様　式　C－19、F－19－1、Z－19　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 29 年　 6 月　 7 日現在

機関番号：13701
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2014～2016
課題番号：26430203

研究課題名（和文）侵略的外来種アライグマとマングースの新たな個体数抑制手法となる避妊ワクチン開発

研究課題名（英文）Development of immunocontraceptive vaccines based on zona pellucida antigens for population control of feral raccoons and small Indian mongooses in Japan

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）　　4,000,000円

研究成果の概要（和文）：　本研究の最終目標である野生化アライグマとマングースに対する経口避妊ワクチンの実用化は、本申請研究期間で完了できるものではないが、今回得られた知見の概要は以下の通りである。アライグマでは、卵透明帯蛋白の塩基配列と立体構造を参考に合成した3種類のペプチドに対する抗ウサギ血清において、抗体産生誘導および誘導抗体の種特異性が確認され、これらがワクチンの抗原候補として有力であることが示された。マングースでも同様に、卵透明帯蛋白の塩基配列をもとに合成した2種類のペプチドに対する抗マングース血清において、抗体の持続期間や誘導抗体の生体抗原認識能が確認され、両ペプチドのワクチン抗原としての有用性が示された。

研究成果の概要（英文）：1) Raccoon; Five synthetic peptides were produced with reference to raccoon ZP3. Immune-histochemistry was used to assess antibody binding of sera from rabbits immunized against each of the five peptides to ovaries of raccoon and the other 9 species. Rabbit sera against three out of the five peptides showed a raccoon-specific reaction. These three peptides would be potential antigens for immunocontraceptive vaccines.
2) Mongoose; Two synthetic peptides (A and B) with reference to mongoose ZPC were injected into female mongooses, and blood samples were collected to verify immunogenicity. Mongooses injected with peptide A showed a marked increase in antibody titer, which lasted for 8 months; in contrast, peptide B caused relatively mild increase in antibody titer, lasting for 5 months. Immune-histochemical analysis showed that the antibodies against each peptide could recognize ovary-derived proteins. Peptide A and B would be potential antigens for immunocontraceptive vaccines.

研究分野：獣医学（野生動物医学）

キーワード：外来種　避妊ワクチン　アライグマ　マングース　特定外来生物

１．研究開始当初の背景

(1)　個体数が過剰に増えて農林業や生態系に被害をおよぼす野生動物では、一般に個体数管理のための駆除が行われるが、駆除だけで個体数を大幅に減らすことは困難である。国外では、駆除の代替法として免疫学的に繁殖を抑制する避妊ワクチンの研究が行われてきたが、研究対象は少数種の動物園動物などに限定され、野外に生息している野生動物への適応はほとんどなされていない。

(2)　わが国の生物多様性国家戦略（環境省）では、外来種への対応は重要課題の 1 つで、特に生態系への悪影響が大きいアライグマやマングースなどの特定外来生物の排除の緊急性は高い。しかし、アライグマは罠捕獲だけでは個体数増加や分布拡大を制御できず被害が拡大し続けており、マングースは罠捕獲により低密度化は実現したが根絶には至らずに捕獲の効率性低下や財政不足などの課題が顕在化している。個体数増加を制御するには、雌の繁殖そのものを抑制（避妊化）することが有効であると考えられる。

(3)　上記を踏まえ、申請者らは 2011 年より、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、経口避妊ワクチンに関する研究に初めて着手した。避妊ワクチン抗原の中から、受精の際に重要な役割を果たす卵透明帯抗原に着目し、避妊効果のあるワクチン抗原候補の選定・評価などの基礎的成果を得てきた。これらを本研究でさらに発展させ、アライグマおよびマングースの経口避妊ワクチン開発を進める。

２．研究の目的

(1)　アライグマについては、これまでの研究で 2 種類のワクチン抗原候補の評価を行ったが、種特異性が低いことが示され、新たな抗原の開発が必要となっていた。そこで、本研究では、種特異性の高い新たなワクチン抗原（合成ペプチド）の開発を行うことを目的とした。

(2)　マングースについては、これまでに、実験動物のウサギを用いた研究で種特異性の高い 2 種類の抗原候補が選定されていた。そこで、本研究では、これら 2 種類のワクチン抗原（合成ペプチド A および B）を飼育下のマングースに投与して、ワクチン抗原としての有効性の評価を行うことを目的とした。さらに、避妊ワクチンで免疫されたマングースの避妊効果の検証に必要となる、体外での卵-精子の受精阻害試験法の確立を試みた。

