

フリマングース (*Herpestes auropunctatus*) の
避妊ワクチンに関する研究

2018 年

岐阜大学大学院連合獣医学研究科
(岐阜大学)

國 永 尚 稔

フリマングース (*Herpestes auropunctatus*) の
避妊ワクチンに関する研究

國 永 尚 稔

目次

第1章 緒言	1
1-1. 日本における外来哺乳類にまつわる諸問題と法整備	1
1-2. フイリマングース導入の歴史とその影響	2
1-3. マングースの防除と課題	3
1-4. マングース根絶に向けた免疫学的避妊法の適用	4
1-5. マングースの避妊ワクチン開発におけるこれまでの研究	5
1-6. 本研究の目的と論文構成	5
第2章 マングース生体における合成ペプチドの抗体誘導能の評価	8
2-1. 背景および目的	8
2-2. 材料および方法	9
2-3. 結果	11
2-4. 考察	12
2-5. 小括	15
第3章 産生抗体の自己抗原認識能の解明	18
3-1. 背景および目的	18
3-2. 材料および方法	19
3-3. 結果	21
3-4. 考察	22
3-5. 小括	24

第4章 マングースに対するホルモン処理による過排卵誘起の試み	29
4-1. 背景および目的	29
4-2. 材料および方法	30
4-3. 結果	31
4-4. 考察	32
4-5. 小括	35
第5章 総括	41
第1節 本研究で得られた知見の要約	41
第2節 マングースの避妊ワクチン開発における展望と課題	43
謝辞	49
引用文献	51
英文抄録	61

第 1 章 緒言

1-1. 日本における外来哺乳類にまつわる諸問題と法整備

現在、日本には各分類群の数多の外来種が生息し、在来生態系への影響を筆頭に様々な問題を引き起こしてきた。環境省の『生態系被害防止外来種リスト』(36) および国立環境研究所の『侵入生物データベース』(43) に記載されている外来哺乳類は併せて 50 種以上であり、このうち既に導入され定着が確認されているものは国内・国外由来のものを併せて約 40 種にのぼる。外来種がもたらす影響として、環境省は「生態系」、「人の生命・身体」および「農林水産業」への被害という大きく 3 つに分類しており (37)、特にこれらの影響が深刻あるいは今後拡大すると予想される外来種には「侵略的: Invasive」と冠されることがある。それぞれの被害について簡単に例を挙げると、「生態系への被害」には在来種の捕食や餌資源・生息域の競合、在来近縁種との交雑による遺伝子汚染など、「人の生命・身体への被害」としては人獣共通感染症の伝播や糞尿による住環境の悪化など、また「農林水産業への被害」には農作物の食害による経済損失などがある。

我が国では、1993 年の「生物の多様性に関する条約 (生物多様性条約)」への批准を機に、1995 年に最初の「生物多様性国家戦略」が策定された。その後、2002 年に改定された「新・生物多様性国家戦略」の中で、外来種は生物多様性を脅かす「第 3 の危機」として明記された (31)。現在は生物多様性条約第 10 回締約国会議 (COP10) で採択された「愛知目標」を受けて 2012 年に改定された「生物多様性国家戦略 2012-2020」のもと、積極的な外来種防除の重要性が訴えられている。また、特に侵略的な国外由来の外来種 (特定外来生物: Invasive alien species) の積極的な管理のために「特定外来生物による生態系等に係る被害の防止に関する法律 (外来生物法)」が 2005 年に施行され、現在までに特定外来生物として外来哺乳類は 25 種以上がリストアップされている (33)。ファイリマングース (*Herpestes auropunctatus*) は 2005 年

の外来生物法施行当初から特定外来生物に指定されており、対策が急務となっている種の 1 つである。なお、日本に定着している個体群は当初ジャワマンゲース (*Herpestes javanicus*) であると考えられていたものの、その後種分類が見直されたことを受け、環境省は 2005 年から特定外来生物に指定されていたジャワマンゲースに加え、2013 年よりファイリマンゲースを新たに特定外来生物に指定した (33, 38)。

1-2. ファイリマンゲース導入の歴史とその影響

ファイリマンゲース (以下、マンゲース) は食肉目マンゲース科エジプトマンゲース属に属し、東-西アジア (イラン、イラク、アフガニスタン、パキスタン、インド、ネパール、ブータン、バングラデシュ、ミャンマーおよび海南島を含む中国南部) に広く自然分布する (58)。主にネズミ類の生物的防除として世界各地で導入されてきた歴史を持ち、他国の導入地としては、西インド諸島、ハワイ諸島など 76 もの島嶼地域が含まれ、それぞれの導入地で特に生態系に深刻な影響を及ぼしてきた (6, 25, 26, 56)。

日本においては、1910 年に渡瀬庄三郎博士によって、ガンジス川流域を起源とする 10 数頭のマンゲースがバングラデシュから沖縄本島に導入された。これはハブの咬傷被害やネズミ類による農作物被害の低減を図る生物防除を目的としたものであり、当時としては先進的な手法として注目を集めていたことが過去の記録に残されている (73, 78)。さらに 1979 年には沖縄本島から奄美大島にも導入され、これは世界中で最後の意図的な本種の導入記録となっており (80, 81)、その後、移入経路は不明なもの、鹿児島県本土の一部地域においても定着が確認されている (57, 77)。

沖縄本島および奄美大島では、亜熱帯の適した気候条件と特筆すべき天敵の不在が相まって、定着したマンゲースは様々な影響を伴いながら順当に生息域を拡大していった。マンゲースがもたらしてきた最も重要な影響として在来生態系への影響がある。いずれの島嶼においても、本来の食肉目哺乳類が生息しないという独自の中で生態系

に適応進化してきた生物相は、予期せぬ天敵による捕食から身を守る術は持ち合わせていなかった。代表的な捕食対象にはアマミノクロウサギ (*Pentalagus furnessi*), ケナガネズミ (*Diplothrix legata*), アカヒゲ (*Erithacus komadori*) およびキノボリトカゲ (*Japalura polygonata*) などの固有種が含まれ、これらの種の捕食がマングースの胃内容分析により証明されている (61, 63, 78, 81)。生態系に及ぼす影響は捕食のみならず、ヤンバルクイナ (*Gallirallus okinawae*) など共通する餌資源 (昆虫や小型両生類など) を利用する種との競合についても問題視されてきた (64, 65)。その他にもレプトスピラ (*Leptospira*) 媒介のリスク (23, 27, 48, 51) や養鶏, 農作物の食害 (20, 67) も報告されており, その影響は多岐にわたる。

1-3. マングースの防除と課題

以上のような背景から、沖縄県や鹿児島県では、主に箱わなを用いた積極的な捕獲が実施されてきた。沖縄県においては、特に貴重な在来生態系が保存されている沖縄本島北部のやんばる地域からのマングースの根絶を目標に、外来生物法施行前の2000年から沖縄県が、2001年からは沖縄県と環境省とが協働して防除を実施してきた (35)。対策地以南からのマングースの侵入を妨げるため、フェンスと自然堤防を利用した北上防除柵 (S-T ラインおよび S-F ライン) を対策南端部に築き、新たな個体群の移入を最小限に抑えながら捕獲が行われてきた。鹿児島県においては、1989年の奄美哺乳類研究会による生態系への影響調査を発端に、環境省が主体となって2000年から奄美大島で全島的なマングース駆除事業を開始し、2005年からは奄美大島からのマングースの完全排除を掲げて外来生物法に基づく防除事業を実施してきた (34)。本土の鹿児島市および南さつま市ではモニタリングのために常設された箱わなにより、マングースの散発的な捕獲が報告されている (60)。マングースの捕獲にあたっては、いずれの島嶼地においても「マングースバスターズ」と呼ばれる専門的な捕獲従事者集団が結成され、箱わなを用いた捕獲が中心に行われてきた (60)。

また、残存個体群の探索のため、マングース探索犬、ヘアトラップやセンサーカメラといったモニタリングツールが併用され、効率的な捕獲を支えてきた (17, 54, 59, 60)。

これらの防除策により、いずれの対策地域においてもマングース個体群の超低密度化という目覚ましい成果が達成されている。しかしその一方で、個体群の低密度化に伴って捕獲効率は年々低下し、CPUE (Capture per unit effort; 100 わな日あたりの捕獲数)は、沖縄県やんばる地域において 2003 年の 4.34 を最高に、2016 年には約 0.02 にまで低下してきた (35)。奄美大島のマングース個体群に関しても、2005 年の 4.11 から 2017 年には 0.04 にまで低下している (34)。捕獲効率の低下のほか、在来希少種の混獲や特にわなを忌避するトラップシャイ個体の出現等が相まって、未だマングース個体群の根絶に至った地域はない。

1-4. マングース根絶に向けた免疫学的避妊法の適用

これらの課題を踏まえた上でマングースの根絶を達成するため、わな捕獲と相補的な新たな個体群管理手法の確立が求められる。免疫学的避妊法は生殖関連ホルモンや生殖細胞等を標的抗原とするワクチン (避妊ワクチン) を接種することで対象を免疫学的に不妊化する技術であり、野生動物の繁殖抑制手法としても研究され、世界的に多くの実績が報告されている (16, 41, 42, 45, 48)。一般的にメスの避妊は個体群抑制効率がより高いと考えられることから、ワクチン抗原としてはブタ透明帯 (Porcine Zona Pellucida : PZP) や GnRH のアゴニスト等が広く用いられ、食肉目を含む様々な動物種でその有用性が述べられている。一部は製品化されて (例 : SpayVac™, GonaCon™) 市場で販売されているものもある (25, 46, 49)。これらの抗原は管理対象個体への直接免疫を念頭に、広域の動物種への作用がむしろ望ましい性質として利用されている。一方で、本研究の対象となるマングースにおいては、捕獲に頼らず生体への直接的なアプローチを前提としない管理方法が求められる (14, 29)。特に、マングースと同所的に生息する生物には希少なものが多く、「種特異的な

作用を持つ避妊ワクチンの遠隔投与」が最適な手段と考えられる。

1-5. マングースの避妊ワクチン開発におけるこれまでの研究

種特異的なマングースの避妊ワクチンの抗原候補として、卵透明帯およびその構成タンパク質に着目した。哺乳類の卵透明帯は 3 ないし 4 種の糖タンパク質 (ZP1-4) で構成され、このうち ZP3 は精子との最初の結合から先体反応の誘起を担うレセプターとして機能する (2, 7)。その中でも、精子卵結合部位と呼ばれる領域はアミノ酸配列に特に高い種特異性を持つと報告されており (72), マングースの雌性避妊ワクチンの抗原候補として有力であると考えられた。

これまで、マングースの卵巣より抽出した RNA より、RACE 法を用いてマングース ZP3 およびその精子卵結合部位のアミノ酸配列が解読された (55)。日本に生息する他種の代表的な哺乳類として、オコジョ (*Mustela erminea*), イヌ (*Canis lupus familiaris*), ネコ (*Felis silvestris catus*), ハツカネズミ (*Mus musculus*) およびヒト (*Homo sapiens*) の ZP3 における精子卵結合部位のアミノ酸配列との相同性比較を経て (相同率はそれぞれ, オコジョ : 60.9%, イヌ : 60.9%, ネコ : 47.8%, ハツカネズミ : 17.4% および ヒト : 34.8% であった), 2 種の合成ペプチド (Peptide A および B; 共に 19AA) が作出された (53)。これらの合成ペプチドでそれぞれウサギを免疫し, 得られた血清とイヌおよびネコの卵巣を用いて免疫組織科学的に交差性を確認した。その結果, いずれの合成ペプチドで免疫したウサギの抗血清もマングースの卵透明帯と反応し, イヌおよびネコの卵透明帯とは反応しないことが示された (53)。

1-6. 本研究の目的と論文構成

これまでの予備的な研究により, 作製された合成ペプチドはウサギにおいてマングース卵透明帯を特異的に認識する抗体産生を誘導することが示唆された。精子卵結合部位のアミノ酸配列の相同性が比較的高い種を比較対象とすることで, マングースに特異的な避妊効果をもたらすワクチン抗原候補として一定の有用性が示されたもの

と考えられた。しかし、在来生物への影響を考慮する上では十分な評価とは言えず、比較対象種の拡充が望まれる。特に、マンガースの分布地域に生息する固有のげっ歯類や、その他の在来哺乳類をその対象として追加することが望ましいと考えられる。ただし、避妊効果の真の種特異性に関しては、実際に影響が及ぶ可能性の高い種（もしくはその近縁種）への免疫を通して、避妊効果が否定されて初めて推測されるものであることに留意する必要がある。

また一方で、本研究の本来的な想定は、マンガースへ外因性の合成ペプチドを投与することにより、内因性の透明帯タンパク質を標的とする自己抗体の産生を誘導することである。このような想定を踏まえた次なるステップとして、作製した合成ペプチドをマンガース生体に投与することで、抗体産生が誘導されるか、また産生抗体が自己抗原である透明帯を認識するか否かを検証することを本研究の目的とした。

合成ペプチドのマンガースにおける避妊効果の検証としては、飼育下で免疫したマンガースの繁殖抑制を評価することが適切な手法として想起される。しかしながら、日本においては今日に至るまで飼育下でのマンガースの繁殖の成功記録はなく、むしろ交配を目的とした雌雄の同居において共食いが頻発するなど、現状では自然交配は困難と考えられている（環境省やんばる野生生物保護センター 中田氏 私信）。さらに、野生由来の個体を用いた自然交配は個体間の相性や交配適期の選択などの不確定要素や設備面での課題を孕んでおり、比較検証には不向きとも思われる。そこで、本研究では人工授精によるマンガースの繁殖、あるいは生殖細胞を用いた *in vitro* での精子-卵結合試験を前提とし、合成ペプチドによる繁殖抑制効果判定の基礎となるマンガースの繁殖技術の確立に向けた雌性生殖細胞の効率的回収方法の検討も目的とした。

以上のような目的を踏まえ、本論文を第 1 章から第 5 章に分け、各章の主たる内容を以下に示す。

第 1 章 緒言

日本における外来哺乳類にまつわる問題と法整備について概説し、マンガースの位置付けと及ぼす影響を整理した上で現状の対策と課題を示す。課題解決に向けたマンガースの避妊ワクチン開発に関するこれまでの研究と今後の課題を提示し、本論文の学問的・社会的背景を明らかにする。

第 2 章 マンダース生体における合成ペプチドの抗体誘導能の評価

作製された 2 種の合成ペプチドをマンガース生体に投与して得られた血清を用いて ELISA 解析を実施し、各ペプチドの抗体誘導能およびその持続性に関する評価を行う。

第 3 章 産生抗体の自己抗原認識能の解明

免疫マンガースの血清を用いた免疫組織化学的解析により、産生抗体の抗原認識に関する評価を行うと共に、反応の特異性について明らかにする。

第 4 章 マンダースに対するホルモン処理による過排卵誘起の試み

合成ペプチド投与による避妊効果判定に資する効率的な雌性生殖細胞の採取技術の確立のため、マンガースに対してホルモン処理による過排卵誘起を試み、その効果について考察する。

