

カイコをモデル動物とした創薬

浜本 洋, 関水 和久

産業昆虫であるカイコは、哺乳動物と比較して飼育コストも安く、その上、倫理的問題がないため、多数の個体を利用した研究に道を開く。そのため、カイコモデルを用いれば哺乳類モデルでは不可能であった、治療効果を指標とした新規医薬品の探索が可能となる。本稿では、カイコを創薬モデルとして利用するにあたって、その基盤となる薬物の体内動態と、毒性の評価方法を中心に解説する。筆者らの研究によって、カイコにおいても、薬物動態を支配する基本的なメカニズムは哺乳動物と共通していること、および、カイコ個体に対する化合物の毒性であるLD₅₀値がこれまでのラットにおける結果とよく一致することがわかってきた。したがって、カイコを用いて候補化合物の体内動態や毒性を評価する薬の探索が可能である。さらに本稿では、ゲノム編集技術を利用したカイコの病態モデルの構築、ならびにその特性についても議論したい。

1. はじめに

新薬の開発においては、試験管内で探索された生理活性を有する候補化合物に対して、その治療効果を適切なモデル動物で評価することが必要である。なぜならば、大部分の化合物は、たとえ試験管内で活性を示しても、動物個体で治療効果を示さないためである。化合物が治療効果を示すためには、作用する場所に、活性を示すのに十分な濃度が、効果を示すのに必要な時間存在することが必要である。また、新しい医薬品の開発において最も重要であり、かつ困難な課題として、化合物の毒性の克服があげられる。したがって、創薬の初期段階において、薬物動態と毒性を反映した個体モデルを用いて、治療効果を迅速に、かつ廉価に評価できれば、新規治療薬を効率的に発見できると考えられる。そこで、筆者らは、安価に、かつ倫理的問題がなく、多数の個体を利用することが可能な動物として、昆虫であるカイコに着目し、新しいモデル動物としての創薬への応用の可能性を追求している（図1）。

2. カイコの創薬モデル動物としての利点

カイコはモデル動物として、ほかの動物にない、さまざまな利点を有している。カイコは産業用昆虫として利用されてきた歴史があり、その利用にあたって特段の規制もなく、倫理的問題もない。また、国内に養蚕業が維持されているため、卵を安価に購入することが可能である。また、桑の葉を用いずに人工飼料で飼育できるようになっている。そのため、通年を通じて実験することが可能である。さらに、微生物コントロールはある程度必要であるものの、大規模な設備は不要で、万頭単位の個体を一度に飼育できる。また、発育ステージがそろった、体重が同じ個体を数百匹単位で得ることが容易である。このような特長を有する動物は、ほかに類例がない。論文レベルでは、ショウジョウバエや、バッタ、線虫を抗生物質の治療効果の評価に利用した例があるが、ショウジョウバエは小さいため注射実験が容易ではない。また、バッタは飛び回るために感染した個体によるバイオハザード防止のための封じ込めが困難である。線虫については、利用できる病原性細菌が限られており、しかも薬物の投与方法が培地への添加に限られている。したがって、これらの動物は、いずれも医薬品の治療効果を評価するモデルとしては難点がある。カイコは体長が2~3センチであり、人の手による取り扱いが容易である。またカイコは高度に家畜化されているため、動きも緩慢でバイオハザードの恐れが小さい。さら

東京大学大学院薬学系研究科微生物薬品化学教室（〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1）

Silkworm as a model animal for drug development

Hiroshi Hamamoto and Kazuhisa Sekimizu (Laboratory of Microbiology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan)

