
安全な駆虫薬を目指した鶏コクシジウム原虫の 特異的呼吸鎖を標的とする分子創薬

大阪府立大学大学院生命環境科学研究科獣医学専攻獣医国際防疫学教室・准教授 松林 誠

■ 目的

養鶏産業において、鶏コクシジウムの防圧の成否は生産性に直結する重要な課題である。しかし、現行の予防・治療薬は、鶏への副作用や薬剤残留問題等を抱えている。原虫の増殖の場である腸管内は低酸素環境下であり、広く知られている代謝経路とは異なるエネルギー代謝が作動し寄生適応していると推定される。本研究課題では、この嫌氣的代謝経路を遮断する化合物を同定し、鶏や人体に影響のない安全な薬剤を創出することを目指した。

■ 方法

鶏コクシジウム原虫の中でも最も病原性の高い *E. tenella* のスポロゾイトとメロゾイトのミトコンドリア複合体IIのサブユニットについて、RACE法により全長の塩基配列の解析を行った。また、スポロゾイトからのミトコンドリア精製方法を検討し、得られたミトコンドリアを用いて、コハク酸(複合体IIの基質)、リンゴ酸(malate: quinone oxidoreductase)、グリセロール三リン酸(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)、NADH(NADH dehydrogenases Type II)、ジヒドロオロト酸(dihydroorotate dehydrogenase)を基質として、シトクロム *c* の吸光度変化により種々の酵素活性を測定した。これらの呼吸鎖を阻害することが知られる化合物について、*in vitro*での阻害効果を上記の吸光度変化による評価をした。これらの化合物による殺虫効果を解析するため、それぞれの化合物を 50 μ M ~ 10nM の濃度で精製し、虫体の殺滅効果を評価した。

■ 結果および考察

複合体IIサブユニットのクローニングでは、Flavoprotein と Iron-sulfur protein の全長の塩基配列を決定できた。スポロゾイトとメロゾイトの間での塩基配列は100%一致した。シトクロム *b* サブユニットの全長は決定に到らなかった。ミトコンドリアの精製は、トリプシンを含む脱囊液でオーシストを前処理すると回収率が高くなることが分かった。また、高圧(1,200psi以上)のN₂キャビテーションによる破碎処理が有効であった。得られた原虫ミトコンドリアを用いて、種々の酵素活性を測定したところ、NADHを基質とした比活性が341nmol/min/mgであり、解析した呼吸鎖の中でNADH dehydrogenases Type IIの活性が最も高かった。精製ミトコンドリアを用いた酵素活性の阻害効果試験では、 μ M ~ nM のオーダーで阻害が確認できた。虫体への殺滅効果試験では、 μ M の濃度において最大で90%の殺滅効果が観察された。

■ 結語

解析の結果、*E. tenella* のミトコンドリアの精製方法と酵素活性測定系、および虫体殺滅評価系を確立することができた。さらに詳細に解析を実施する必要があるが、これらの解析系は今後、*Eimeria* 原虫の呼吸鎖代謝経路の解明および薬剤開発に有用であると考えられた。