第 5 章 総括

本研究で明らかとなった知見を総括し、マンガースにおける避妊ワクチン開発研究の展望と課題についての提言を行う。

第 2 章 マングース生体における合成ペプチドの抗体産生誘導能の評価

2-1. 背景および目的

これまでの研究により、マングースの ZP3 精子卵結合部位のアミノ酸配列が解読され、これを基に 2 種の合成ペプチド (Peptide A および B) が避妊ワクチン候補抗原としてデザインされた (55)。これらの合成ペプチドをウサギに投与して得られた血清は免疫組織化学的解析によりマングース卵透明帯に特異的に反応することが示された (53)。他方で、これまでマングース生体に対する合成ペプチドの効果は検証されておらず、免疫により抗体産生が誘導されるか否かは依然として不明であった。2 種の合成ペプチドはいずれもマングース ZP3 由来のアミノ酸配列を模ったものであり、つまりマングースに対しては自己抗原として作用することが期待される。しかし、一般的に自己由来の内因性物質は免疫寛容により抗原として認識され難く、投与方法や容量によっては抗体産生を誘導し得ない可能性も考えられる。

上述の 2 種の合成ペプチドはともに 19 残基のアミノ酸を持ち、エピトープ部位と予測されるアミノ酸配列をそれぞれ 2 部位持つ。そのうちの 1 部位はペプチド間で共通の配列であると考えられる (Sigma-Aldrich Japan 私信)。抗原性はエピトープの抗原提示能力に依存するため、エピトープのアミノ酸配列やペプチドの立体構造の差異によって、2 種の合成ペプチド間で抗原性に差が生じるものと推察される。

以上のような背景を踏まえ、本研究ではマングース生体への合成ペプチド投与 (Peptide A および B) による抗体産生の可否を確認し、抗体が産生される場合には、その強度や持続性に関して Peptide A, B 間で比較を行うことを目的とした。これらは、避妊ワクチンとしての抗原選定に有用な情報となるとともに、マングース生体内での免疫動態に関する一定の示唆を与えるものと期待される。

2-2. 材料および方法

2-2-1. 合成ペプチドの作製

過去の研究でデザインされた 2 種のペプチド (Peptide A および B) を合成し、いずれも抗原性を増強する目的で keyhole limpet hemocyanin (KLH) をキャリアタンパクとして m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide Ester; MBS 法によりコンジュゲートした (Sigma-Aldrich Japan K.K., Tokyo, Japan)。作製後、凍結乾燥された合成ペプチドは使用時まで -30°C で保存し、使用に際しては蒸留水で 2.6–2.8 mg/ml に懸濁した。また、Peptide A および B は高速液体クロマトグラフィーによるペプチド分析において、それぞれ 81.5 %, 78.2 % の純度が保証されている。

2-2-2. 供使動物

マングース防除事業において箱わなにより生体捕獲された 9 個体のメスのマングースを用いた。後述の麻酔時にマングースの頭胴長と体重を計測し (それぞれ 265–290 mm, 275–487 g), 小倉ら (2001) の判別基準に従って 9 個体全てを成獣と判定した (62)。飼育には環境省やんばる野生生物保護センターの敷地内にある、風雨を凌ぐことができる屋外の飼育施設を用いた。マングースをそれぞれ個別に鍵付きのケージ (L 230 mm × H 270 mm × W 600 mm) で飼育し、最低でも 2 週間の順化期間を経て実験に供した。9 個体のマングースを無作為に 3 群 (各群 n = 3) に分け、Peptide A を投与する A 群 (Group A: A-1–3), Peptide B を投与する B 群 (Group B: B-1–3) および対照の C 群 (Group C: C-1–3) とした。

2-2-3. 免疫および採血

2014 年 2 月より、各個体への免疫を開始した。A 群および B 群へは各合成ペプチド 150 $\mu\text{g}/150\text{ ml}$ を等量の不完全アジュバント (TiterMax® Gold, TiterMax USA Inc., Norcross, GA, USA) でエマルジョン化したものを、麻酔下で背部皮下に数箇所

に分けて投与した。C群に関しては、同様にエマルジョン化したリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を投与した。免疫は2週間間隔で4回行い、免疫時(2回目を除く)および最終免疫から1週間後に心採血により各1 mlの血液を採取した。採取した全ての血液は冷蔵庫で一晩静置したのち、遠心(10,000 rpm, 10分)により血清を分離し、血清サンプルは解析時まで-80 °Cで保存した。

抗体価の持続性を確認するため、一部の個体(A-1 および B-2)については継続的に採血し、抗体価をモニタリングした。また、この2個体については抗体価が低下するのを確認したのち、免疫記憶の評価を目的に、上記と同条件で各合成ペプチドの単回の再免疫を実施し、再免疫から2および4週間後(B-2個体は2週間後のみ)に採血した。

麻酔には専用の金属製のケージを用い、ケタミン塩酸塩(0.5 mg/頭; ケタラール® 静注用, 第一三共, 東京) およびメデトミジン塩酸塩(0.07 mg/頭; ドミトール®, 日本全薬工業, 福島)の混合麻酔薬を筋肉内投与することで不動化した。免疫および採血をしたのち、アチパメゾール塩酸塩(0.35 mg/頭; アンチセダン®, 日本全薬工業)の筋肉内投与により覚醒を促進した。最終採血後、全ての個体は The American Veterinary Medical Association のガイドライン (AVMA; 2007) に従い、麻酔下での全採血により安楽殺処分した(3)。

2-2-4. 抗体価の測定

すべての血清は Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) によって抗体価を測定した。炭酸-重炭酸バッファー (C3041, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) で希釈した KLH コンジュゲートされていない Peptide A もしくは B (100 µl; 5 µg/ml) を 96 穴マイクロプレート (#3590, Corning Inc., Corning, NY, USA) に添加し、室温で1時間静置して固層化した。200-300 µl/well の 0.05% Tween®20 (Sigma-Aldrich) 加 PBS (PBS-T) で3回洗浄し、3% スキムミルク加 PBS (200

$\mu\text{l/well}$) を添加して 4 °C で一晩静置して夾雑タンパクをブロッキングした。PBS-T (200–300 $\mu\text{l/well}$) で 3 回洗浄し、1 次抗体として PBS で希釈した各マングース血清 (1:100; 100 $\mu\text{l/well}$) を添加して室温で 1 時間培養した。さらに PBS-T (200–300 $\mu\text{l/well}$) で 3 回洗浄したのち、PBS で希釈した HRP 標識抗フェレット IgG 抗体 (1:2500; 1 mg/ml; Bethyl laboratories Inc., Montgomery, AL, USA) を 100 $\mu\text{l/well}$ 添加し、室温で 1 時間培養した。抗フェレット IgG 抗体のマングース IgG に対する交差性は既に報告がある (28)。PBS-T (200–300 $\mu\text{l/well}$) で 3 回洗浄し、テトラメチルベンジジン (100 $\mu\text{l/well}$; TMB Substrate Regent Set, BD, Franklin Lakes, NJ, USA) を添加して室温で 20 分間培養したのち、 H_2SO_4 (1M) を 50 $\mu\text{l/well}$ 加えて反応停止した。マイクロプレートリーダー (Model 680, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) で吸光度をデュアル測定 (450–655 nm) した。実験手技の妥当性を評価するため、全ての血清は同プレート上で三重試験された。測定値から各血清の平均吸光度 (OD) と標準偏差 (SD) を算出し、全対照血清の平均 OD + 3 SD をカットオフ値と設定した。

2-3. 結果

2-3-1. 合成ペプチドによる抗体産生の誘導

各合成ペプチドに対するマングース A, B 群の血清の抗体価は、免疫前および対照群の血清の抗体価よりも高い値を示した (図 2-1)。多少の個体差はあるものの、特に A 群は顕著な抗体価の上昇を示し、それは概ね免疫依存性であった (図 2-1(a))。4 回の免疫後の抗体価は A-1, A-2, A-3 の順に高く、A-1 については 6 週目、A-2 および A-3 は 7 週目で最も高値を示した。B 群についても、一時的にカットオフ値を下回った一部の血清 (B-3, 6 週目血清) を除いて、概ね免疫依存性の抗体価の上昇が認められたものの、それらは A 群と比較して軽度であった (図 2-1(b))。最終的な抗体価は B-

2, B-1, B-3 の順に高く, B-2 については 6 週目, B-1 および B-3 は 7 週目で最も高値を示した。

2-3-2. 抗体産生能の持続性と免疫記憶の評価

2-3-1. の結果より, Peptide A, B 投与群でそれぞれ最も高い抗体価を示した A-1 および B-2 個体を飼育継続し, 継続的な抗体価のモニタリングを行った (図 2-2)。両個体ともに抗体価は最終免疫時を境に漸減し, それぞれの合成ペプチドに対応するカットオフ値を下回って低値で安定した。A-1 血清の抗体価は投与開始 21 週目から 37 週目に陰性に転じ, B-2 血清は 7 週目から 21 週目の間に陰性に転じた。

上記 2 個体の抗体価の低下が確認できたのち (初回免疫から 83 週目), 同条件で単回の再免疫を実施し, 87 週目 (B-2 については健康状態悪化のため 85 週目) まで採血して抗体価を記録した (図 2-2)。いずれも再免疫に対応して抗体価の上昇が認められたものの, 初回免疫と比較して顕著なものではなかった。A-1 再免疫血清は初回免疫 2 回分と同程度の抗体価は示したものの, B-2 血清においてはカットオフ値を上回る上昇は認められなかった。

2-4. 考察

2-4-1. 合成ペプチドの抗原性について

ELISA の結果から, Peptide A および B に対するマングースの免疫反応が確認された。生体への免疫には抗原性を増強する目的で, 各合成ペプチドに KLH をキャリアコンジュゲートしたものをを用いたが, ELISA の固層化抗原には KLH が付加されていない。よって, 合成ペプチドに特異的な抗原抗体反応であると考えられた。4 回の免疫の結果, 総じて A 群血清の方がより抗体価が高値であった。このことから, Peptide B と比較して Peptide A の方がより抗原性が強く, 抗体産生誘導能が高いこ

とが示唆された。先述の通り、両合成ペプチドは1つの共通のエピトープ部位と1つの異なる配列のエピトープ部位をそれぞれ持つと推測される。つまり、A群が示した高い抗体価は、**Peptide A**のみが持つアミノ酸配列のエピトープ部位の抗原性に由来している可能性が考えられた。

いずれの合成ペプチド投与群とも、ほとんどの個体が免疫回数に応じて抗体価が上昇し、4回目の免疫から1週間後（7週目）に最高値を示した。これは、免疫回数に応じて液性免疫が刺激され、抗体産生が補強されたものと考えられる。一方で、各群で最も高い抗体価を示した個体（A-1 および B-2）に関しては、4回の免疫後にむしろ抗体価のわずかな低下が認められた。これは免疫した抗原の量や回数に対して抗体産生が頭打ちになったことを意味しているかもしれない。いずれにせよ、各投与群ともに3個体と小規模な実験系であり、個体差の影響を排除するには十分とは言えず、個体数の拡充とともに投与量や回数の変更などさらなる検証の余地がある。

2-4-2. 抗体産生の持続性と免疫記憶

A-1, B-2 個体の抗体産生はそれぞれ 21 週、7 週以上持続した。抗体産生の持続性においても **Peptide A** が優位であり、合成ペプチドの抗原性の強度との関連性が示唆された。水晶体重量による年齢査定の研究結果から、マングースの一般的な寿命は 2 才以下であると推定されている (1, 5)。また、マングースは季節繁殖動物であり、日本におけるメスの発情期は主に春 (3-5 月) で、1 才で初回発情を迎えると考えられる (62)。マングースのこれらの繁殖生物学的特性を考えるに、約 5 ヶ月にわたる抗体価の持続期間は繁殖阻害による個体数抑制を達成するのに適当であるかと思われる。しかしながら、本研究結果が示す抗体価の持続性は、あくまで生体への複数回の直接免疫により得られた抗体の産生を確認できる期間であり、本来的な避妊効果の持続期間とは根本的に異なることに留意しなくてはならない。期待される避妊効果の持続期間が抗体価の持続期間よりも短くなることを想定すれば、5 ヶ月という抗体の持

続期間が十分であるかは、実際の避妊効果の検証を行ってから判断する必要がある。

合成ペプチドに対する免疫記憶の評価に関して、本研究からは記憶免疫が誘導されたか否かを判断するのに十分な結果は得られなかった。Peptide A を投与した A-1 個体においては、再免疫により一連の 4 回の初回免疫 2 回分と同程度の抗体価の上昇が認められたが、高度な免疫記憶を期待できるものではなかった。野外におけるマンガスの寿命や蕃殖の季節性を考慮すると、免疫記憶は必須ではないものの、強固な繁殖抑制技術には非常に有用であると考えられる。抗体の持続性に関する考察と併せて考えれば、さらなる抗原性の補強が課題になると推察される。

2-5. 小括

1. 作製した 2 種の合成ペプチドはともにマングースに対して抗原性を有しており、本研究の投与条件では概ね投与回数依存性の抗体産生を誘導した。特に Peptide A は抗原性が強く、投与個体群は総じて高い抗体価を示した。避妊ワクチンの抗原候補の選定に関わる一定の示唆を得た。
2. 抗体価の持続性に関しても Peptide A が優位であり、マングースの発情期間よりも長い持続性を示した。しかし、期待される避妊効果の持続期間はより短くなると推察されるため、十分な持続期間と言えるほどではなかった。また、免疫記憶についても一定の抗体価の上昇は認められたものの、高度な免疫記憶を期待できるものではなかった。
3. 抗体価およびその持続性に関しては実際の避妊効果と併せて評価される必要がある。それを踏まえ、より高度な抗原性を有する合成ペプチドの作製や投与方法の改善に課題が見出された。