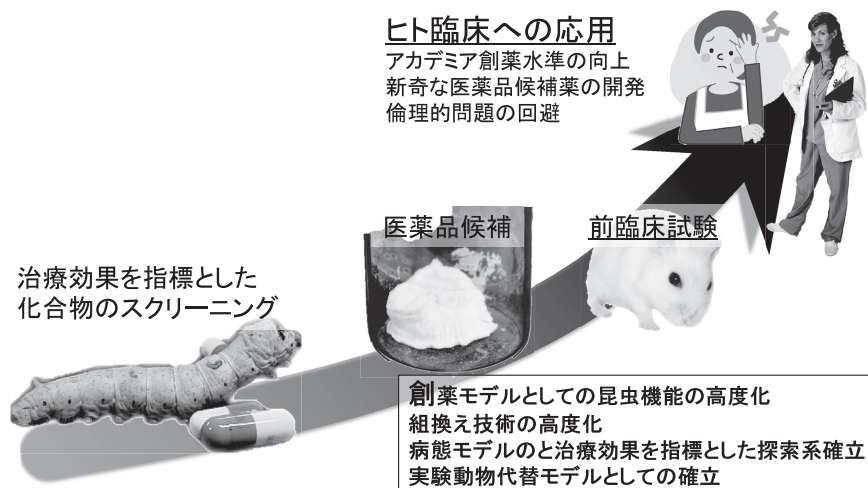


図1 カイコ創薬の概略

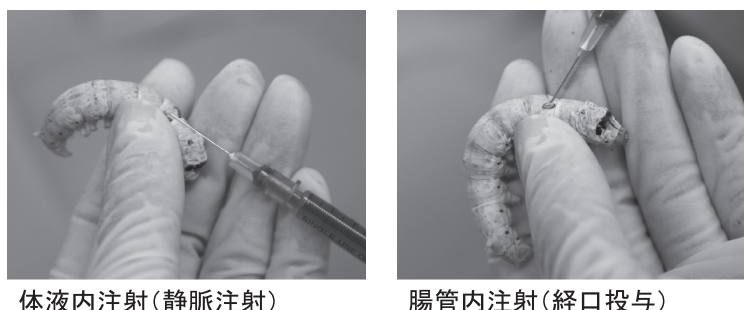


図2 カイコモデルにおけるサンプルの投与方法

に、経口投与と静注投与を模擬した薬剤の投与が可能である(図2)。したがって、カイコをモデル動物として利用することにより、これまで不可能であった、治療効果を指標とした医薬品の探索が可能となることが期待される。

3. カイコにおける薬物動態機構の哺乳動物との共通性

カイコには、ヒトの腸や肝臓、および、腎臓に相当する器官が存在する。これらは、薬物の体内動態を支配する機能を有している。また、筆者らは、カイコの黄色ブドウ球菌感染モデルにおいて、抗生物質の治療効果を定量的に評価することが可能であり、上市されているほとんどの抗生物質について、体重あたりの治療に必要な薬剤量(ED₅₀)が、マウスにおける値と一致していることを見いだした¹⁾。したがって、カイコにおいても化合物の体内動態機構は哺乳動物と共通していると考えられた。筆者らが研究を開始した当時、学会でカイコを用いた抗生物質の評価に関する研究を発表すると、カイコでの結果は試験管内での結果と同じに決まっているはずだ、という批判をしばしば受けた。これまでの昆虫における薬物の体内動態については、殺虫剤耐性に関する観点からの研究に限られており、医薬品の開発に必要な基本的な薬物動態に関する知見が欠けていたためである。筆者らは、カイコを医薬品開発に利用するという観点から、カイコと哺乳類との基本的な薬物

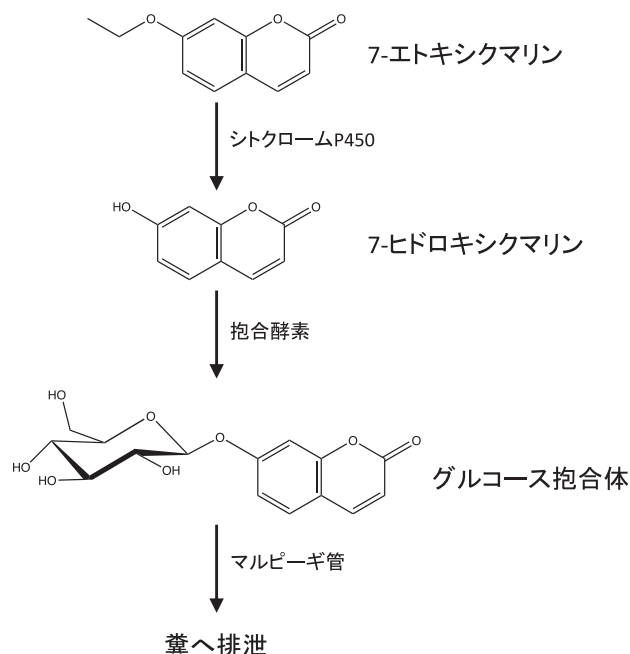


図3 カイコの薬物代謝経路

動態の共通性について検討した。ヒトを含む哺乳動物において、静注された薬物は速やかに臓器へ分布し、シトクローム P450 や抱合酵素による代謝を受け、腎臓から排泄される。筆者らは、モデル薬物として7-エトキシクマリンを選び、カイコにおける血中濃度推移、および代謝物を