３．研究の方法

(1)　アライグマについては、卵透明帯（ZP3）の遺伝子配列（立体構造）を他種のそれと比較し、種特異性の高い部位を選定し、新たなワクチン抗原候補（合成ペプチド）を作製した。それらの合成ペプチドを各 1 羽のウサギに免疫（4 回皮下投与）して抗血清を作出した。得られた抗血清を一次抗体とし、アライグマおよび国内に生息する 9 種（チョウセンイタチ、テン、アナグマ、タヌキ、イヌ、ネコ、ツキノワグマ、ハクビシン、フイリマングース）のネコ目動物の卵巣を用いた免疫組織化学により、血清中抗体の抗原（卵透明帯）認識能および種特異性を評価した。

(2)　マングースについては、次の 2 つの実験を行った。

①　2 種類のワクチン抗原（合成ペプチド A と B）を雌マングース（各ペプチド 3 頭ずつ）に免疫（4 回皮下投与）した。その後、経時的に採血して抗体価を測定（ELISA 法）し、両ペプチドの免疫原性、抗体価の持続期間、免疫記憶を評価した。また、得られた抗血清を一次抗体とし、マングースの卵巣を用いた免疫組織化学により、血清中抗体の抗原（卵透明帯）認識能を評価した。

②　馬絨毛性性腺刺激ホルモン（eCG）を 10 または 20IU ずつ各 6 頭の雌のマングースに投与し、卵胞の過発育誘起を行った。さらに、eCG 投与 48 時間後にヒト絨毛性ゴナドトロピン（hCG）を 100 単位投与して排卵誘起させた後、各個体を安楽殺して卵子の回収を試みた。

４．研究成果

(1)　アライグマの卵透明帯の立体構造をもとにして 5 つの抗原部位を選定した。その塩基配列をもとにして、5 種類の合成ペプチド（ペプチド①～⑤、10～13AA）をウサギに免疫して得た抗血清では、投与前と比較して抗体価が有意に上昇していた（ELISA 法）（図 1）。

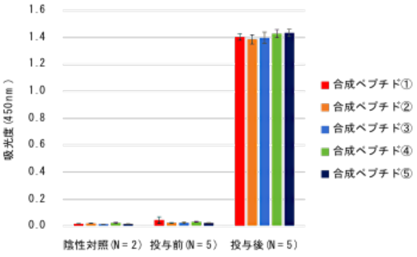

図1. 合成ペプチド①～⑤を投与したウサギの血清中抗体価の変化（ELISA法）。全ての個体で抗体価が上昇していた。

また、免疫組織化学では、合成ペプチド①および②投与ウサギ抗血清はアライグマを含む全ての動物種の卵透明帯との反応が見られなかったのに対し、合成ペプチド③、④および⑤投与ウサギ血清はアライグマ卵透明帯との特異的な反応が見られ、かつその他の動物種の卵透明帯との反応は見られなかった（図 2）。アライグマ以外の動物 9 種は国内に生息する陸生ネコ目 6 科を網羅しており、合成ペプチド③、④および⑤の誘導抗体が、今回供試した動物種以外の国内に生息する野生動物の卵透明帯に結合する可能性は低いと考えられる。以上のことから、合成ペプチド③、④お

よび⑤はアライグマ経口避妊ワクチンの抗原候補として有力であることが示された。今後は、合成ペプチド③、④および⑤をウサギではなく飼育下のアライグマに投与して、ワクチン抗原としての有効性を評価する必要がある。

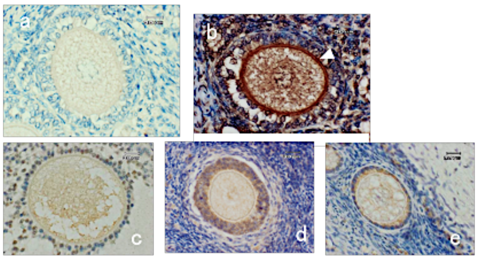

図2. 合成ペプチド①（a；上左）または⑤（b；上右）を投与したウサギの抗血清（一次抗体）とアライグマ卵巣との免疫組織化学の結果。⑤を投与した抗血清ではアライグマ卵透明帯（生体抗原、矢頭）との特異的な反応を認めた。合成ペプチド⑤投与血清は、チョウセンイタチ（c；下左）、タヌキ（d；下中）、ネコ（e；下右）ほか他種の卵透明帯との特異的な反応は認めなかった。