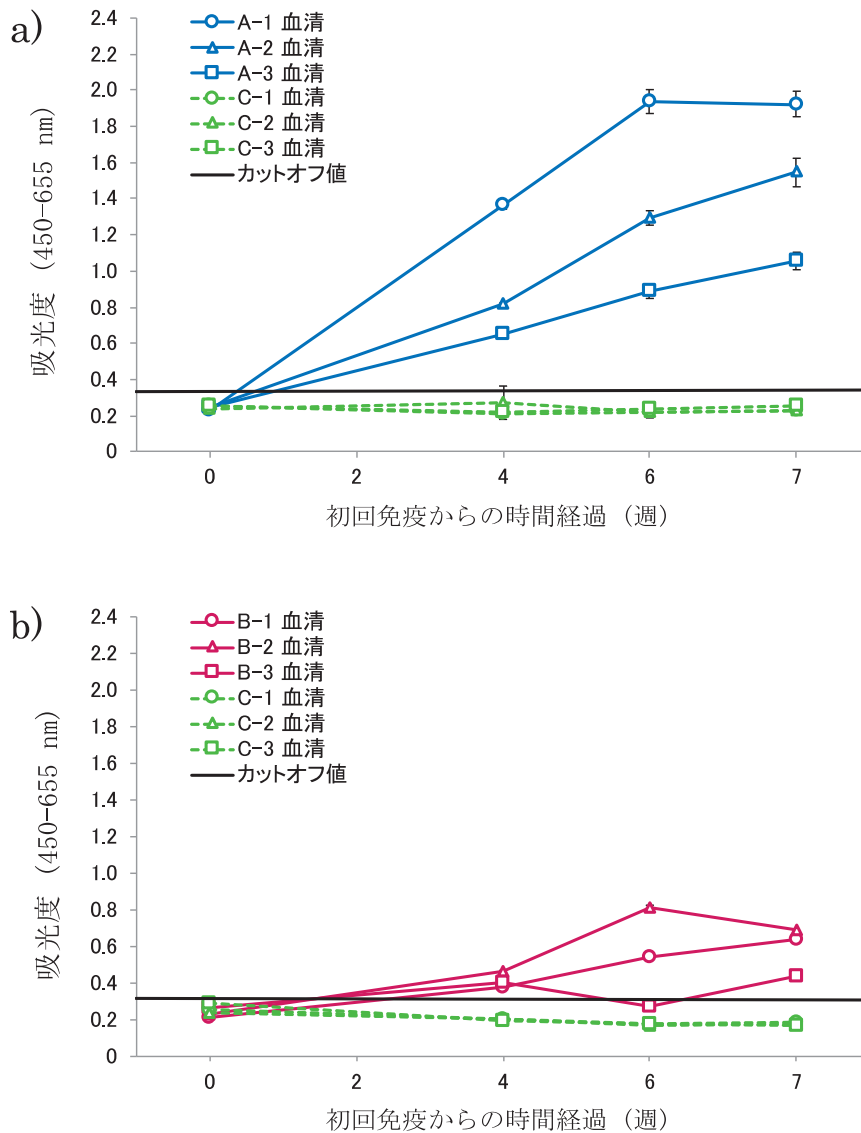


図 2-1. 合成ペプチド A (a) および B (b) による免疫に対する
マングース各個体の血清の抗体価 (吸光度 : 450-655nm)

3 重試験した各血清の平均値および標準誤差をプロットし、合成ペプチド免疫個体血清の抗体価の推移を実線、対照個体血清の抗体価の推移を破線で表した。それぞれの合成ペプチドに対する全対照個体血清の抗体価からカットオフ値 (平均値 + 標準偏差の 3 倍) を算出した。

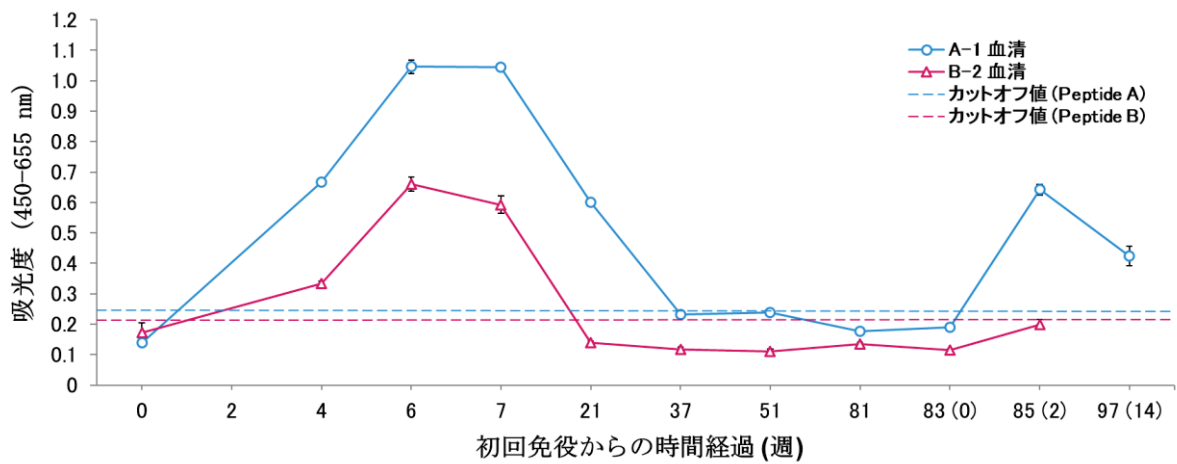


図 2-2. 合成ペプチド A 投与個体(A-1) および B 投与個体 (B-2) 血清の抗体価持続性 (吸光度 : 450-655nm) および再免疫に対する免疫記憶の評価

各免疫個体血清の吸光度の平均値と標準誤差をプロットし、抗体価の推移を表した。それぞれの合成ペプチドに対する全対照個体血清の抗体価からカットオフ値 (平均値 + 標準偏差の 3 倍) を算出した。横軸は初回免疫からの時間経過 (週) を時系列に等間隔で並べたものであり、その間隔の時間スケールは異なる。また、横軸の括弧内の数字は単回の再免疫からの時間経過を表す。

第 3 章 マングースにおける合成ペプチド投与による組織傷害 および産生抗体による自己抗原認識能の評価

3-1. 背景

Peptide A および B はマングース卵透明帯タンパク (ZP3) の精子卵結合部位のアミノ酸配列を基に合成されている。第 2 章の結果より、今回作製した両合成ペプチドがマングースに対して抗体産生を誘導することが示された。特に、産生される抗体は抗原として合成ペプチドそれ自体を認識していることが明らかとなった。一方で、合成ペプチドが産生を誘導した抗体が自己抗原となる卵透明帯タンパクを認識するか否かは依然として不明である。

他種動物を対象とした卵透明帯に対する雌性避妊ワクチンの開発やヒトの免疫性不妊に関する研究において、自己抗体がどのようなプロセスで繁殖抑制をもたらすかは明らかにされていない (30)。しかし、抗体が卵透明帯を標的として認識し繁殖を抑制する主な経路として、①卵巣中の成長過程にある卵胞の傷害、もしくは②卵管あるいは子宮内における排卵卵子の受精阻害が挙げられる (30)。実際、イエネコの繁殖抑制に関する研究などでは卵巣炎の所見が報告されている (12, 46)。一方で、マウスにおける避妊ワクチン開発の例などでは、卵巣の異常を認めずに高い避妊効果が報告されてい (21)。マングースの避妊ワクチンにおいても、最終的に避妊効果が得られた際にはその効果の発生機序が明らかにされるべきである。いずれにせよ、避妊効果の発現には合成ペプチド投与によって産生される抗体が自己抗原となる卵透明帯タンパクを標的として認識することが前提となる。

上記のような背景から、本章では合成ペプチド投与によって産生される抗体が卵巣組織を傷害するか否かを組織学的に評価することを目的とした。また、血清中抗体の免疫組織学化学的解析により、自己抗原認識能を検証することを目的とした。

3-2. 材料および方法

3-2-1. 卵巣の採材および組織切片の作製

合成ペプチド投与による卵巣の組織傷害についての評価を行う目的で、2-2-3. の免疫個体の安楽殺処分時に解剖して卵巣を採材した。採取した卵巣は個体ごとに左右同一の遠心チューブに入れ、十分量の 4 %緩衝ホルマリンにより使用時まで室温で固定した。また、免疫組織学的解析に用いる卵巣は、同防除事業内で捕獲された成獣メスから採材し、他の標本と同様に固定した。

いずれの標本もホルマリンによる固定後、流水でしばらく水洗したのち、自動包埋機を用いてパラフィン浸透させた。パラフィンブロック作製機を用いてパラフィンブロックを作製し、滑走式薄切機を用いてパラフィンブロックから 4 μm の組織切片を切り出した。免疫個体ごとに血清中抗体の抗原抗体反応を比較するため、免疫組織化学的解析に用いた卵巣からは連続切片（各 4 μm ）を作製した。

3-2-2. 卵巣における組織傷害の評価（HE 染色）

組織傷害の評価には免疫個体（n = 4）および対照個体（n = 3）の卵巣を用いた。抗体価の持続性試験に用いた個体（A-1 および B-2）の卵巣は、他の免疫個体 4 頭とは免疫スケジュールに相違があり比較が困難なため本評価対象から除外した。定法に従い、キシレン・アルコール系列により脱パラフィンしたのち、10 分間流水水洗し、マイヤーのヘマトキシリン（武藤化学、東京）に 1 分間浸漬して核染色した。10 分間の流水水洗によって発色した標本をエオジン（サクラファインテックジャパン、東京）で後染色し、アルコール・キシレン系列で脱水および透徹した。組織切片の観察には光学顕微鏡（AX70, OLYMPUS, 東京）を用い、顕微鏡用カメラ（DP-20, OLYMPUS）で写真撮影した。炎症性細胞の浸潤と壊死の所見を元に卵巣炎の有無を評価した。

3-2-3. 免疫個体血清を用いた免疫組織化学的解析

合成ペプチドを免疫していない成獣メス個体から摘出した卵巣のパラフィンブロックより連続切片を作製し、定法に従って脱パラフィンしたのち水洗した。抗原賦活化のため、クエン酸バッファー (pH 5.4) に浸漬し、ポット (90 °C) で 40 分間加温したのち室温で 20 分間冷却した。PBS で 3 回 (各 5 分間) 洗浄し (以降同条件で洗浄), 内因性ペルオキシダーゼの失活を目的に 3 % H₂O₂ に浸漬して室温にて 15 分間静置した。洗浄後, 非特異反応のブロッキングのため 3 % BSA (A3590, Sigma-Aldrich Co.) 加 PBS を添加し (100 μl/切片), 湿潤箱中にて 4 °C で一晩静置した。引き続き, 3 % BSA 加 PBS で 50 倍希釈した各免疫個体血清 (7 週目) を一次抗体として添加し (100 μl/切片), 室温にて 1 時間静置した。さらに洗浄後, HRP 標識プロテイン A (1:1,000, 100 μl/切片; ab7456, Abcam, Cambridge, UK) を二次抗体として添加し, 室温にて 1 時間静置した。また, アビジン-ビオチン反応を増強する目的でストレプトアビジン (1:200, 100 μl/切片; Extravidin®, Sigma-Aldrich Co.) を添加し, 室温にて 1 時間静置した。洗浄ののち, 3,3'-ジアミノベンジジン (DAB; Dako, Santa Clara, CA, USA) を滴下して 1 分間発色し, 水道水で反応停止した。最後に, ヘマトキシリンで対比染色したのち, 脱水・透徹系を経て標本化した。

3-2-4. 抗原抗体反応の特異性に関する評価

免疫組織化学的解析における抗原抗体反応が, 合成ペプチドによって産生誘導された抗体によるものか否かを検証するため, 被験血清と合成ペプチドを共培養して吸収試験を実施した。3-2-3. の結果, 各群で特に反応の強かった個体の血清を被験血清とし, 同容量の合成ペプチド (それぞれ免疫に用いたものと同型, KLH コンジュゲートしていないもの) を加えて, 血清の最終希釈倍率が 50 倍になるように 3 % BSA 加 PBS で調整した。合成ペプチドを添加していない陽性コントロール血清 (1:50) とともに, 室温で 1 時間静置して共培養して抗体を吸収した。こうして作製した吸収血

清を一次抗体として、3-2-3. と同条件で免疫組織化学的解析を行った。

3-3. 結果

3-3-1. 合成ペプチドによる卵巣組織の傷害に関する評価

合成ペプチドを投与した A 群 (A-2, A-3), B 群 (B-1, B-3) およびコントロール群 (C-1, C-2, C-3) の卵巣組織の HE 染色の結果を図 3-1 に示す。いずれの免疫個体の卵巣も、対照個体のものと比較して異常は認められなかった。特に、炎症性細胞の浸潤や組織の変性・壊死など卵巣炎を示唆する所見は得られなかった。

3-3-2. 免疫個体の血清中抗体による卵透明帯タンパクへの反応

対照個体血清と比較して、各合成ペプチド投与により産生された抗体を含む血清のほとんどが透明帯に特異的な反応を示した (図 3-2)。A 群 A-2 個体血清は全サンプル中で最も高度な陽性反応を示し (図 3-2b), A-1 および A-3 個体血清は中等度の陽性像を呈した (図 3-2a, c)。一方, Peptide B で免疫したマングース B 群は陰性 (B-3) から軽度陽性 (B-1, 2) を示した (図 3-2d-f)。陽性反応は透明帯を形成している全ステージの卵胞 (すなわち二次卵胞, 胞状卵胞および閉鎖卵胞) で認められた (図 3-3)。

3-3-3. 吸収試験による抗原抗体反応の特異性評価

産生抗体による抗原抗体反応の特異性を評価する目的で、合成ペプチドで吸収処理をした血清を用いて免疫組織化学的解析を行った。3-3-2. の結果を受け、各群で比較的強い陽性反応を示した A-2 および B-1 血清を被験血清とした。その結果、いずれの血清の陽性反応も消失もしくは減弱した (図 3-4)。A-2 血清については、卵胞および周辺組織の非特異反応に変化はなく、透明帯に特異的な陽性反応が消失した (図

3-4a, b)。B-1 血清に関しては、陽性反応の完全な消失は認められなかったものの、吸収していない血清と比較して明らかな反応の減弱を示した (図 3-4b, c)。

3-4. 考察

3-4-1. 合成ペプチド投与による卵巣傷害の可能性

合成ペプチドを投与したいずれの個体についても、卵巣において炎症性細胞の浸潤など組織傷害を示唆する所見は認められなかった。ELISA や免疫染色による評価などから、透明帯タンパクを標的とする抗体の産生が確認されており、今回作製した合成ペプチドは卵巣を傷害しない可能性が考えられる。一方で、卵巣傷害に至る抗体量の指標がなく、対象抗体が十分産生されていなかった可能性は否めない。先述の通り卵巣炎と避妊効果の相関は他種動物においても未だ不明ではあるが (12, 21, 46)、副作用の不在は動物福祉の観点において非常に重要である (18, 39, 68)。管理対象が外来種であるとは言え、処置に伴う苦痛は最小限に抑えられるべきである (67)。

3-4-2. 産生抗体による抗原認識とその特異性

免疫組織化学的解析により、合成ペプチド投与により産生された抗体がマングース生体由来の卵透明帯に反応することが示され、それは透明帯を形成している全てのステージの卵胞で確認された。さらに、合成ペプチドを用いた吸収試験の結果より、これらの抗原抗体反応は特異的な反応であることが示された。これらの結果は、抗体の標的となった合成ペプチドのエピトープ部位が透明帯においても形成初期から発現していること、外因性のペプチド抗原が内因性の透明帯タンパクへの反応を刺激したことを示唆していると考えられる。本実験において、吸収試験の陽性対照には無処理の希釈血清を用いて同条件で室温に静置しているが、理想的には免疫効果と無関係なペプチドと共培養されるべきである。しかし、全ての血清は 3% BSA 加 PBS で希釈