解析した (図 3)²⁾。本化合物は、マウスにおいてシトクローム P450 2B6 で代謝され、脱エトキシ化されることが知られている。カイコの体液中に 7-エトキシシクマリンを注射し、その血中濃度を測定したところ、マウスと同様に血液から組織への薬物の分布が完了する α 相、および、薬物の代謝により血中濃度が低下する β 相からなる 2-コンパートメントモデルで説明される薬物濃度推移を示した。また、その代謝物はシトクローム P450 で代謝されたと考えられる、脱エトキシ化された 7-ヒドロキシシクマリンであった。さらに、7-ヒドロキシシクマリンの代謝物を検討したところ、グルコース抱合を受けて糞へ排泄されることがわかった。この化合物は、マウスではグルクロン酸抱合を受けることが知られているが、グルコースというグルクロン酸と同じ糖による抱合を受ける。また、7-エトキシシクマリン、7-ヒドロキシシクマリンの両方の血中半減期は、カイコと哺乳動物とで一致していた。したがって、7-エトキシシクマリンの基本的な代謝経路は、カイコと哺乳動物とで共通していることが明らかとなった。さらに、ヒトにおいて肝のミクロソームに存在するシトクローム P450 によって代謝されるほとんどの化合物は、カイコでも代謝されることを見いだしている。これまで明らかになっているゲノム情報の解析から、カイコにも複数のシトクローム P450 が存在していることがわかっていて、したがって、カイコにおける基本的な薬物代謝経路は哺乳動物のそれと共通していると考えられる。

薬物体内動態を決定する重要な因子として、代謝のほかに、薬物の分布があげられる。医薬品をヒトに投与した場合、さまざまな組織に分布し、患部における実効濃度が低下するため、治療効果を示さない場合があることが知られている。カイコにおける抗生物質の分布容積の解析結果は、マウスでの値とよく一致していることが明らかとなっている。

上に述べたように、カイコは腸管内への薬物の投与が可能である。これは、哺乳動物での経口投与に相当している。バンコマイシンおよびカナマイシンは、分子量が大きく、ヒトにおいては腸管から吸収されないため、経口投与では治療効果を示さない。これらの抗生物質は、カイコにおいても腸管を透過できず、そのために腸管内投与ではカイコの黄色ブドウ球菌感染モデルにおいて治療効果を示さなかった¹⁾。哺乳動物における薬物の腸管からの吸収の有無は、薬物の分子量、および化合物の脂溶性が影響を与えることが知られているが、カイコにおいても同様である³⁾。さらには、カイコを用いて腸管吸収性を高めるために修飾された薬剤 (プロドラッグ) の腸管透過性を評価できる。したがって、カイコを用いたアッセイ系は、決して試験管と同じではなく、哺乳動物と同様に、薬物の体内動態を反映した評価系である。

4. 経口急性毒性評価のための代替動物としてのカイコの有用性

候補化合物の臨床応用にあたって、毒性の評価は必要不可欠である。たとえ候補化合物に治療効果があったとしても、その治療効果を示すのに必要な用量 (ED_{50} 値) と毒性を示す用量 (LD_{50} 値) が近い化合物は、安全性が低く臨床応用が難しい。そこで、創薬の早い段階で、毒性の評価も簡便にできることが必要とされている。これまでは、マウスを用いた急性毒性の評価が行われているが、マウスで毒性を評価するためには、多数のマウスが必要とされる上に、化合物の量も少なくとも 100 ミリグラム必要とされ、スクリーニング段階においてそのようなアッセイをすることはコストの面から非現実的である。また、実用化のはるか以前の段階で、スクリーニングのために毒性の評価を行うことは、倫理上問題がある。そこで、毒性の評価においても、大量に個体を安価に利用でき、倫理的な問題がないカイコの活用を考えた。さまざまな化合物をカイコに体内投与 (静脈内投与を模擬) したところ、それらの化合物の LD_{50} 値が、哺乳動物とよく一致していることを見いだした²⁾ (図 4)。一方、呼吸抑制など神経系に作用する化合物は、カイコにおける LD_{50} 値と哺乳動物における値が乖離していた。したがって、カイコモデルを用いることで、呼吸に関わる神経毒性を示す化合物以外の化合物の毒性が評価できると考えられる。

一方、動物実験において、哺乳動物の利用は動物愛護の高まりを受け、Replacement (代替)、Reduction (削減)、Refinement (苦痛の軽減) の 3R の精神に従うことが求められている。特に化粧品分野では、EU において動物実験を行った化合物を含む製品は販売が禁止されるなど、規制が広がってきている。日本においても、「動物の愛護及び管理に関する法律」が改正され、実験動物の飼養および保管ならびに苦痛の軽減に関する基準が定められ、哺乳類、鳥