(2)　マングースに関する研究成果

①　合成ペプチド A または B を、それぞれのペプチドにつき 3 頭（それぞれ A 群、B 群とする）の雌マングースに投与したところ、B 群の 1 個体を除く全ての免疫個体で、ペプチド投与回数が増加するごとに対照群と比較して抗体価の有意な上昇が認められ、特に A 群では比較的高度な抗体価の上昇が確認された。両合成ペプチドとも抗原性を有しており、マングースの避妊ワクチン抗原候補として有用であることが示唆された。（図 3）

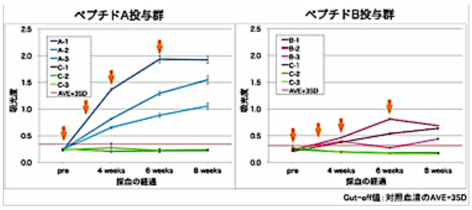

図3. 合成ペプチドA（左）および（右）投与群の抗体価の推移（ELISA法）。2種類の合成ペプチドAまたはBを各3頭の雌マングースに合計4回（免疫時期は矢印で表示）免疫し、経時的に抗体価を測定した。図中のA1-3は合成ペプチドA投与群、同B1-3はB投与群、C1-3は対照群を示す。

そこで、A 群と B 群のうち各 1 頭（A-1 個体および B-2 個体）の飼育を継続して抗体価の推移や免疫記憶の評価を行った。その結果、A-1 個体においては 8 ヶ月、B-2 個体においては約 5 ヶ月に満たない抗体価の持続性を示した。また、初回投与（図 4、Pre①）からおよそ 19 ヶ月後に実施した追加免疫（図 4、Pre②）による抗体価の上昇は、初回の一連 4 回の注射免疫による抗体価の上昇と比較し、A-1 および B-2 個体のいずれにおいても高度な免疫記憶は認められなかった。その後、A-1 個体では追加免疫から 3 ヶ月後には抗体価が低下していた。以上の結果を総合して評価すると、合成ペプチド A は B より免疫効率が高く、ワクチンの抗原としての有用性は高いものと推察された。しかし、抗体価（抗原性）は避妊効果そのものを表現するものではないことから、授精阻害試験などの避妊効果の検証を行う必要がある。また、両合成ペプチドとも、避妊ワクチンの有効性を担保するための高い抗原性と免疫記憶を持たせる改良が必要だと考えられた。

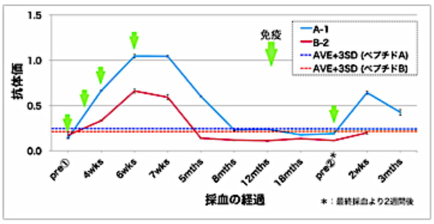

図4. 合成ペプチドA（青）およびB（赤）投与個体の抗体価持続性および免疫記憶の評価（ELISA法）。合成ペプチドAを投与した雌マングースA-1と同Bを投与した雌マングースB-2の抗体価の経時的変化を示す。矢印（緑）は免疫を実施した時期を、点線はCut-off値（対照群血清の平均値＋標準偏差の3倍（AVE+3SD））を示す。一連4回の免疫完了後、抗体価は徐々に減少した。また、初回免疫（Pre①）から約18ヶ月2週間後に実施した追加免疫（Pre②）後、両個体とも高度な免疫記憶は認めず、A-1では3ヶ月後には抗体価が低下した。

合成ペプチド A または B により免疫された雌マングースの血清中抗体の抗原認識能を評価するため、マングース卵巣と合成ペプチド A 投与個体（A-2 個体）血清または B 投与個体（B-1 個体）血清を一次抗体として用いた免疫組織化学を行った結果、合成ペプチド A および B 投与個体血清のいずれも、マングース卵透明帯と産生抗体との特異的な反応が認められ、血清中抗体が生体抗原を認識することが示された（図 5）。このことは、合成ペプチド A および B のワクチン抗原としての有効性を指示する結果の 1 つである。