しているため、より高濃度の夾雑タンパクが含まれていると考えられる。それゆえ、ペプチド溶液が非特異的に抗原抗体反応を阻害した可能性はおおよそ考えにくいと思われる。

免疫染色において、今回の実験のように同じ動物種由来の組織と一次抗体の組み合わせは一般的に避けるべきである。それは、一次抗体を特異的に認識する二次抗体を用いる場合、内因性の免疫グロブリンにも同様に結合し、非特異反応を生む原因になるためである (19)。しかし、今回二次抗体として用いたプロテイン A はそもそも非特異的に IgG に結合する性質を持つものであり、加えて血清や二次抗体の希釈濃度や培養条件を適切に調節したことで、非特異反応は最低限に抑えた上で特異的応答を強調することができた。このことから、一次抗体として用いた免疫血清はマングース透明帯に高い特異性を有していることが伺える。抗フェレット IgG 抗体については、石橋ら (2008) によってマングース IgG への ELISA における交差性が既に報告されている (28)。第 2 章の結果では同様に交差性を示し、その有用性が再現されたが、免疫染色においては様々な条件下で試験されたものの、マングース IgG への結合が認められなかった。そのため代替的にプロテイン A を用いたが、その原因を特定するには至らなかった。

また、合成ペプチド免疫個体の卵巣に対し、Protein A を用いた免疫組織化学的解析 (直接法) も試みた。しかし、いかなる反応条件下においても卵透明帯における抗原抗体反応は検出されず、免疫個体の生体内における自己抗原認識を証明することはできなかった。この原因として、組織傷害の有無に関する結果を踏まえ、上記の手法で検出可能なほど十分な抗体が産生あるいは結合していない可能性や、卵巣内においてはそもそも抗原認識されていない可能性などが考えられた。直接法による免疫組織化学的解析は、間接法と比較して検出感度が低いことから、生体内における自己抗原認識にはより高感度な実験系の確立が必要と考えられた。

3-5. 小括

1. 合成ペプチドを投与した個体の卵巣から、組織傷害を示唆する所見は得られなかった。現段階では、今回作製した合成ペプチドが組織傷害をもたらさない可能性もしくは十分な抗体が産生されていない可能性いずれもが想定される。一方で、副作用の不在は動物福祉上重要である。
2. 作製した 2 種の合成ペプチドの投与によって産生された抗体は、マングースの卵透明帯を認識し結合することが示された。その反応は Peptide A を投与した A 群でより高度であり、透明帯を形成する全ステージの卵胞で反応が認められた。
3. 吸収試験の結果より、今回確認された抗原抗体反応は合成ペプチドおよびマングース卵透明帯に特異的であった。つまり、外因性の合成ペプチドの投与により、内因性の卵透明帯を特異的に標的とする抗体が産生されたことが示唆された。
4. 非特異的に IgG を認識するプロテイン A を用いた免疫染色において、マングース卵透明帯への反応は明らかに強調されたことから、一次抗体として用いた免疫血清は高い特異性を有していると推察された。

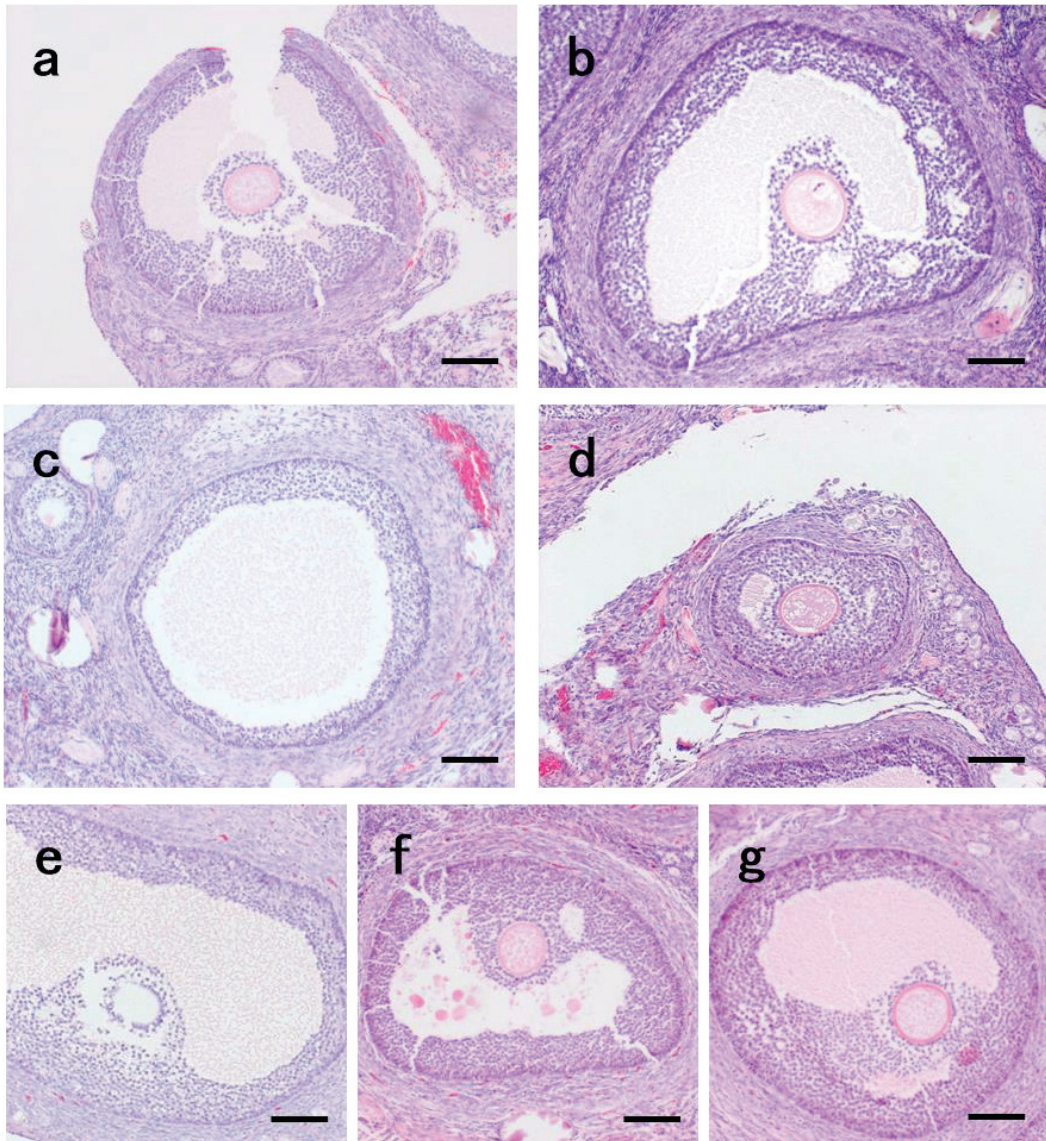


図 3-1. 免疫個体および対称個体の卵巣切片の組織学的評価 (HE 染色)

一部の個体 (A-1 および B-2) を除き, 安楽殺処分後に卵巣の組織学的に組織障害の評価を行った。a : A-2 個体, b : A-3 個体, c : B-1 個体, d : B-3 個体, e : C-1 個体 (対照), f : C-2 個体 (対照), g : C-3 個体 (対照)。Bar : 100 μ m。

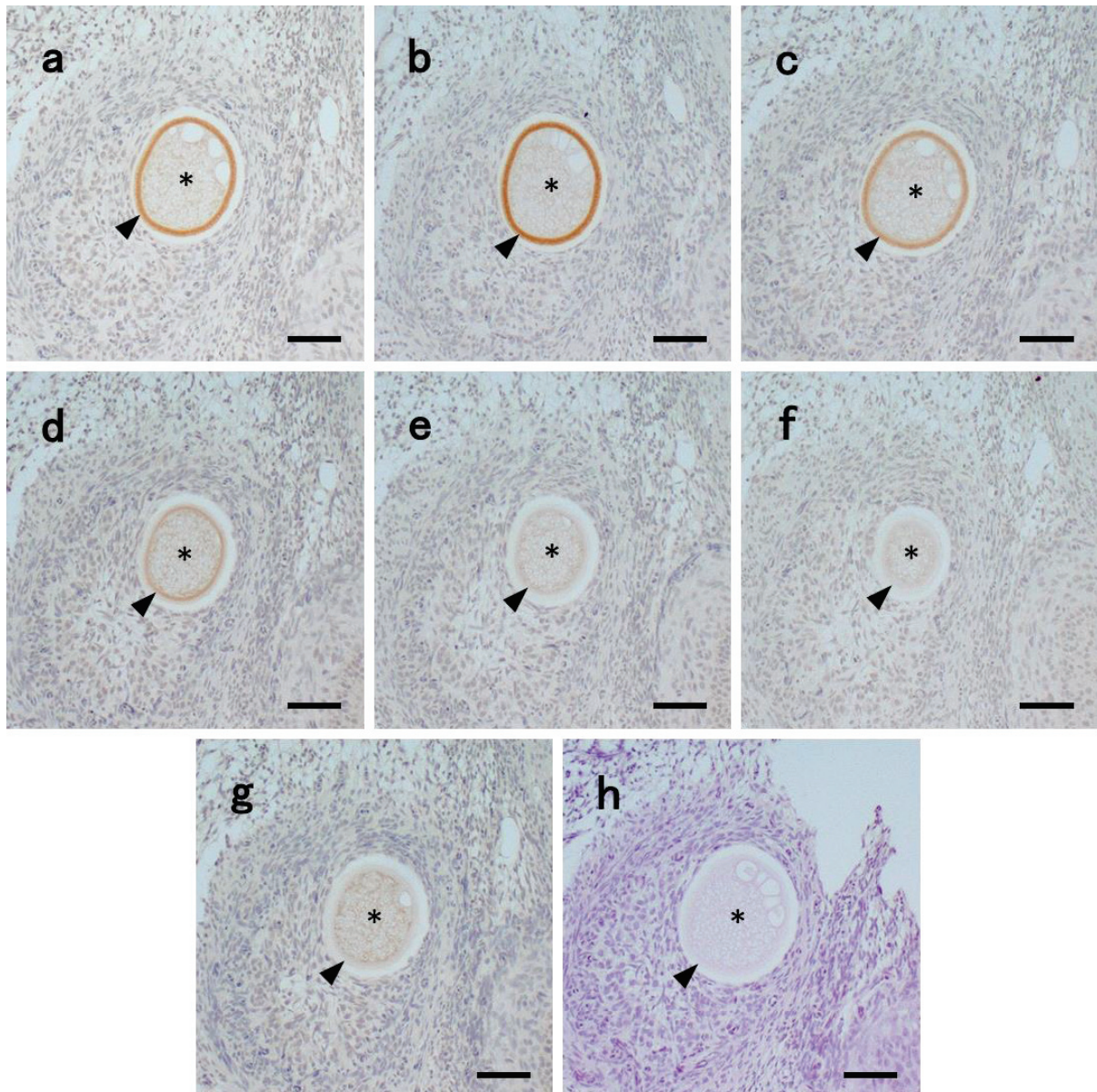


図 3-2. マングース卵巣に対する各免疫個体血清の免疫反応性

非免疫マングースの卵巣組織切片（連続切片，4 μm ）に対し，各免疫個体血清を用いて免疫染色を行った。それぞれ，a：A-1 個体，b：A-2 個体，c：A-3 個体，d：B-1 個体，e：B-2 個体，f：C-3 個体，g：C-1 個体（対照）の血清を用いた免疫染色，および h：HE 染色の結果を示す。◄：卵透明帯，Bar：50 μm ，*：卵子。

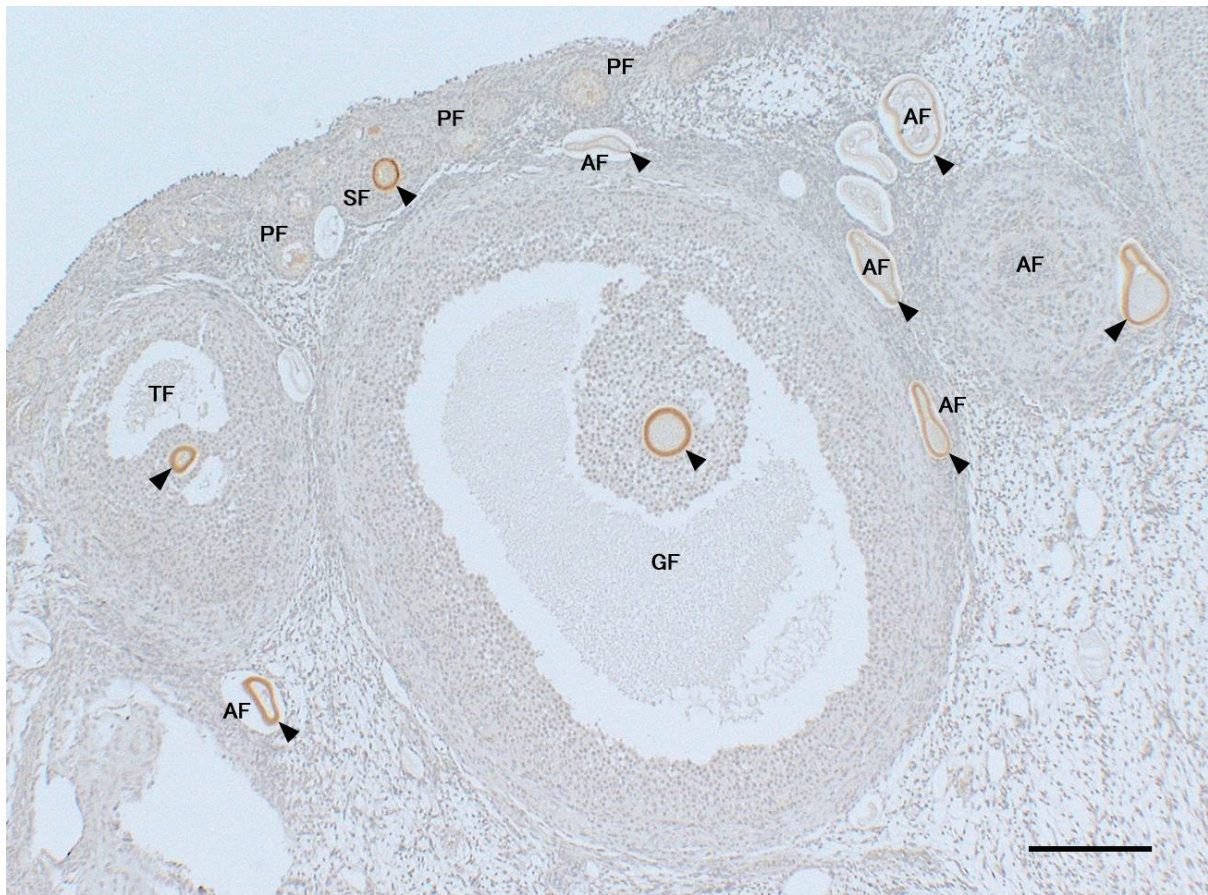


図 3-3. 各ステージの卵透明帯に対する A-2 個体血清の免疫反応性

比較的強度な抗原抗体反応が認められた A-2 個体の血清を用いた免疫染色の結果を示し、各卵胞ステージの卵透明帯に対する反応性を比較した。抗原抗体反応は卵透明帯が形成されるすべての卵胞ステージで認められ、その反応強度に違いは認められなかった。PF：1 次卵胞，SF：2 次卵胞，TF：3 次卵胞，GF：グラーフ卵胞，AF：閉鎖卵胞，◀：卵透明帯，および Bar：50 μm 。

