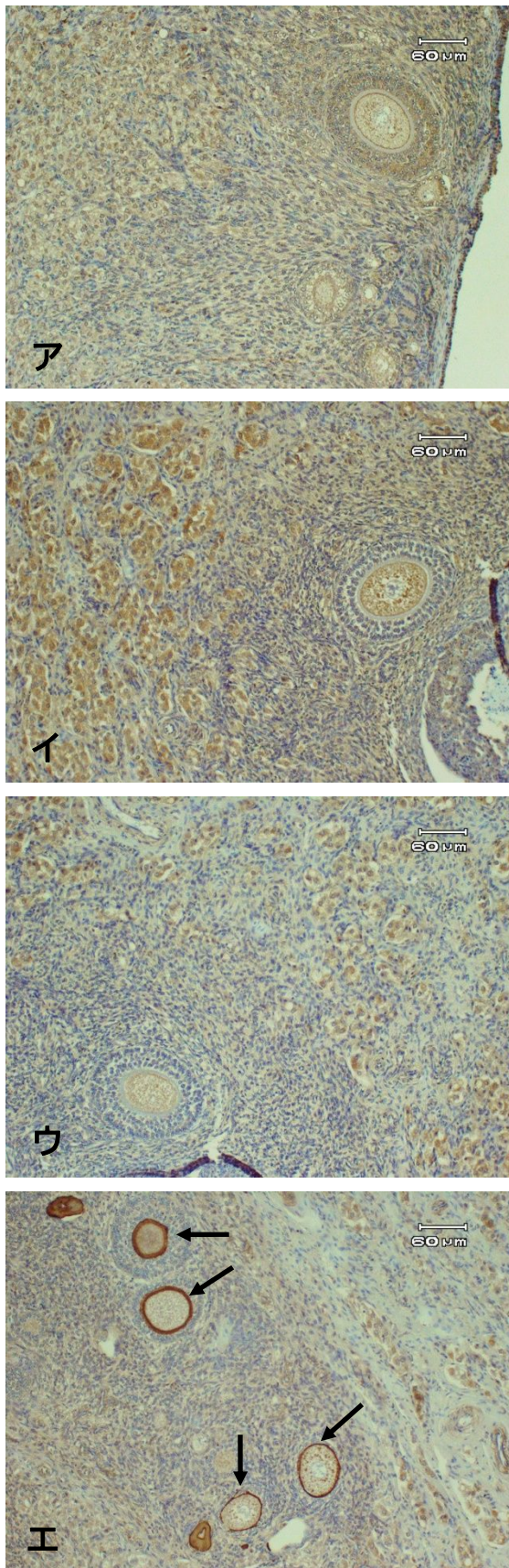


図 1. アライグマの卵巣における免疫組織化学的解析(一次抗体: -1(ア), -2(イ), -1(ウ), -2(エ)血清。アライグマ5個体のうち4個体の卵巣で -2血清を一次抗体と

した場合に抗体の透明帯への特異的な結合が認められた(エ, 矢印)。一方, -1, -2, -1血清を一次抗体とした場合には抗体の透明帯への結合は認められなかった。)

(2) 種特異性に関する検証

合成蛋白を投与したウサギ4羽の7週目のウサギ血清を用い, イヌ(n=2), ネコ(n=1), タヌキ(n=3), アナグマ(n=2), ツキノワグマ(n=2), フイリマングース(n=2)の合計7種の動物の卵巣において免疫組織化学的解析を行った。その結果, 合成蛋白で免疫したウサギ2羽の血清で7種全ての卵巣において透明帯への特異的な抗体の結合は認められなかった。しかし, 合成蛋白で免疫した1羽(-1)のウサギ血清ではツキノワグマ2個体のうち1個体, 同様にで免疫した別のウサギ血清(-2)ではタヌキ3個体全て, マングース2個体全て, ツキノワグマ1個体, イヌ2個体全ての卵巣において透明帯への特異的な抗体の結合が認められた。

(3) 抗原候補に関する考察

-2では合成蛋白に対する抗体産生が誘導されており, 産生された抗体はアライグマの透明帯に特異的に結合したことが示唆された。-1, -2では合成蛋白, -1では合成蛋白に対する抗体産生が誘導されたにもかかわらず, 産生された抗体はアライグマの透明帯に特異的に結合しなかったことが示唆された。-1, -2で産生された抗体が結合しなかったことについて考えられる原因の一つとして, 合成蛋白では実際のタンパク質とその立体構造が異なる場合があり, ELISAにおいて抗体は合成蛋白には結合したが免疫組織化学的解析においてアライグマの透明帯には結合しなかった可能性がある。また, -1では抗体は産生されたが, 免疫組織化学的解析では検出されないほど少量であった可能性がある。しかし, -1血清はツキノワグマの透明帯のみに特異的な反応が認められた。この理由として, 卵巣の保存状態(冷凍)や免疫組織化学的解析における抗原賦活化などの影響によってツキノワグマの抗原性が他種よりも高かった可能性が考えられる。

