

氏名(本(国)籍)	小林 恒 平(北海道)		
主指導教員名	帯広畜産大学 准教授 松 井 基 純		
学位の種類	博士(獣医学)		
学位記番号	獣医博甲第414号		
学位授与年月日	平成26年3月13日		
学位授与の要件	学位規則第3条第1項該当		
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻		
研究指導を受けた大学	帯広畜産大学		
学位論文題目	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		
審査委員	主査	帯広畜産大学 教授	宮原 和 郎
	副査	帯広畜産大学 准教授	松 井 基 純
	副査	岩手大学 教授	居在家 義 昭
	副査	東京農工大学 教授	加茂前 秀 夫
	副査	岐阜大学 教授	鈴木 正 嗣

#### 学位論文の内容の要旨

近年、北海道において、エゾシカ個体数の増加による農林業被害などが社会的問題となっている。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ことにより個体数が維持されてきた。しかし近年、冬季の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。この現状に対し、行政は駆除を主体とした対策を講じているが、ハンターの不足などによる駆除効率の低下により十分な捕獲頭数に至っていない。そこで狩猟捕獲だけでなく繁殖抑制対策を併用することでより効率的な個体数管理が可能になると考えられる。繁殖抑制対策としての避妊ワクチンに関する研究は海外において多く行われているが、捕獲して投与することが前提とされている。しかし、実践的応用には、多数の個体に効率的に投与する必要があり、海外での研究をそのまま適用することはできず、新たな視点での避妊ワクチン開発が必要となっている。

第1章では、本研究の意義として、個体数管理に向けた避妊ワクチンの野外適用を前提とした場合に、野外での不特定多数への投与に際して対象外の動物への影響を最小限にするための高い種特異性の実現、さらに、捕獲して投与するワクチンではなく粘膜投与等で多数個体に効率的に投与できるワクチン開発が必要であること示した。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が可能な合成ペプチドを抗原として、エゾシカ避妊ワクチン開発を試みた。

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。オジロジカにおいて、ブタ透明帯糖蛋白質 ZP1 の B 細胞エピトープ配列に基づく合成ペプチド投与により抗体価の上昇が認められた報告がある。そこで本研究では、オジロジカでの研究で用いられたものと同様のブタ透明帯糖蛋白質 ZP1B 細胞エピトープ配列に基づく合成ペプチドを、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。これらのことから、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た。透明帯糖蛋白質 ZP1B 細胞エピトープにおける種特異性の存在が示唆され、避妊ワクチンの種特異性確立に透明帯糖蛋白質のエピトープ配列の考慮が重要なこと示した。

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を検討するために、まず、エゾシカの ZP1 の遺伝子配列の同定を行った結果、ブタとエゾシカの DNA 配列の相同性は高いものの、そのアミノ酸配列に差異がみられることを明らかにした。そこで、エゾシカ 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製しウサギに免疫し、得られた抗体の機能を調べた。その結果、エゾシカ ZP1B 細胞エピトープ合成ペプチドに対する抗体は、エゾシカ透明帯に結合し、ブタおよびウシの透明帯には結合しなかった。こ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を明らかにし、遺伝子配列に基づく避妊ワクチン設計の有効性を示した。

第4章では、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飼育下エゾシカに投与し、抗体産生および抗体の機能を検討した。抗体価の上昇が確認され、得られた抗体を用いた免疫染色の結果、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。このことから、エゾシカにおいて、自己のアミノ酸配列に基づく合成ペプチドが、避妊ワクチンの抗原となりうることを初めて示した。また、第3章でウサギから得られた抗体と本章でのエゾシカで得られた抗体が同様の透明帯認識を示したことから、ウサギへの投与による抗体機能検査が抗原選定のためのスクリーニングとなり得ることを示した。

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。また、本研究で用いた手法、すなわち、透明帯糖蛋白質の遺伝子配列を解読し、種特異的なエピトープ領域を推定し、その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製して免疫することで得られた抗体の種特異性および機能を検査する、という避妊ワクチンのための抗原領域の選定法の有効性が提示された。この選定法を用いることで、野生動物などにおいて、抗原選定のために実際の対象種を数多く用いて試験を行うことが難しい場合に、ウサギなどの実験動物で事前のスクリーニング検査により抗原選定が可能であると考えられる。

## 審査結果の要旨

近年、エゾシカ個体数の増加による農林業被害などが問題となっている。行政は駆除を主体とした対策を講じているが、十分な捕獲頭数に至っていない。そこで狩猟捕獲だけでなく繁殖抑制対策を併用することでより効率的な個体数管理が可能になると考えられ、本研究はそこに注目して避妊ワクチン開発を目指したものである。

第1章では、個体数管理に向けた避妊ワクチンの野外適用を前提とした基礎研究としての本研究の意義として、野外での不特定多数への投与に際して対象外の動物への影響を最小限にするための高い種特異性の実現、さらに、捕獲して投与するワクチンではなく粘膜投与等で多数個体に効率的に投与できるワクチン開発を目指して、合成ペプチドを抗原とした避妊ワクチン開発の必要性がわかりやすく提示されている。

第2章では、ブタ透明帯糖蛋白質 ZP1B 細胞エピトープ配列に基づく合成ペプチドを、飼育下のエゾシカ2頭にアジュバンドと共に投与した結果、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。このことから透明帯糖蛋白質 ZP1B 細胞エピトープにおける種特異性を示唆し、避妊ワクチンの種特異性確立にエピトープ配列の考慮が重要なことを提示した点が評価される。

第3章では、エゾシカの ZP1 の遺伝子配列の同定を行い、その 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ウサギに免疫した。得られた抗体はエゾシカ透明帯に結合し、ブタおよびウシの透明帯には結合しなかった。こ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を明らかにし、遺伝子配列に基づく避妊ワクチン設計の有効性を示した点が評価される。

第4章では、エゾシカ ZP1B 細胞エピトープ合成ペプチドを飼育下エゾシカに投与し、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。このように、自己抗原のアミノ酸配列に基づく合成ペプチドが、避妊ワクチンの抗原となりうることを初めて示した点が評価される。

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ことは大きな進展と評価される。また、透明帯糖蛋白質の遺伝子配列を解読し、種特異的なエピトープ領域を推定し、その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免疫して得られた抗体の種特異性および機能を検査する、という避妊ワクチンのための抗原領域の選定法の有効性を提示したことは、他種動物の避妊ワクチン開発にも応用可能であり、高く評価される。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

## 基礎となる学術論文

1) 題 目 : An attempt to induce antibody production for immunocontraception in the Hokkaido sika deer (*Cervus nippon yezoensis*) by immunization with a porcine zona pellucida synthetic peptide

著 者 名 : Kobayashi, K., Asano, M., Yanagawa, Y., Haneda, S. and Matsui, M.

学術雑誌名 : Mammal Study

巻・号・頁・発行年 : In Press