

# 学位論文要約

氏 名 小林 恒平

題 目 透明帯糖蛋白質合成ペプチドを抗原としたエゾシカ避妊ワクチン開発に関する研究

近年北海道において、エゾシカ個体数の増加が社会的問題となっている。エゾシカ問題は農林業被害、生態学的被害、交通事故など多様な側面を持っており、いずれも深刻な状態である。行政は駆除を主体とした対策を講じているが、ハンターの不足やエゾシカの学習による駆除効率の低下などから目標の捕獲頭数に至らず、依然として深刻な被害が持続している。エゾシカは冬季の大量死と、それに見合う旺盛な繁殖力の2者のバランスが保たれる事で個体数が保たれてきた。しかし近年、冬季の餌や越冬地が増え、死亡数が減ったことにより、現在のような爆発的な増加に至っていると考えられる。現在行われている捕獲は環境要因に対する対策であるが、抱えている課題も多い。そこで現行の対策と避妊ワクチンを用いた繁殖抑制による生理的要因対策と合わせる事でより効率的な個体数管理が可能になると考えられる。

避妊ワクチンに関する研究は海外においては多く行われており、精製したブタ透明帯糖タンパク質は多くの動物種において避妊効果が報告されている。しかし、本研究では、個体数管理に向けた野外適用を前提としているため、捕獲して投与するワクチンではなく粘膜投与等で多数の個体に効率的に投与する必要がある、それらの研究をそのまま適用することはできない。さらに多数個体への投与に際して対象としない動物への影響を最小限にしなければならず、種特異性の高い抗原を用いる必要がある。そこで本研究では、抗原の範囲を小さくすることによる種特異性の確保および粘膜投与型ワクチンへの発展性を考慮して合成ペプチドを抗原として、透明帯糖タンパク質の中で高い種特異性を有しかつ避妊効果をもたらす領域を選定し、避妊ワクチンとしての有用性を検討することとした。

第2章では、ブタ透明帯糖蛋白質 ZP1B 細胞エピトープに対するエゾシカにおける抗体産生および抗体の機能を検討した。ブタ透明帯糖蛋白質は ZP1, ZP2, ZP3 に分けられそのうち ZP1 の B 細胞エピトープ配列が明らかになっており、オジロジカにおいてその配列に基づいた合成ペプチドで抗体価の上昇が認められた報告がある。しかしその研究では抗体の結合などその後の解析はしておらず、合成ペプチドの避妊効果は確かめられていない。そこで本研究では、ブタの ZP1B

細胞エピトープ配列に基づく合成ペプチドのエゾシカに対する抗原としての有用性を検討するため、飼育下のエゾシカ 2 頭にアジュバンドと共に投与し、抗体価の推移、得られた抗体の機能検査、交配および妊娠診断を行った。その結果、抗体価の著しい上昇が認められたが、その抗体は、ブタ透明帯には結合したが、エゾシカ透明帯には結合しなかった。また、2 頭の投与個体のうち 1 頭で妊娠が認められた。これらの結果からブタ ZP1B 細胞エピトープとエゾシカのエピトープの配列が異なっていると考えられ、種特異性が示唆された。

第 3 章では、エゾシカ透明帯糖蛋白質 B 細胞エピトープに対する抗体の透明帯への結合とその種特異性について検討した。エゾシカの ZP1 の遺伝子配列の同定を行い、エゾシカにおける ZP1B 細胞エピトープ領域のアミノ酸配列に基づく合成ペプチドを作成した。合成ペプチドをウサギに免疫して作成された抗体を用いて免疫染色および体外受精阻害試験を行い、抗体の機能および種特異性を調べた。その結果、抗体はエゾシカ透明帯を種特異的に認識し、ブタおよびウシの透明帯は認識しなかった。そのことから合成ペプチドを抗原として標的を一つのエピトープにまで絞り込むことで、種特異的に透明帯を認識する抗体が得られることが明らかになった。

第 4 章では、エゾシカに対するエゾシカ透明帯糖蛋白質 B 細胞エピトープ合成ペプチド投与による抗体産生および抗体の機能を検討した。そこで、自己抗原であるエゾシカ ZP1B 細胞エピトープ合成ペプチドを投与することでエゾシカにおいても有効な抗体産生が得られることを確かめるため、飼育下エゾシカを用いた免疫試験および得られた抗体を用いた免疫染色を行った。その結果、抗体はエゾシカ透明帯を種特異的に認識し、ブタおよびウシの透明帯は認識しなかった。そのことから、自己抗原のアミノ酸配列に基づく合成ペプチドであっても、エゾシカにおける抗体産生を誘導し、その抗体がエゾシカ透明帯を種特異的に認識することが明らかになった。

本研究により、エゾシカに特異的な避妊ワクチン抗原の候補が選定された。本研究で用いた方法、すなわち、1) 透明帯糖蛋白質の遺伝子配列を解読し、その中でエピトープとなっている領域の配列を他種動物における相同領域の配列と比較し、種特異的なエピトープ領域を推定する、2) そのエピトープ領域のアミノ酸配列に基づいて合成ペプチドを作成し免疫することで得られた抗体を用いて、対象種や他種の卵巣を用いた免疫染色および体外受精阻害試験を行い、抗体の種特異性および機能を検査する、という抗原領域の選定法は、避妊ワクチン開発が望まれる他の動物種にも応用可能な方法であると考えられる。