本研究においてELISAで抗体の上昇が確認されていたが, 必ずしも目的とする合成蛋白に対する抗体の産生は十分に誘導されているとは限らないと考えられた。そのため, 実際に抗体が透明帯に特異的に結合していることを確認できる免疫組織化学的解析の結果を優先するべきである。よって-1のみならず-1, -2についても免疫接種による抗体の産生が十分に誘導できなかった可能性があり, 再度合成蛋白を用いて免疫接種を行い, その有効性を検討するべきであると考えられた。その際, 先行研究などでウサギにおける抗体価の上昇が確認されている抗原を投与する陽性コントロールウサギをおくことにより, 蛋白とアジュバンドの混合など

の手技における問題の有無を確認することで実験の精度を上げることができるだろう。

-2 血清による免疫組織化学的解析の結果, アライグマ5個体のうち4個体の卵巣では抗体の透明帯への特異的な結合が認められたのに対し, 1個体の卵巣では抗体の結合は認められなかった。これら5個体の卵巣は安楽殺処置の直後に採材し, 10%リン酸緩衝ホルマリンにて固定を行っていた。また, 全ての卵巣において様々な発育段階の卵胞および卵が認められ, 個体間での繁殖ステージの差異は認められなかった。明確な組織学差異がなく, 同様の固定法によるサンプルを用いたにもかかわらず, 免疫組織化学的解析の結果が異なった原因の1つとして, ホルマリン固定の影響に対する個体差が考えられる。ホルマリンは形態の保持には優れているが, 抗原性の保持という点からは理想的な固定液とは言えない。ホルマリン固定組織では染色が不可能あるいは困難な抗原があるため, 偽陰性という可能性が残る[57]。今後, 免疫組織化学的解析を行う際には卵巣の凍結切片を用い, 固定液の影響をなくした上で評価が必要であろう。

本研究の結果から, 合成蛋白 はアライグマに対する経口避妊ワクチン抗原として有用であると推察される。しかし, -2血清を用いて他種の卵巣を用いた免疫組織化学的解析を行った結果, タヌキ, マングース, ツキノワグマおよびイヌの卵巣においても透明帯への特異的な抗体の結合が認められた。合成蛋白 に含まれるアミノ酸配列 GLPG はイヌおよびマングースの精子卵結合部位におけるアミノ酸配列にも共通しており, 同部位がエピトープとして機能したことで, これらの動物の透明帯にも特異的な結合が認められたと考えられる。タヌキおよびツキノワグマの精子卵結合部位におけるアミノ酸配列は解読されていないが, これらの種の透明帯にも特異的な結合が認められたことから共通したアミノ酸配列 GLPG を有している可能性がある。したがって, 合成蛋白 を用いた経口避妊ワクチンを野外に散布することによって, 外来種であるアライグマ以外のタヌキ, ツキノワグマ, イヌにも作用する可能性が高い。今後 ZP3 を用いてアライグマのみに作用する経口避妊ワクチンを開発するためには, 合成蛋白 を用いた上でアライグマのみが摂食するよう工夫をしたワクチンを作成するか, アライグマ ZP3 アミノ酸配列における他の箇所を参照した種特異的な合成蛋白を設計するなど, さらに研究が必要と考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Kobayashi K., Asano M., Yanagawa Y., Haneda S. and Matsui M. An attempt to induce antibody production for immunocontraception in the Hokkaido sika

deer (*Cervus nippon yesoensis*) by immunization with a porcine zona pellucida synthetic peptide. *Mammal Study*, 査読有, Vol39, 2014, pp59-64.

〔学会発表〕(計4件)

峰本 隆博, 浅野 玄, 森 孝之, 小林 恒平, 鈴木 正嗣, フイリマングース (*Herpestes auropunctatus*) の個体数抑制手法としての避妊ワクチン開発 (2), 第29回日本霊長類学会・日本哺乳類学会 2013年度合同大会, 2013 (岡山)。

浅野 玄, 峰本 隆博, 小林 恒平, 鈴木 正嗣, アライグマ (*Procyon lotor*) の経口避妊ワクチン開発の試み (1), 第29回日本霊長類学会・日本哺乳類学会 2013年度合同大会, 2013 (岡山)。

Asano, M., Mori, T., Kobayashi, K., Yamazaki, S., Minemoto, T. and Suzuki, M. Approaches to the development of fertility-control vaccines based on zona pellucida antigens for invasive small Indian mongoose (*Herpestes auropunctatus*) in Japan., 7th International Conference on Fertility Control in Wildlife, 2012 (USA)。

森 孝之, 浅野 玄, 小林 恒平, 峰本 隆博, 鈴木 正嗣, フイリマングース (*Herpestes auropunctatus*) の個体数抑制手法としての避妊化ワクチン開発 (1), 日本哺乳類学会 2012年度大会, 2012 (神奈川)。

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

羽田 真悟 (HANEDA, shingo)

帯広畜産大学・畜産学部・助教

研究者番号: 40553441