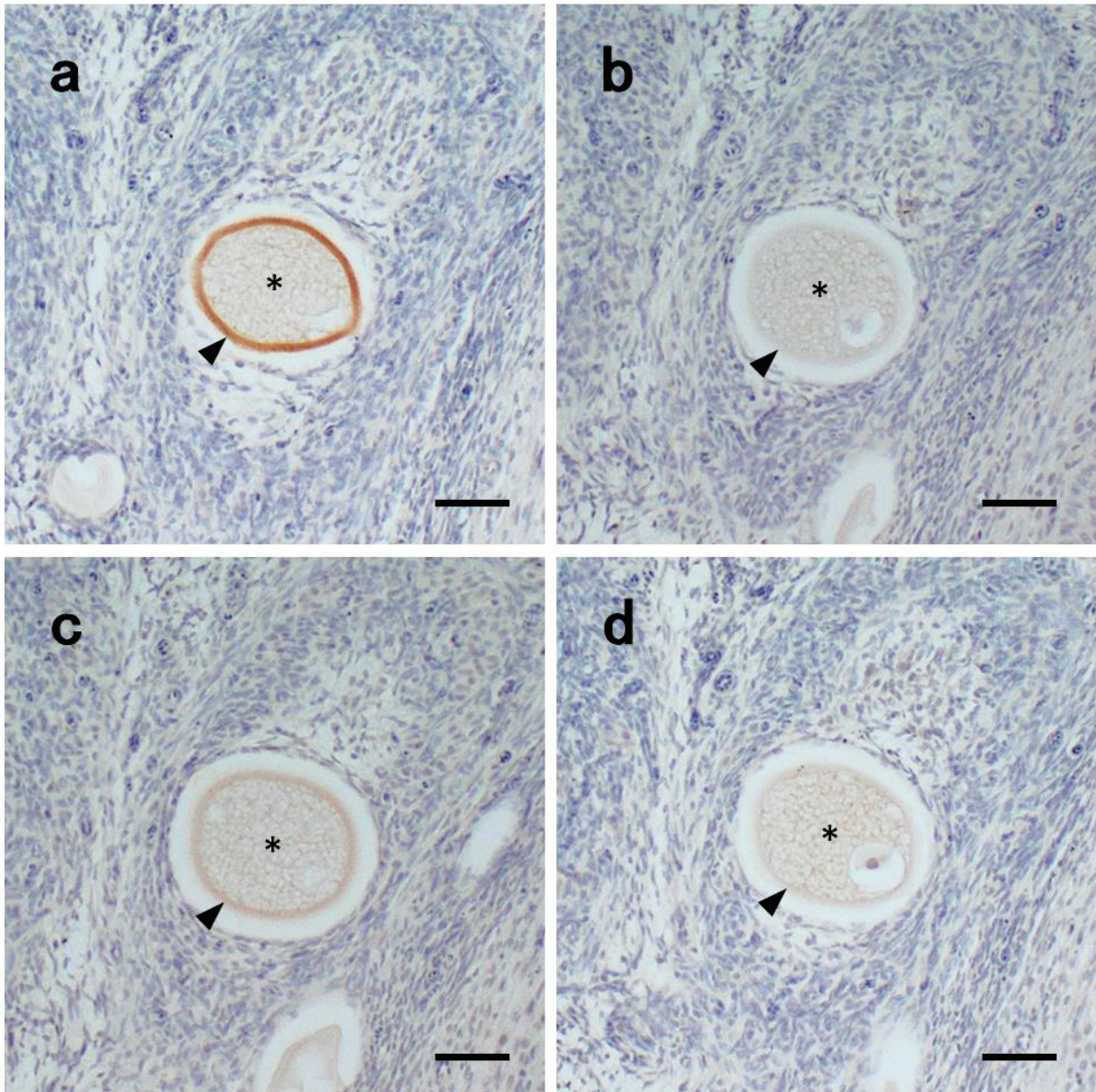


図 3-4. 免疫マングース血清吸収試験の結果

免疫に用いた合成ペプチドで血清中抗体を吸収し，抗体吸収の有無による抗原抗体反応の強度を比較した。A：A-2 血清，b：A-2 血清（抗体吸収），c：B-1 血清，d：B-1 血清（抗体吸収）。抗体吸収なし（a，c）と比較し，抗体吸収血清（b，d）では明らかな抗原抗体反応の減弱が認められた。◀：卵透明帯，Bar：50 μm，*：卵子。

第 4 章 マングースへのホルモン処理による過排卵誘起の試み

4-1. 背景

これまでの研究により、作製した 2 種の合成ペプチドをマングースへ投与することで、①抗体産生が誘導されること（第 2 章）、②産生された抗体はマングース卵透明帯に特異的に結合すること（第 3 章）が示された。次なる段階として、合成ペプチドが実際にマングースに対して繁殖抑制効果を有し、避妊ワクチンとしての効果を発揮するかを検証する必要がある。そのためには免疫個体を交配させ、産子の有無や数を正常と比較することが考えられる。しかし、これまでマングースの繁殖を試みた日本国内の研究においては、雌雄間での共食いが起こるなどで未だ繁殖に成功した事例は報告されていない（環境省やんばる野生生物保護センター 中田氏 私信）。自然交配によるマングースの飼育下繁殖を試験するには、雌雄が自由に行動できる比較的広い飼育スペースや飼育環境が求められるが、大規模な設備投資を必要となる。また、個体の相性や栄養状態などによって、交配、受精や着床などの可否が左右されやすい。うえ、繁殖の成否の確認に費やされる時間も長くなることが予想される。そこで、繁殖抑制効果の比較には人工授精や生殖細胞を用いた精子卵結合試験などの代替手法による検証が適当と考えられた。交配試験や人工授精試験のいずれの方法を実施する場合でも、特定外来生物に指定されているマングースの繁殖は原則禁止されており、外来生物法の「飼養等に関する手続き」を経て環境省による許可が必要となることに変わりはない（第 1 章参照）。

上記のような交配試験の代替法を用いるためには、マングースの排卵のコントロールや効率的な卵子の採取方法の確立が必要となる。マングースは交尾排卵動物であり、交尾刺激によって LH サージが起き、排卵が誘起される (58)。沖縄本島におけるマングースの主な妊娠期は 4 月から 9 月であり（ピークは 6 月）、妊娠期間が 7 週間であることから、交尾期は 2 月から 7 月頃と考えられる (58, 62)。動物のホルモン処置

による排卵誘起には、プロスタグランジン製剤や妊馬血清性ゴナドトロピン (eCG) およびヒト絨毛性ゴナドトロピン (hCG) を用いたプロトコールが一般的である (9, 13, 15, 24)。マンガースと比較的近縁な交尾排卵動物であるフェレット (*Mustela putorius furo*) においても、交尾刺激に依らず eCG および hCG のホルモン処置により過排卵誘起に成功した研究報告があることから (47)、マンガースにおいても同様の処置により排卵を促し、卵子を回収することが可能と考えられた。過剰なホルモン剤の投与による未成熟卵の排卵、異常卵の割合を低下させるため、各ホルモン剤の投与量に幅を持たせ、排卵誘起に至適な投与条件を明らかにすることを目的とした。

4-2. 材料および方法

4-2-1. 供使動物

第 2, 3 章と同様に、2018 年 3 月に環境省のマンガース防除事業で捕獲されたメスのマンガースのうち、Ogura et al. (2001) の所見を参考に、外部計測により亜成獣から成獣と判断された個体 (合計 33 頭) を用いた。個体の飼育・維持についても第 2 章と同様に環境省やんばる野生生物保護センターにて実施した。

4-2-2. マングースの過排卵誘起処置

2017 年 2 月および 2018 年 3 月に捕獲されたメスのマンガースをそれぞれの期間で無作為に合計 6 群 (各群 n = 3-5) に分けた。各投与群の名称は薬剤の投与量 (50-200 IU) および投与間隔に従い (S: short, M: medium, L: long), 50 IU (S) 群, 50 IU (L) 群, 100 IU (S) 群, 100 IU (M) 群, 100 IU (L) 群, 200 IU (L) 群および対照群 (3 月に捕獲した個体) とした。生理食塩水で 1 ml に調整した妊馬血清性ゴナドトロピン (eCG; 動物用セロトロピン, あすかアニマルヘルス, 東京) を各群に 0-200 IU 筋肉内注射により投与した。eCG 投与から 48-72 時間後, ヒト絨毛性

ゴナドトロピン (hCG; 動物用ゴナドトロピン 3000, あすかアニマルヘルス) を筋注射した。さらに, hCG 投与から 16–20 時間後に炭酸ガスを用いて安楽殺処分し, 体重および頭胴長を計測したのち子宮および卵巣を摘出した。各個体の計測値と齢区分を表 4-1, 各群の薬剤投与条件を表 4-2 に示した。

摘出した卵巣は実体顕微鏡 (Stemi DV4, カールツァイスマイクロイメージング, 東京) 下で観察し, 胞状卵胞および黄体の有無もしくは数を記録した。また, 卵管および子宮は切開して PBS で洗浄し, 洗浄液中の卵子の有無により排卵の成否を判断した。50 IU (L) 群, 100 IU (L) 群, 200 IU (L) 群および対照群の個体については, ヘマトクリット毛細管 (エルマ販売, 東京) から作製したキャピラリーを用いて卵管を, 注射器と先端を潰した注射針を用いて子宮を PBS で灌流し, 実体顕微鏡による観察で卵子の検出を試みた。

4-3. 結果

4-3-1. 短時間ホルモン処置による過排卵誘起 (2017 年 2 月)

中用量のホルモン処置 (eCG : 50 IU, 100 IU) による排卵誘起を実施した各個体の体重, 頭胴長, 齢区分および排卵誘起の結果を表 4-3 に示し, 左右それぞれの卵巣で観察された卵胞数の平均値を表した。いずれの eCG 中用量投与群でも排卵は確認できなかったが, 個体差はあるものの全ての処置群で卵胞の顕著な成長が誘起された (図 4-1)。

4-3-2. 長時間ホルモン処置による過排卵誘起 (2018 年 3 月)

50, 100, 200 IU の eCG を投与したのち, 72 時間経過後に hCG を追加投与した実験個体群および対照群のホルモン処置の結果を表 4-4 に示した。各ホルモン処置群では, eCG の投与量によらず顕著な卵胞の発育が観察された。先述の通り, これらの

実験群ではキャピラリーを用いた卵管灌流を実施したものの、排卵卵子を回収することはできなかった。100 IU (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。また、本実験においては 100 IU (L) 群、200 IU (L) 群および対照群で各 1 個体が実験中に死亡し、排卵誘起に関するデータを収集することができなかった。

4-4. 考察

4-4-1. マングースにおける eCG-hCG 処置による過排卵誘起

野生由来のマングースに対する低用量から高用量の eCG 投与とそれに続く hCG の投与により、いずれの実験群においても排卵を誘起するには至らなかった。一方で、50 IU 以上の eCG を投与した実験個体群では、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。これは FSH 様作用を持つ eCG の投与による影響と考えられ、その有効性を立証するものと推察された。eCG 投与とその 48 時間後の hCG 投与によって排卵が認められなかったことから、eCG をより長時間 (72 時間) 作用させたが、結果が改善することはなかった。これはマング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のプロトコールを参考にしたものであったが、その結果は大きく異なるものとなった (47)。その要因と考えられる理由の一つとして、hCG の作用時間が挙げられる。hCG は LH 様の作用を呈する薬剤であり、広く様々な動物種でその有効性が確認されている (13, 15)。マングースは交尾排卵動物であるが、背景で触れた通り hCG 自体は交尾刺激に代替して排卵を誘起すると予想される。フェレットでは交尾刺激 (hCG 投与) から通常 30-36 時間で排卵されると報告されており (50)、今回の実験での hCG の作用時間 (最大で 20 時間) では不十分であった可能性が否めない。また、光刺激も排卵に関わる重要な要素である。一般的に、マングースを含む長日繁殖動物ではメラトニンが抑制的に性腺刺激ホルモン放出ホル

モン (GnRH) を調節していると考えられている (8, 82)。今回の研究ではマンガースの繁殖期の前後で実験を行っているが、光刺激のコントロールは行っていないため、少なからず日長の影響があった可能性が考えられた。

本研究においては、胞状卵胞の大きさについては言及しなかったが、排卵に至る卵胞の大きさが確認できれば、成熟卵胞の有無が判定できるものと思われる。卵胞中の卵子性状との比較による卵胞ステージの推測は可能であると考えられる。また、組織学的な所見に基づく推測も想定されるが、脱水による収縮や長径での切り出しを念頭におく必要がある。通常、子の数に応じた数の卵子が排卵されると想定されるが、マンガースは一腹 1-4 頭 (平均約 2 頭) の子を産むことから (62)、本研究においては卵胞の過発育誘起により多数の卵胞が異常に発育した状態であると考えられる。そのため、物理的圧迫や卵胞発育の不順などにより、通常の卵胞ステージと卵胞径の相関に当てはまらない可能性もあることにも留意すべきである。

4-4-2. マングースに対する適切な排卵誘起方法の検討

eCG-hCG 処置による排卵誘起は、ネコ目の交尾排卵動物を含む様々な動物種でその有用性が報告されており、やはりマンガースにおいても有効であると期待される。本研究では排卵には至らなかったものの、卵胞の発育には一定の効果があり、またそのプロトコールには改善の余地が見出された。具体的には、hCG の作用時間の延長と繁殖に適した日長の考慮である。hCG の作用時間については、フェレットやイエネコにおける研究結果を参考に、25-36 時間程度で試験する必要があるものと思われる。また、2016 年 9 月に低用量のホルモンを処置した予備実験において、妊娠個体の割合が比較的高かったことから、繁殖期-繁殖後期の捕獲個体を用いた実験は現実的ではなく、繁殖期前に捕獲した個体の使用が適当であると考えられる。その方法としては、光刺激管理下での繁殖期前の実験や繁殖期まで飼育維持して実験に供する場が想起される。eCG および hCG の投与量に関しては、今回の結果と他の食肉目動

物における研究事例も考慮し、それぞれ 50–100 IU 程度が妥当な用量ではないかと思われた。過剰な eCG の投与は急激な卵胞発育に伴う異常卵の形成確率の促進や作用期間の延長をもたらすと報告されていることから (47)、排卵卵子の性状評価によって至適用量を決定する必要がある。

4-5. 小括

1. マングースに対する eCG (50–200 IU), hCG (50–200 IU) の投与により, 卵胞の顕著な発育が確認されたものの, 排卵を示す所見は得られなかった。その要因として hCG の作用時間や光刺激による排卵抑制の可能性が見出された。
2. マングースに排卵を誘起する方法として, ①hCG の作用時間の延長 (25–36 時間), ②光刺激や実験時期の調節や③ホルモン剤の至適用量の検討が今後の課題として整理された。