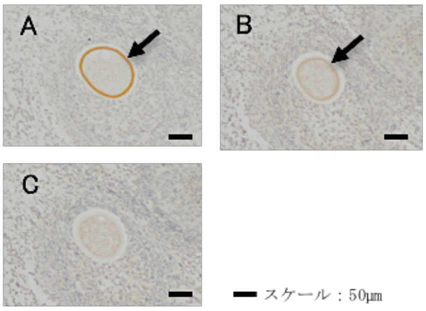

図5. 合成ペプチドA（A；上左）または同B（B；上右）を投与したマングースの抗血清（一次抗体）とマングース卵巣との免疫組織化学の結果。対照血清（C；下）と比較して、いずれの合成ペプチド投与血清も、マングース卵透明帯（生体抗原、矢印）との特異的な反応を認めた。

②　マングースの避妊効果の検証に必要となる、体外での卵-精子の受精阻害試験法の確立のため、卵胞の過発育誘起（10 または 20IU の

eCG 投与）および排卵誘起（100 単位の hCG 投与）を行った。その結果、20IU の eCG 投与により顕著な卵胞の発育が誘起されたが(表１)、100 単位の hCG　投与でも、いずれの個体でも排卵には至らず卵子は回収できなかった。今後は成熟卵子回収のプロトコールの確立が必要である。

表1. 馬絨毛性性腺刺激ホルモン（eCG）によるマングースの過排卵処置の結果。eCGを10または20単位（IU）を各6頭の雌マングースに投与した後の卵胞の発育誘起による成熟卵胞スコアを示した。20IUのeCG投与により顕著な卵胞の発育が誘起された。

	1	2	3	4	5	6
eCG 20IU	+++	+	+	+++	++	+++
eCG 10IU	-	-	+	-	-	+
PBS	-	-	-	-	-	-

成熟卵胞(>1mm) の判定　+：1~4個, ++：5~9個, +++：10個以上

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計１件）

①　淺野　玄、小林　恒平、繁殖抑制とくに避妊ワクチンによる野生動物の個体数管理の展望と課題、獣医畜産新報、査読無、Vol.97、 No.9、2014、pp.667-672
http://iss.ndl.go.jp/books/R000000004-I025781765-00

〔学会発表〕（計７件）

①　淺野　玄、外来種の個体数管理における避妊ワクチンの展望と課題、日本哺乳類学会 2016 年度大会、2016 年９月 26 日、茨城県・つくば市

②　國永　尚稔、淺野　玄、森　直人、鈴木正嗣、フイリマングースの個体数抑制手法としての避妊ワクチン開発(4)、日本哺乳類学会 2016 年度大会、2016 年９月 25 日、茨城県・つくば市

③　淺野　玄、國永　尚稔、峰本　隆博、森孝之、森　直人、鈴木　正嗣、外来哺乳類の個体数制御法としての避妊ワクチンの展望と課題、第 21 回日本野生動物医学会大会、2015 年８月２日、北海道・江別市

④　國永　尚稔、淺野　玄、森　直人、鈴木正嗣、フイリマングース（*Herpestes auropunctatus*）における避妊ワクチン抗原候補ペプチドに対する自己抗体産生能の評価、第 21 回日本野生動物医学会大会、2015 年８月２日、北海道・江別市

⑤　Asano, M. Immunocontraceptive Vaccines for Alien Mongoose and Raccoon,5th International Wildlife Management Congress,2015 年７月 29 日、北海道・札幌市

⑥　Kuninaga, N., Asano, M., Mori, T., Minemoto, T., Suzuki, M. Development of an Immunocontraceptive Vaccine in the Small Indian Mongoose,5th International Wildlife Management Congress,2015 年７月 28 日、北海道・札幌市

⑦　淺野　玄, 峰本　隆博, 森　孝之, 鈴木正嗣、フイリマングースの個体数抑制手法としての避妊ワクチン開発(3)、日本哺乳類学会 2014 年度大会、2014 年９月５日、京都府・京都市 (2014)

〔図書〕（計４件）

①　淺野　玄、文永堂出版、日本野生動物医学会編“コアカリ・野生動物学”、2015、1-14

②　淺野　玄、故 小倉　剛、文永堂出版、日本野生動物医学会編“コアカリ・野生動物学”、2015、152-163

〔その他〕

①　淺野　玄、増えすぎ外来種、中日新聞こどもウィークリー、2016 年 11 月 19 日

６．研究組織

(1)研究代表者

淺野　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

（　　　）

研究者番号：

(3)研究協力者

國永　尚稔（KUNINAGA, Natoshi）