# 学 位 論 文 要 約

氏 名 KOBAYASHI, Kohei

題 目 Studies on Development of Immunocontraceptive Vaccine  
using Zona Pellucida Synthetic Peptide Antigen in  
the Hokkaido Sika Deer (*Cervus nippon yesoensis*)  
(透明帯糖蛋白質合成ペプチドを抗原としたエゾシカ  
避妊ワクチン開発に関する研究)

Overabundance of the Hokkaido sika deer (*Cervus nippon yesoensis*) causes many problems, including agricultural, forestry, and ecological damage. The Japanese government has implemented deer management plans focused on shooting, but the efficiency of this method is inadequate and the problem remains serious. The development of new methods for deer population control is imperative. Thus, a form of management that incorporates both shooting and reproductive control should be considered as an effective tool for population control.

Immunocontraception is a method of inhibiting reproduction through the animal's own immune system. In previous studies, anesthesia or immobilization was required when the immunocontraceptive vaccine was administered to wildlife. Since capture and immobilization for administration of immunocontraceptive vaccines in free-ranging populations requires much effort and high cost, the development for an effective method, that allows administration without anesthesia, is necessary for population control of wildlife. When an oral immunocontraceptive vaccine is used, both target species and non-target species can ingest the vaccine and become vaccinated. So, non-target species may be vaccinated with oral vaccine. Therefore, ensuring species specificity of the vaccine to avoid affecting non-target species is a key priority in developing an immunocontraceptive vaccine in free-ranging wildlife.

The synthetic peptide antigen is a candidate of immunocontraceptive antigen, because it is easy to make, and has the potential for oral administration. Antibody production against a synthetic peptide based on the B-cell epitope of porcine zona pellucida (PZP),

which has the potential to inhibit fertilization, has been reported in white-tailed deer. However, its ability to bind to zona pellucida and its species specificity remain unknown. In this study, the potential of synthetic peptide antigen for species specific immuncontraception is tested.

In Chapter 2, vaccine trial with the synthetic peptide based on the amino acid sequence of the B-cell epitope of PZP was conducted to elucidate antibody production against the synthetic peptide in the Hokkaido sika deer and the ability of the antibody to bind to the ZP. Production of antibodies that bind to PZP was observed. However, the antibody produced in the Hokkaido sika deer could bind to porcine ZP but not bind to deer ZP. In addition, the pregnancy of immunized deer was observed. Thus, the present results suggest that the B-cell epitope of ZP that has a role in fertilization is different between porcine and the Hokkaido sika deer. This finding suggests the potential for the development of species specific immunocontraceptive vaccine using the synthetic peptide based on the amino acid sequence of B-cell epitope.

In Chapter 3, the DNA sequence of the Hokkaido sika deer zona pellucida and the difference between porcine and sika deer was revealed. Sequence of deer DNA of the area in which used for synthetic peptide in vaccine trial showed 88% homology to porcine. The synthetic peptide based on amino acid sequence of B-cell epitope of sika deer ZP1 was vaccinated in rabbit. The ability of the antibody to bind zona pellucida and species specificity was examined by immunohistochemistry using porcine, bovine, and deer ovary. Antibody against the synthetic peptide based on the B-cell epitope in sika deer ZP was not able to bind porcine and bovine ZP. In contrast, the antibody was able to bind sika deer ZP. These results suggest the species specificity of the antibody against the synthetic peptide based on the amino acid sequence of the B-cell epitope of ZP. Therefore, the synthetic peptide based on the amino acid sequence of the B-cell epitope which is different between species seems to be a target of species specific immunocontraceptive vaccine.

In Chapter 4, the synthetic peptide based on the amino acid sequence of sika deer ZP B-cell epitope was vaccinated on three captive sika deer to examine the production and function of the antibody against the synthetic peptide based on auto-antigen. In the result, the antibody production was observed. The ability to bind sika deer ZP and

species specificity was same as antibody from rabbit immunized in Chapter 3. Therefore, the synthetic peptide based on the amino acid sequence of sika deer ZP B-cell epitope was evaluated as candidate antigen of sika deer specific immunocontraceptive vaccine. In addition, the finding that the synthetic peptide based on specific auto-antigen is able to induce the production of the antibody which has ability to bind own ZP is showing the method of antigen selection for develop species specific immunocontraceptive vaccine. The function and species specificity of the antibody which is produced in the Hokkaido sika deer is similar to the antibody which is produced in rabbit. Therefore, functioning of the antibody obtained from Hokkaido sika deer could be evaluated using antibody obtained from rabbits immunized with the synthetic peptide.

The present study found that the synthetic peptide based on amino acid sequence of own ZP seems to be the species-specific antigen using for immunocontraception of the Hokkaido sika deer. On the bases of the present results, the following is proposed as an effective method for the generation of a species-specific antigen for the immunocontraception: 1) designing the synthetic peptide based on the amino acids sequence of a target antigen that is critical for fertilization; 2) immunization of rabbits for preliminary evaluation of antibody function and immunohistochemical evaluation of the ability of the antibody to bind to the zona pellucida, using ovaries of the target species.