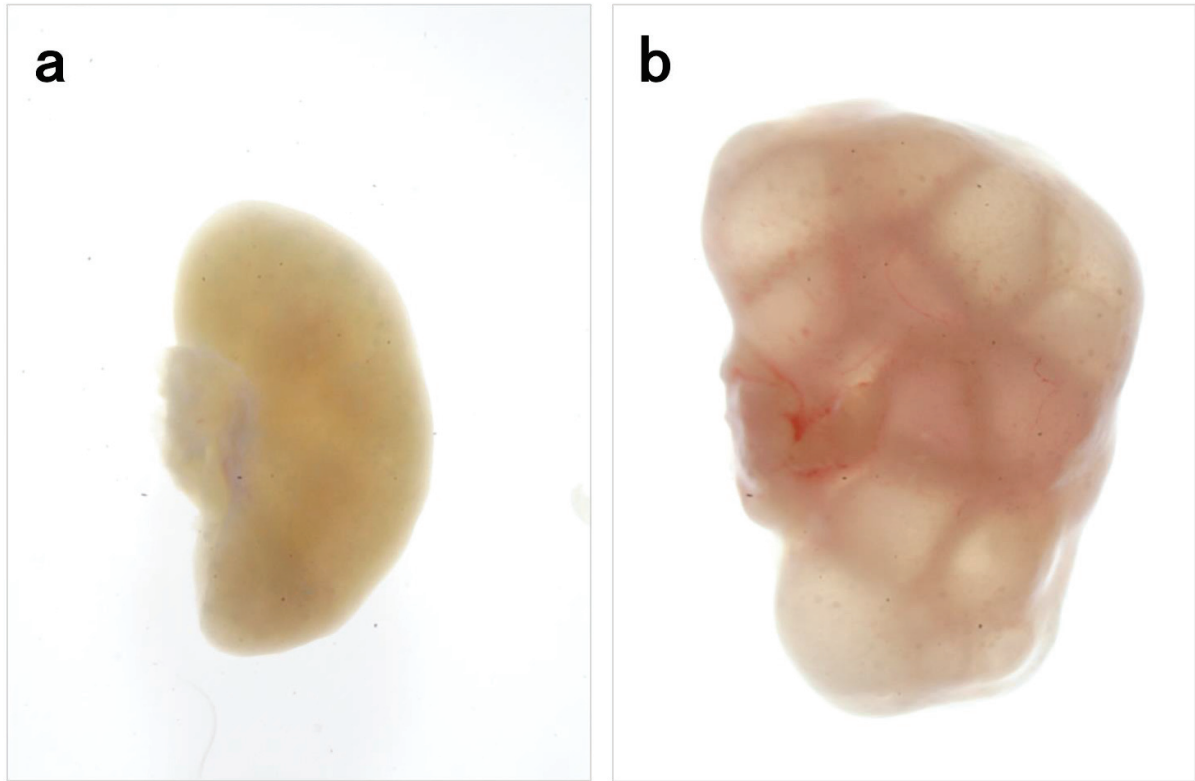


図 4-1. ホルモン処置により過発育したマングースの卵胞

ホルモン (eCG) 処置の有無による卵胞の発育の違いを比較した。PBS を投与した対照群 (a: CTL-①個体) と比較し, eCG を投与した実験群 (b: 200L-②個体) では明らかな卵胞の発育が認められた。また, 多数の胞状卵胞の形成に伴い, 卵巣は顕著に腫大した。いずれも実体顕微鏡拡大像 (32×)。

表 4-1. 過排卵誘起実験に用いた雌マングースの個体情報

実験群名	個体番号	頭胴長 (mm)	体重 (g)
50 IU (S) 群	50S-①	290	372
	50S-②	280	427
	50S-③	270	356
	50S-④	280	326
	50S-⑤	270	380
50 IU (L) 群	50L-①	285	441
	50L-②	290	439
	50L-③	290	408
	50L-④	270	289
	50L-⑤	285	449
100 IU (S) 群	100S-①	290	448
	100S-②	295	386
	100S-③	290	457
	100S-④	300	447
	100S-⑤	270	361
100 IU (M) 群	100M-①	300	399
	100M-②	290	367
	100M-③	300	423
	100M-④	300	420
	100M-⑤	290	389
100 IU (L) 群	100L-①	270	337
	100L-②	280	399
	100L-③	275	386
	100L-④	290	403
	100L-⑤	275	381
200 IU (L) 群	200L-①	285	313
	200L-②	295	342
	200L-③	285	404
	200L-④	275	349
	200L-⑤	300	367
対照群	CTL-①	290	360
	CTL-②	285	349
	CTL-③	300	420

ホルモン処置実験個体ごとの頭胴長 (mm) および体重 (g)を示した。実験群名の数字は eCG の投与量を，括弧内の英字は薬剤の投与間隔 (S: short, M: medium, L: long) を示す。

表 4-2. 過排卵誘起実験における各群の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

ホルモン処置実験群ごとの薬剤投与量および投与間隔を示した。実験群名の数字は eCG の投与量を、括弧内の英字は薬剤の投与間隔 (S: short, M: medium, L: long) を示す。

表 4-3. 短時間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
50 IU (S) 群	50S-①	9	—
	50S-②	12	—
	50S-③	6.5	—
	50S-④	5.5	—
	50S-⑤	10	—
100 IU (S) 群	100S-①	14	—
	100S-②	11	—
	100S-③	3	—
	100S-④	3	—
	100S-⑤	11.5	—
100 IU (M) 群	100M-①	16	—
	100M-②	0	—
	100M-③	1	—
	100M-④	7	—
	100M-⑤	8.5	—

短時間ホルモン処置実験群ごとの卵巣内卵胞数（左右平均）を示した。実験群名の数字は eCG の投与量を，括弧内の英字は薬剤の投与間隔（S: short, M: medium）を示す。

表 4-4. 長時間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	備考
50 IU (L) 群	50L-①	17.5	-	
	50L-②	16	-	
	50L-③	11.5	-	
	50L-④	12.5	-	
	50L-⑤	20	-	
100 IU (L) 群	100L-①	19.5	-	
	100L-②	ND	-	
	100L-③	13	-	
	100L-④	5 (黄体: 左右各1)	-	妊娠 (左:1頭)
	100L-⑤	18.5	-	
200 IU (L) 群	200L-①	ND	-	
	200L-②	17.5	-	
	200L-③	9.5	-	
	200L-④	14	-	
	200L-⑤	18.5	-	
対照群	CTL-①	0.5	-	
	CTL-②	0	-	
	CTL-③	ND	-	

長時間ホルモン処置実験群ごとの卵巣内卵胞数（左右平均）を示した。実験群名の数字は eCG の投与量を，括弧内の英字は薬剤の投与間隔（L: long）を示す。100IU (L) 群の 1 個体（100L-④）は解剖時に妊娠しており，卵胞数に加えて左右の黄体数，妊娠数も示した。一部の個体（100L-②, 200L-①, CTL-③）は実験の過程で死亡が確認されたためデータを取ることができなかった（ND: no data）。

第 5 章 総括

第 1 節 本研究で得られた知見の要約

本研究では、マングース卵透明帯 ZP3 タンパクの精子卵結合部位のアミノ酸配列を基にして作製された 2 種の合成ペプチドをマングース生体に投与し、得られた血清の血清学的および免疫組織化学的解析によりその抗原性を評価した。これにより、合成ペプチドのマングースに対する抗体産生誘導能が明らかとなった。避妊ワクチン開発に向けた次なる段階として、避妊効果を評価するために必要となる繁殖抑制試験の実施が検討された。現状、飼育下におけるマングースの交配が困難であることから、人工授精や生殖細胞の結合試験による評価を想定し、基礎となる技術の確立を目的にホルモン処置によるマングースの過排卵誘起を試みた。本節では、本研究で得られた知見を以下に要約する。

1. 作製した 2 種の合成ペプチドはともにマングースに対して抗原性を有しており、本研究の投与条件では概ね投与回数依存性の抗体産生を誘導した。特に Peptide A は抗原性が強く、投与個体群は総じて高い抗体価を示した。抗体価の持続性に関しても Peptide A が優位であり、マングースの発情期間よりも長い持続性を示した。しかし、避妊効果の持続期間は抗体価陽性の期間より短くなると推察されるため、十分な持続期間と言えるかは疑問である。また、免疫記憶についても一定の抗体価の上昇は認められたものの、高度な免疫記憶を期待できるものではなかった。いずれにせよ、抗体価およびその持続性に関しては実際の避妊効果と併せて評価される必要がある。それを踏まえ、より高度な抗原性を有する合成ペプチドの作製や投与方法の改善に課題が見出された。(第 2 章)

2. 合成ペプチドを投与した個体の卵巣から、組織傷害を示唆する所見は得られなかった。現段階では、今回作製した合成ペプチドが組織傷害をもたらさないか十分な抗体が産生されていないか不明であるが、副作用の不在は動物福祉上重要である。作製した2種の合成ペプチドの投与によって産生された抗体は、マングースの卵透明帯を認識し結合することが示された。その反応は **Peptide A** を投与した A 群でより高度であり、透明帯を形成する全ステージの卵胞で反応が認められた。吸収試験の結果より、今回確認された抗原抗体反応は合成ペプチドおよびマングース卵透明帯に特異的であった。つまり、外因性の合成ペプチドの投与により、内因性の卵透明帯を特異的に標的とする抗体が産生されたことが示唆された。また、非特異的に **IgG** を認識する **Protein A** を用いた免疫染色において、マングース卵透明帯への反応は明らかに強調されたことから、一次抗体として用いた免疫血清は高い特異性を有していると推察された。(第3章)

3. マングースに対する **eCG (50–200 IU)**, **hCG (50–200 IU)** の投与により、卵胞の顕著な発育が確認されたものの、排卵を示す所見は得られなかった。その要因として **hCG** の作用時間や光刺激による排卵抑制の可能性が見出された。マングースに排卵を誘起する方法として、① **hCG** の作用時間の延長 (25–36 時間), ② 光刺激や実験時期の調節や③ホルモン剤の至適用量の検討が今後の課題として整理された。

第2節 マングースの避妊ワクチン開発における展望と課題

本研究で得られた知見はマングースの避妊ワクチン開発において重要な基礎データとなり得る。しかしながら、実際にマングースの個体数抑制のオプションとして避妊ワクチンが適用されるようになるには、数多くの課題が山積している。避妊効果の検証は無論のこと大前提となるが、その他にも実際に野外での適用に至るために解決すべき課題と課題解決に向けた方策が検討される必要がある。本節では、現在開発中のマングースの避妊ワクチンに関する今後の展望と、日本における避妊ワクチンの野外での適用に向けた課題について検討した。

1. 避妊ワクチン候補抗原の選定

今回作製した 2 種の合成ペプチドをマングースへ投与することで、各ペプチドに対する抗体の産生が確認された。さらに、産生された抗体を用いた免疫組織化学的解析では、マングースの卵透明帯への特異的な結合を示した。表 5-1 は抗血清の ELISA と組織解析の結果をまとめたものである。それぞれの解析において、反応強度について処置群間で概ね相関が認められた一方で、処置群内では多少の差異が認められた。たとえば、A-1 個体血清は ELISA による解析において全個体で最も高い抗体価を示したものの、免疫染色では 2 番目に強い陽性反応であった。この相違は標的抗原やその他の実験条件の違いによるものと考えられる。いずれの解析においても、ペプチド A を投与したマングース A 群の血清で反応が強く、総じて B 群の反応を上回ったことから、避妊ワクチン候補抗原としてペプチド A がより抗原性が優位であると思われた。もっとも、免疫染色の陽性反応の強度は血清中の抗体量にも依存しており、ELISA の結果を反映しているものと考えられる。しかし、マングースにおける避妊効果は未だ検証されておらず、避妊ワクチンとしての有用性に関しては実際の避妊効果を踏まえて評価されるべきである。避妊ワクチンが繁殖を阻害する経路は完全に解

明されていないが、卵胞中もしくは排卵された卵子への抗体反応が推測されている(30)。いずれの場合においても、抗体価と繁殖抑制効果には相関があるものと思われる。一方で、マウスに対する避妊ワクチンの研究ではそれらに相関がないことも過去に報告されている(21)。避妊ワクチン投与によってマンガースの繁殖抑制に至った際には、その作用機序や有効な抗体価の推定、効果－抗体価の相関を明らかにする必要がある。

2. マングースの繁殖抑制試験の可能性

合成ペプチドによる避妊効果の検証のためには、免疫マンガースの繁殖を試みる必要があると考えられる。生殖細胞と抗血清を用いた *in vitro* での精子卵結合性試験も受精阻害効果を実証しうるが、最終的にはより自然交配に近い条件下での評価が求められる。いずれにせよ、前提として卵胞の発育を人為的にコントロールし、任意のタイミングで排卵を導く技術の確立が求められる。現状では卵胞の発育誘起に留まり、未だマンガースの排卵誘起には成功していないが、実験条件には多くの改善の余地が残されている。同時に精子の採取方法についても検討がなされる必要があり、具体的には繁殖期における精巢上体精子の採取と精子成熟、性状検査と保存方法の検討などが挙げられる。

他方で、自然交配の可能性にも目を向ける必要がある。先述の通り、現在までに日本においてはマンガースの交配に成功した事例はない。しかし、飼育施設の環境改善や同居させるタイミングの工夫など、より交配に適した条件の模索を試みる実験も有益であろう。これらから得られる知見は交配の可否のみならず、繁殖期・非繁殖期におけるマンガースの行動様式の変化も含まれると期待されるためである。それはマンガースの生態解明ひいては個体数管理戦略の一助となりうると考えられる。

3. 避妊効果の種特異性

マンガースの避妊ワクチン開発の研究において、現段階では合成ペプチドの種特異性に関しては検証が十分とは言えない。過去の研究において、同合成ペプチドで免疫したウサギの血清は、種々の動物由来卵巣組織を用いた免疫組織化学的解析でマンガースの卵透明帯に特異的な反応を示したことから、産生抗体に関して一定の種特異性が確認された (53)。しかしながら、避妊効果の種特異性を確認するには、これらの合成ペプチドがマンガース以外の動物に作用しないことが証明される必要がある。それゆえ、種々の動物、特に日本においてマンガースと同所性に生息する哺乳類に合成ペプチドを投与して確かめられるべきである。それらの対象には実験に用いるのが困難な希少種なども多く含まれるため、実験に必要な種々の許可を得て実施するか、代わりとなる実験動物を用いて評価する必要がある。

4. 避妊ワクチン耐性個体群への選択圧や避妊効果と個体群密度の関連

本研究の免疫実験では明確な個体差は認められなかったが、各免疫群で多少の差異はあった。避妊ワクチンに対する免疫反応の個体差は対象個体群の繁殖抑制に負の影響をもたらしかねない。すなわち、避妊効果の弱い（あるいは無効な）個体の出現は、繁殖抑制効果に抵抗性を持った形質に選択圧をかけ、結果的に個体群の主要な性質を「ワクチン耐性」に導きうる (69)。そのような「免疫学的避妊ワクチンの逆作用」を避けるためには、繁殖抑制に対して潜在的に耐性を有する個体の出現頻度を明らかにし、個体群密度の高低など様々な状況下で避妊ワクチンによる個体群抑制効果を推測する必要がある (69, 71)。また、動物を避妊ワクチンで免疫したいくつかの研究において、寿命や繁殖期の延長も報告されている (40, 68, 79)。これは本来消費されうる繁殖に関わる栄養学的なコストや繁殖機会の喪失などに関連する現象であると考えられ、マンガースの避妊ワクチン開発においても、寿命や繁殖期の延長を考慮して包含する避妊期間を有するワクチンの開発が求められる。

避妊ワクチンを含む繁殖抑制手法の有用性と個体群密度との関連については、いくつかの報告で考察されている。例えば、高密度個体群に対して、外科的処置による不可逆的なメスの不妊化によって個体群レベルでの繁殖抑制効果を得るには、高い割合での不妊化が必要であることが示されている (4)。これは密度効果によるもので、多産多死の繁殖戦略を持つ動物ほど繁殖抑制に必要な労力も大きく、費用効率も低くなるものと考えられる。逆に、個体群密度が低い種や個体群では1個体の避妊がもたらす個体群抑制効果が大きく、費用効率も高くなると予想される。低密度個体群においては、1個体あたりの捕獲努力量あるいは処置努力量は高密度個体群のそれらより相対的に高くなることにも留意する必要がある。第1章で述べた通り、本研究の対象であるマングースは奄美大島全域と沖縄本島北部において既に低密度化が達成されており (34, 35)、避妊ワクチンの適用対象として比較的適しているものと考えられる。マングースの捕獲が困難となっている現状も加味すると、効率的な免疫を可能とする免疫誘導技術 (ワクチンデリバリーシステム) を付して散布することで能動的にワクチン接種させることが望ましい。

5. ワクチンデリバリーシステムへの導入による免疫賦与

特に個体へのアクセスが困難な自由徘徊性の野生動物に避妊ワクチンを接種するには、遠隔的な免疫賦与方法が必要となる (70)。いくつかの経口ワクチン手法が既に避妊ワクチンの投与に応用されている (例: 種々のウィルスベクター, バクテリアゴーストおよびリポソーム; 10, 75, 76)。殊に日本においては、遺伝子組み換え生物の野外への拡散は「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」(通称「カルタヘナ法」) により禁止されており、ウィルスベクターの使用は現実的ではない (32)。それゆえ、バクテリアゴーストやリポソームのような非増殖性で環境に及ぼす影響を最小限に抑えることができるデリバリーシステムの適用がマングースの個体数抑制に可能性を有していると考えられ (11, 44, 76)。これ

らの適用は、避妊ワクチンとの適合性や野外環境下での耐性、費用効率などの評価を経て選択される必要がある。

表 5-1. 免疫マングースの血清学的および組織学的解析結果のまとめ

実験群名 (処置)	個体番No.	抗体価 (吸光度 : 450-655 nm)		免疫染色にお ける反応性	病理所見
		免疫前	免疫後 (4 回)		
Group A (Peptide A)	A-1	0.231 ± 0.017	1.922 ± 0.067	++	ND
	A-2	0.242 ± 0.021	1.548 ± 0.079	+++	-
	A-3	0.244 ± 0.011	1.056 ± 0.052	++	-
Group B (Peptide B)	B-1	0.208 ± 0.004	0.637 ± 0.012	+	-
	B-2	0.229 ± 0.013	0.689 ± 0.001	±	ND
	B-3	0.262 ± 0.026	0.442 ± 0.009	-	-
Group C (対照)	C-1	0.257 ± 0.004 (Peptide A) / 0.254 ± 0.019 (Peptide B)		-	-
	C-2	0.234 ± 0.010 (Peptide A) / 0.239 ± 0.005 (Peptide B)		-	-
	C-3	0.253 ± 0.014 (Peptide A) / 0.288 ± 0.029 (Peptide B)		-	-

+++ : 強度陽性, ++ : 中等度陽性, + : 軽度陽性, ± : 疑陽性, - : 陰性, ND : データなし

Group C (対照群) の血清については Peptide A, B 両方の評価で用いたため, それぞれのペプチドに対する抗体価 (免疫前後の区別なし) を記述した。

謝辞

本研究の遂行にあたっては、以下に挙げる誠に多くの方々のご協力とご厚意なしには成し得ませんでした。深く感謝申し上げます。

本学位論文の作成および遂行にあたり、岐阜大学応用生物科学部の鈴木正嗣教授ならびに浅野玄准教授には、終始ご指導ご助言頂きましたことを深く御礼申し上げます。岐阜大学応用生物科学部の村瀬哲磨教授、帯広畜産大学畜産学部の小川晴子教授、松井基純教授、東京農工大学農学部の渡辺元教授および岩手大学農学部の福井大祐准教授には、本学位論文をご査読いただいたうえ、多くのご助言を賜りましたこと、謹んで御礼申し上げます。

マングース生体を用いた本研究において、多くの方々にご協力いただきました。環境省やんばる野生生物保護センターの中田勝士氏には、本研究に関する示唆のみならず、マングースの捕獲から飼育維持、宿舍の調整まで、本研究に欠かせない多大なるご貢献を頂きましたこと、深く御礼申し上げます。また、同センター所属のレンジャーやスタッフのみなさま、やんばるマングースマスターズのみなさまにも多大なるご支援をいただいたこと感謝申し上げます。ニュージーランドの研究機関である Landcare Research 所属の Dr. Phil Cowan および Dr. Janine Duckworth は、外来種管理研究の先進的な知見を共有してくださったり、具体的な相談に親身に答えてくださるなど、研究者として成長する機会を多く与えてくださった。宮崎大学フロンティア化学実験総合センター実験支援部門生物資源分野の城ヶ原貴通氏には長く研究経過を見守っていただき、過排卵誘起実験に示唆を与えてくださるなど多大な協力をいただきました。また、本学連合獣医学研究科の浅井鉄夫教授には研究に関するご助言のみならず、温かく時に厳しい叱咤激励をいただきましたこと誠に感謝申し上げます。

本論文の作成にあたり、本研究科の卒業生である早川大輔氏、松山亮太氏、松金

知香氏には本当に様々なご助言とご支援をいただきました。心より御礼申し上げます。また、本研究室の卒業生と学生諸氏のみなさまには温かいご支援をいただきました。特に森元萌弥氏，生島詩織氏には多くのご助言とご支援に，木村聡志氏，渡辺健太氏には採材や実験等へのご協力に心より感謝申し上げます。さらに，岐阜大学応用生物科学部附属野生動物管理学研究センターの皆様には，研究生活で欠かせない経験や知識を与えてくださったこと，御礼申し上げます。

最後に，大学および大学院への進学を快くご承諾いただき，精神的にも金銭的にも始終気にかけて支援してくださった家族に深く感謝申し上げます。

引用文献

- 1) 阿部慎太郎 (1995). 水晶体重量による奄美大島産マングースの齢査定. チモリス 6, 34-43.
- 2) Akatsuka, K., Yoshida-Komiya, H., Tulsiani, D. R. P., Orgebin-Crist, M.-C., Hiroi, M., and Araki, Y. (1998). Rat zona pellucida glycoproteins: molecular cloning and characterisation of the three major components. Mol. Reprod. Dev. 51, 454-467.
- 3) American Veterinary Medical Association (2007). AVMA Guidelines on Euthanasia (Formerly Report of the AVMA Panel on Euthanasia). <<https://olaw.nih.gov/sites/default/files/Euthanasia2007.pdf>> (2018年11月1日参照).
- 4) Andersen, M. C., Martin, B. J. and Roemer, G. W. (2004.) Use of matrix population models to estimate the efficacy of euthanasia versus trap-neuter-return for management of free-roaming cats. J. Am. Vet. Med. Assoc. 225, 1871–1876.
- 5) 新井あいか, 船越公威 (2012). フイリマングース *Herpestes auropunctatus* の水晶体重量に基づく齢査定と年齢構成. Nature of Kagoshima 38, 51-54.
- 6) Bennett, C. E., Wilson, B. S. and Desalle, R. (2011). DNA barcoding of an invasive mammal species, the small Indian mongoose (*Herpestes javanicus*; E. Geoffroy Saint-Hillaire 1818) in the Caribbean and Hawaiian Islands. Mitochondrial DNA 22, 12-18.
- 7) Bleil, J. D. and Wassarman, P. M. (1980). Mammalian sperm-egg interaction: identification of a glycoprotein in mouse egg zonae pellucidae possessing receptor activity for sperm. Cell 20, 873-882.

- 8) Carter, D. S. and Goldman, B. D. (1983). Antigonadal effects of timed melatonin infusion in pinealectomized male Djungarian hamsters (*Phodopus sungorus sungorus*): duration is the critical parameter. *Endocrinology* 113, 1261-1267.
- 9) Conforti, V. A., Bateman, H. L., Schook, M. W., Newsom, J., Lyons, L. A., Grahn, R. A., Deddens, J. A. and Swanson, W. F. (2013). Laparoscopic oviductal artificial insemination improves pregnancy success in exogenous gonadotropin-treated domestic cats as a model for endangered felids. *Biol. Reprod.* 89, 1-9.
- 10) Cross, M. L., Fleming, S. B., Cowan, P. E., Scobie, S., Whelan, E., Prada, D., Mercer, A. A. and Duckworth, J. A. (2011). Vaccinia virus as a vaccine delivery system for marsupial wildlife. *Vaccine (Auckl)* 29, 4537-4543
- 11) Cui, X., Duckworth, J. A., Lubitz, P., Molinia, F. C., Haller, C., Lubitz, W. and Cowan, P. E. (2010). Humoral immune responses in brushtail possums (*Trichosurus vulpecula*) induced by bacterial ghosts expressing possum zona pellucida 3 protein. *Vaccine (Auckl)* 28, 4268-4274.
- 12) Curtis, P. D., Richmond, M. E., Miller, L. A. and Quimby, F. W. (2007). Pathophysiology of white-tailed deer vaccinated with porcine zona pellucida immunocontraceptive. *Vaccine* 25, 4623-4630.
- 13) Degenstein, K. L., O'Donoghue, R., Patterson, J. L., Beltranena, E., Ambrose, D. J., Foxcroft, G. R. and Dyck, M. K. (2008). Synchronization of ovulation in cyclic gilts with porcine luteinizing hormone (pLH) and its effects on reproductive function. *Theriogenology* 70, 1075–1085.
- 14) Duckworth, J. A., Wilson, K., Cui, X., Molinia, F. C. and Cowan, P. E. (2007). Immunogenicity and contraceptive potential of three infertility-relevant zona

- pellucida 2 epitopes in the marsupial brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*). *Reproduction* 133, 177-186.
- 15) Estill, C. T. (2000). Current Concepts in Estrus Synchronization in Swine. *J. Anim. Sci.* 77, 1-9.
 - 16) Fayrer-Hosken, R. A., Grobler, D. Van Altena, J. J. and Kirkpatrick, J. F. (2000). Immunocontraception of African elephants. *Nature* 407, 149.
 - 17) Fukuhara, R., Yamaguchi, T., Ukuta, H., Roy, S., Tanaka, J. and Ogura, G. (2009). Development and introduction of detection dogs in surveying for scats of small Indian mongoose as invasive alien species. *J. Vet. Behav.* 5, 101-111.
 - 18) Ganeshpurkar, A., Pandey, V., Agnihotri, A., Bansal, D. and Dubey, N. (2014). Harnessing the potential of bacterial ghost for the effective delivery of drugs and biotherapeutics. *Int. J. Pharm. Investig.* 4, 1-4.
 - 19) Goodpaster, T. and Randolph-Habecker, J. (2014). A flexible mouse-on-mouse immunohistochemical staining technique adaptable to biotin-free reagents, immunofluorescence, and multiple antibody staining. *J. Histochem. Cytochem.* 62, 197-204.
 - 20) 半田ゆかり (1992). マングースによる被害調査—総括. *チリモス* 2, 28-34.
 - 21) Hardy, C. M., Beaton, S. and Hinds, L. A. (2008). Immunocontraception in mice using repeated, multi-antigen peptides: immunization with purified recombinant antigens. *Mol. Reprod. Dev.* 75, 126-135.
 - 22) Hernandez-Medrano, J. H., Williams, R. W., van, Drunen, Littel-van, den, Hurk, S., Peters, A. R., Hannant, D., Campbell, B. K. and Webb, R. (2013). Early postnatal immunisation against gonadotrophin-releasing hormone induces a high but differential immune response in heifer calves. *Res. Vet. Sci.* 95, 472-479.

- 23) Higa, H. H. and Fujinaka, I. T. (1976). Prevalence of rodent and mongoose leptospirosis on the Island of Oahu. *Public Health Rep.* 91, 171-177.
- 24) Hirata, M., Tanihara, F., Taniguchi, M., Takagi, M., Terazono, T. and Otoi, T. (2018). Follicular development of canine ovaries stimulated by a combination treatment of eCG and hCG. *Vet. Med. Sci.* 4, 333-340.
- 25) 池田透, 山田文雄 (2011). 第3章 海外の外来哺乳類対策—先進国に学ぶ. (編: 山田文雄, 池田透, 小倉剛) 日本の外来哺乳類—管理戦略と生態系保全, 初版 pp. 59-76. 東京大学出版会, 東京.
- 26) Invasive Species Specialist Group (2011). GROVAL INVASIVE SPECIES DATABASE. <<http://www.iucngisd.org/gisd/species.php?sc=86>> (2018年11月1日参照).
- 27) 石橋治, 小倉剛 (2012). 日本における特定外来生物マングースの現状とレプトスピラ感染の実態. *地球環境* 17, 193-202.
- 28) 石橋治, 角田かおり, 西島拓, 飯塚信二, 須藤健二, 山下勝弘, 小倉剛, 砂川勝徳, 仲田正 (2008). 沖縄島産マングースにおける ELISA 法を用いた血清診断のための二次抗体の選定. *琉球大学農学部学術報告* 55, 7-10.
- 29) Ji, W., Clout, M. N. and Sarre, S. D. (2000). Responses of male brushtail possums to sterile females: implications for biological control. *J. Appl. Ecol.* 37, 926-934.
- 30) Joone, C. J., Schulman, M. L. and Bertschinger, H. J. (2017). Ovarian dysfunction associated with zona pellucida-based immunocontraceptive vaccines. *Theriogenology* 89, 329-337.
- 31) 環境省 (2014). 生物多様性国家戦略.
<http://www.kantei.go.jp/jp/singi/kankyo/kettei/020327tayosei_f.html> (2018年11月1日参照).

- 32) 環境省バイオセーフティクリアリングハウス (2018). 遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律.
<<http://www.biodic.go.jp/bch/houreiList01.html>> (2018年11月1日参照).
- 33) 環境省 (2014). 特定外来生物による生態系等に係る被害の防止に関する法律.
<http://elaws.egov.go.jp/search/elawsSearch/elaws_search/lsg0500/detail?lawId=416AC0000000078> (2018年11月1日参照).
- 34) 環境省那覇自然環境事務所 (2018). 報道発表資料, 平成29年度奄美大島におけるマングース防除事業の実施結果及び30年度計画について.
<http://kyushu.env.go.jp/naha/pre_2018/2930.html> (2018年11月1日参照).
- 35) 環境省那覇自然環境事務所 (2018). 報道発表資料, 平成29年度沖縄島北部におけるマングース防除事業の実施結果及び30年度計画について(お知らせ).
<http://kyushu.env.go.jp/naha/pre_2018/2930_1.html> (2018年11月1日参照).
- 36) 環境省自然環境局野生生物課外来生物対策室 (2018). 生態系被害防止外来種リスト. <https://www.env.go.jp/nature/intro/2outline/files/gairai_panf_a4.pdf> (2018年11月1日参照).
- 37) 環境省自然環境局野生生物課外来生物対策室 (2018). 日本の外来種対策.
<<https://www.env.go.jp/nature/intro/>> (2018年11月1日参照).
- 38) 環境省自然環境局野生生物課外来生物対策室 (2018). 特定外来生物による生態系等に係る被害の防止に関する法律に基づき規制される生物のリスト.
<https://www.env.go.jp/nature/intro/2outline/files/siteisyu_list.pdf> (2018年11月1日参照).
- 39) Kirkpatrick, J. F. and Turner, A. (2002). Reversibility of action and safety during pregnancy of immunization against porcine zona pellucida in wild mares (*Equus caballus*). *Reprod. Suppl.* 60, 197-202.
- 40) Kirkpatrick, J. F. and Turner, A. (2007). Immunocontraception and increased

- longevity in equids. *Zoo Biol.* 26, 237-244.
- 41) Kirkpatrick, J. F. and Turner, J. W. (1991). Compensatory reproduction in feral horses. *J. Wildl. Manage.* 55, 649-652.
- 42) Kirkpatrick, J. F., Calle, P. P., Kalk, P., Liu, I. K. M. and Turner, J. W. (1996). Immunocontraception of captive exotic species. II. Formosan sika deer (*Cervus nippon taiouanus*), axis deer (*Cervus axis*), Himalayan tahr (*Hemitragus jemlahicus*), Roosevelt elk (*Cervus elaphus roosevelti*), Reeves' muntjac (*Muntiacus reevesi*), and sambar deer (*Cervus unicolor*). *J. Zoo Wildl. Med.* 27, 482-495.
- 43) 国立研究開発法人 国立環境研究所 (2015). 侵入生物データベース (哺乳類). <https://www.nies.go.jp/biodiversity/invasive/DB/toc1_mammals.html> (2018年11月1日参照).
- 44) Langemann, T., Koller, V. J., Muhammad, A., Kudela, P., Mayr, U. B. and Lubitz, W. (2010). The bacterial ghost platform system: production and applications. *Bioeng. Bugs* 1, 326-336.
- 45) Levy, J. K., Mansour, M., Crawford, P. C., Pohajdak, B. and Brown, R. G. (2005). Survey of zona pellucida antigens for immunocontraception of cats. *Theriogenology* 63, 1334-1341.
- 46) Levy, J. K., Friary, J. A., Miller, L. A., Tucker, S. J. and Fagerstone, K. A. (2011). Long-term fertility control in female cats with GonaCon, a GnRH immunocontraceptive. *Theriogenology* 76, 1517-1525.
- 47) Li, Z. Y., Jiang, Q. S., Zhang, Y. L., Liu, X. M. and Engelhardt, J. F. (2001). Successful production of offspring after superovulation and in vitro culture of embryos from domestic ferrets (*Mustela putorius furos*). *Reproduction* 122, 611-618.

- 48) Liu, I. K., Bernoco, M. and Feldman, M. (1989). Contraception in mares heteroimmunized with pig zonae pellucidae. *J. Reprod. Fertil.* 85, 19-29.
- 49) Mask, T. A., Schoenecker, K. A., Kane, A. J., Ransom, J. I. and Bruemmer, J. E. (2015). Serum antibody immunoreactivity to equine zona protein after SpayVac vaccination. *Theriogenology* 84, 261-267.
- 50) Mead, R. A., Joseph, M. M. and Neirinckx, S. (1988). Optimal dose of human chorionic gonadotropin for inducing ovulation in the ferret. *Zoo Biology* 7, 263-267.
- 51) Middleton, C. R., Ansdell, V. E. and Sasaki, D. M. (2001). Of mice and mongooses ... a history of leptospirosis research in Hawaii. *Hawaii. Med. J.* 60, 179-181, 184-186.
- 52) Miller, L. A., Johns, B. E. and Killian, G. J. (2000). Immunocontraception of white-tailed deer with GnRH vaccine. *Am. J. Reprod. Immunol.* 44: 266-274.
- 53) 峰本隆博 (2013). アライグマおよびファイリマングースの経口避妊ワクチンに関する研究—一種特異的な透明帯糖タンパク質抗原の選定—. 岐阜大学 (卒業論文).
- 54) 三谷奈保, 諸澤崇裕, 山下亮, 喜岡正吏, 後藤義仁, 橋本琢磨, 北浦賢次, 山田文雄, 阿部慎太郎, 石川拓哉 (2014). 奄美大島のマングース対策に導入された探索犬の評価. *野生生物と社会* 2, 11-22.
- 55) 森孝之 (2012). ファイリマングースの経口避妊ワクチン開発に向けた透明帯糖タンパク質抗原の有用性の検討. 岐阜大学 (卒業論文).
- 56) Morley, C. G. and Winder, L. (2013). The effect of the small Indian mongoose (*Urva auropunctatus*), island quality and habitat on the distribution of native and endemic birds on small islands within Fiji. *PLoS ONE* 8, e53842.
- 57) 中間弘, 小溝克己. 2009. 鹿児島市喜入瀬々串町で確認されたマングースについて. *鹿児島県立博物館研究報告* 28, 103-104.

- 58) Nellis, D. W. (1989). *Herpestes auropunctatus*. Mammalian Species 342, 1-6.
- 59) 小倉剛 (2007). 沖縄島におけるジャワマングース対策のための技術開発. 緑の読本 43, 36-46.
- 60) 小倉剛, 山田文雄 (2011). 第4章 フイリマングース—日本の最優先対策種. (編: 山田文雄, 池田透, 小倉剛) 日本の外来哺乳類—管理戦略と生態系保全, 初版 pp. 105-137. 東京大学出版会, 東京.
- 61) 小倉剛, 織田銑一, 川島由次 (2003). 外来動物ジャワマングースの捕獲個体分析および対策の現状と課題—特集 野生動物モニタリングと環境保護. 獣医畜産新報 56, 295-301.
- 62) 小倉剛, 野中由美, 川島由次, 坂下光洋, 仲地学, 織田銑一 (2001). 沖縄島に生息する雌ジャワマングースの体サイズと性成熟の関係, ならびに繁殖活動の季節推移. 日本野生動物医学会誌 6, 7-14.
- 63) 小倉剛, 佐々木健志, 当山昌直, 嵩原健二, 仲地学, 石橋治, 川島由次, 織田銑一 (2002). 沖縄島北部に生息するジャワマングース (*Herpestes javanicus*) の食性と在来種への影響. 哺乳類科学 41, 53-62.
- 64) 尾崎清明 (2009). 「飛べない鳥」の絶滅を防ぐ—ヤンバルクイナ. (編: 山岸哲) 日本の希少鳥類を守る, 初版 pp. 51-70. 京都大学学術出版会, 京都.
- 65) 尾崎清明, 馬場孝雄, 米田重玄, 金城道男, 渡久地豊, 原戸鉄二郎 (2002). ヤンバルクイナ生息域の減少. 山階鳥類研究所報告 34, 136-144.
- 66) Powell, D. M. (1999). Preliminary evaluation of porcine zona pellucida (PZP) immunocontraception for behavioral effects in feral horses (*Equus caballus*). J. Appl. Anim. Welf. Sci. 2, 321-335.
- 67) Ramsey, D. (2005). Population dynamics of brushtail possums subject to fertility control. J. Appl. Ecol. 42, 348-360.
- 68) Ransom, J. I., Cade, B. S. and Hobbs, N. T. (2010). Influences of

- immunocontraception on time budgets, social behavior, and body condition in feral horses. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 124, 51-60.
- 69) Ransom, J. I., Powers, J. G., Thompson, Hobbs, N. and Baker, D. L. (2014). Ecological feedbacks can reduce population-level efficacy of wildlife fertility control. *J. Appl. Ecol.* 51, 259-269.
- 70) Sharma, S. and Hinds, L. A. (2012). Formulation and delivery of vaccines: Ongoing challenges for animal management. *J. Pharm. Bioallied. Sci.* 4, 258-266.
- 71) Suppo, C., Naulin, J. M., Langlais, M. and Artois, M. (2000). A modelling approach to vaccination and contraception programmes for rabies control in fox populations. *Proc. Biol. Sci.* 267, 1575-1582.
- 72) Swanson, W. J., Yang, Z., Wolfner, M. F. and Aquadro, C. F. (2001). Positive Darwinian selection drives the evolution of several female reproductive proteins in mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 2509-2514.
- 73) 当山昌直, 小倉剛 (1998). マングース移入に関する沖縄の新聞記事. 沖縄県史研究紀要 4, 141-170.
- 74) Veron, G., Patou, M.-L., Pothet, G., Simberloff, D. and Jennings, A. P. (2007). Systematic status and biogeography of the Javan and small Indian mongooses (*Herpestidae, Carnivora*). *Zoologica Scripta* 36, 1-10.
- 75) Vos, A., Kretzschmar, A., Ortmann, S., Lojkic, I., Habla, C., Muller, T., Kaiser, C., Hundt, B. and Schuster, P. (2013). Oral vaccination of captive small Indian mongoose (*Herpestes auropunctatus*) against rabies. *J. Wildl. Dis.* 49, 1033-1036.
- 76) Walcher, P., Cui, X., Arrow, J. A., Scobie, S., Molinia, F. C., Cowan, P. E., Lubitz, W. and Duckworth, J. A. (2008). Bacterial ghosts as a delivery system for zona

- pellucida-2 fertility control vaccines for brushtail possums (*Trichosurus vulpecula*). *Vaccine* 26, 6832-6838.
- 77) Watari, Y., Nagata, J. and Miyashita, T. (2010). New detection of a 30-years-old population of introduced mongoose *Herpestes auropunctatus* on Kyusyu Island, Japan. *Biol. Invasion* 13, 269-276.
- 78) Watari, Y., Takatsuki, S. and Miyashita, T. (2008). Effects of exotic mongoose (*Herpestes javanicus*) on the native fauna of Amami-Oshima Island, southern Japan, estimated by distribution patterns along the historical gradient of mongoose invasion. *Biol. Invasion* 10, 7-17.
- 79) Williams, J. S. (1999). Compensatory Reproduction and dispersal in an introduced mountain goat population in central Montana. *Wildl. Soc. Bull.* 27, 1019-1024.
- 80) 山田文雄, 杉村乾, 阿部慎太郎 (1999). 奄美大島における移入マングース対策の現状と問題点. 関西自然保護機構会報 21, 31-41.
- 81) Yamada, F., Sugimura, K., Abe, S. and Handa, Y. (2000). Present status and conservation of the endangered Amami rabbit *Pentalagus furnessi*. *Tropics* 10, 87-92.
- 82) Yellon, S. M., Bittman, E. L., Lehman, M. N., Olster, D. H., Robinson, J. E. and Karsch, F. J. (1985). Importance of duration of nocturnal melatonin secretion in determining the reproductive response to inductive photoperiod in the ewe. *Biol. Reprod.* 32, 523-529.
- 83) 与儀元彦, 小倉剛, 石橋治, 川島由次, 砂川勝徳, 織田銑一 (2006). 沖縄島の養鶏業におけるマングースの被害. 沖縄畜産 41, 5-13.

英文抄録

The Study of an Immunocontraceptive Vaccine on the Small Indian Mongoose (*Herpestes auropunctatus*)

KUNINAGA, Naotoshi

In Japan, various non-native species have been reported to impact native ecosystems. To deal with these, especially, invasive species, the Ministry of the Environment has introduced a law, the Invasive Alien Species Act, and has proceeded to designate some non-native species as “invasive alien species”. The small Indian mongoose (*Herpestes auropunctatus*) was introduced to the Japanese islands; it has heavily impacted Japan’s biodiversity. Population control has been attempted by capturing these organisms, but its efficiency has rapidly declined. Therefore, new additional methods for controlling this invasive species are required. Thus, immunocontraceptive vaccines, which act in a species-specific manner, have been focused upon. In previous studies, the amino-acid sequence of the mongoose ovum zona pellucida protein 3 (ZP3) has been decoded and two types of synthetic peptides (A and B) have been produced. In this study, these peptides have been evaluated with regards to their immunogenicities and sterility effects on mongooses.

Peptides A and B were administered to the mongooses four times at an interval of two weeks and the sera were collected to verify their immunogenicity using ELISA. Sera from the peptide-treated mongooses showed increased antibody titers according to the immunizations; these increases were marked, especially in Peptide A-treated mongoose sera. The antibody titer of one of these peptides lasted for at least 21 weeks. However, the induction of robust immune memory was not observed. Considering the mongoose

breeding season, a single immunization by a vaccine lasting approximately five months would be applicable to keep the antibody titer elevated for the whole breeding season. Meanwhile, reinforcing the antigenicity and/or improvement of the antigenic agent have been cited as accessory assignments.

Furthermore, the sera from treated mongooses were tested for their antigen recognition capacity by IHC. As a result, the antigen-antibody reactions against the endogenous mongoose ZP were observed in all the serum samples from treated mongooses, especially in those from mongooses treated with Peptide A. In addition, IHC revealed that the immune sera obtained after treatment with each peptide showed a marked reduction in reactivity, which indicates the specificity of the induced antibodies. These results suggested that Peptide A was a potential antigen, inducing autoantibody production in mongooses.

Next, experiments for examining superovulation in the mongooses were performed to evaluate the sterility effects of the peptides. After hormone (eCG, followed by hCG) treatment, superovulation was not observed in mongooses from any of the treated groups, but their follicles had swollen notably. Shortages of hormone application time and/or optical stimulation are the suspected causes of these results.

This study verified that the synthetic peptides developed are useful as antigenic candidates for immunocontraception in mongooses. On the other hand, the actual sterility effects of the peptides remain unknown; these should be verified. Moreover, there are many tasks to be performed before the practical application of these agents (e.g. sperm collection, oral immunization, and eventual field application etc.). However, once this approach of population control of non-native species will have been established, the status of invasive species in the world may change drastically.