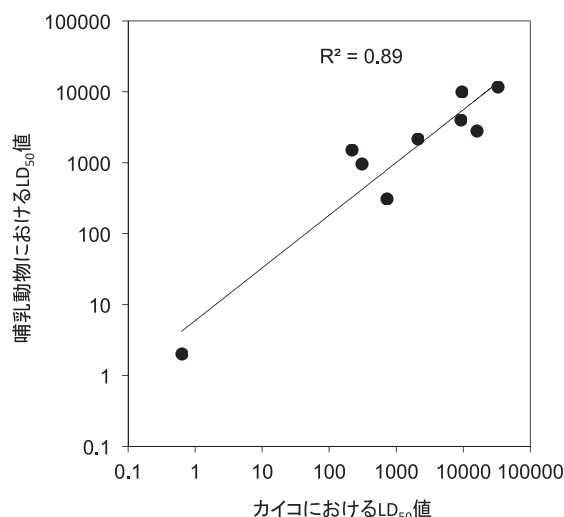


図 4 カイコおよびマウスにおける化合物の毒性の相関

類、または爬虫類の使用にあたっては実験での取り扱いにおける管理が必要となってきている。これまでに、哺乳類を用いた毒性試験に使用する動物数を減らすために、初回投与量の決定のためのモデルとして細胞毒性を評価するアッセイ系が考案されている。しかしながら、経口投与による単回投与毒性試験の結果に対する、細胞を用いたアッセイ系の相関係数が低く、有意な相関が認められなかったことが報告されており、経口急性毒性試験の代替動物モデルが切望されている。カイコは、前述したように、化合物の腸管透過性も哺乳動物と同じメカニズムを有していることから、カイコを用いた化合物の経口急性毒性試験を実験動物代替モデルとして利用できるのではないかと考えられる。これまでに、化合物に対するカイコとマウスのLD₅₀値の相関も良好な値を示し、施設間でのばらつきも少ないことが見いだされている。現在、OECD ガイドライン策定を目指し、株式会社ノエビアとともに研究を行っている。詳しくは、株式会社ノエビアのプレスリリースをご覧ください (http://www.noevir.co.jp/new/ir_info/pdf/per44/131218a.pdf)。

5. カイコを用いた治療効果を指標とした新規医薬品の探索

医薬品候補化合物の探索において問題となることの一つとして、試験管内での大規模スクリーニングによって得られる化合物の大部分が、標的特異性がなかったり、体内動態が悪いために治療効果を示さなかったりすることである。そこで、探索段階において治療効果を指標としたアッセイ系が有用ではないかと筆者らは考えた。これまで述べてきたように、カイコモデルは、化合物の体内動態および毒性を加味した評価が可能である。また、カイコ細菌感染モデルを用いた抗生物質の治療効果も定量的に評価できる。筆者らは、多数の個体を安価に利用できるカイコの利点を生かし、実際に治療効果を示す新規抗生物質の探索を行った。自らの手により、日本全国の土壌を採取し、分離

した土壌細菌 14,000 株から培養上清を調製し、薬剤耐性黄色ブドウ球菌に抗菌活性を示した 2,800 個について、カイコ黄色ブドウ球菌感染モデルにおける治療効果を検討した。その結果、23 株の培養上清が治療効果を示した。次に、それらの培養上清から治療効果を指標に抗生物質を精製したところ、既存の抗生物質とは作用メカニズムが異なる新規抗生物質カイコシン E の同定に成功した。カイコシン E は、マウスの黄色ブドウ球菌感染モデルにおいても、既存の臨床で使用されているバンコマイシンと比較して良好な治療効果を示し、毒性も低いものであった。現在、カイコシン E は臨床応用可能であると期待され、実用化研究を実施している。さらに、筆者らは、土壌細菌の培養上清だけでなく、化合物ライブラリーからの治療効果を指標とした探索も実施し、マウスモデルでも治療効果を示す抗菌化合物の同定に成功している。これらのように、カイコ細菌感染モデルを用いた探索により、臨床応用可能な新規抗生物質を探索することができる (図 5)。

6. カイコを用いた病態モデルの確立

カイコを用いた細菌感染モデルは、抗生物質の評価に利用できるだけでなく、病原性細菌の哺乳動物とも共通した病原性因子の探索、同定にも利用可能である⁴⁾。また、グラム陽性の黄色ブドウ球菌だけでなく、リステリア、肺炎球菌や、グラム陰性の緑膿菌、大腸菌、コレラ菌、赤痢菌以外にも、カンジダやアスペルギルスなどの真菌感染モデルも確立しており、病原性の解析や抗生物質の探索に利用されている。

また、カイコの個体形成・維持に関わる遺伝子は哺乳類と共通しているものが多く、細菌感染モデルや毒性評価モデルだけでなく、ほかの病態モデルを確立することが可能である。カイコにも薬物代謝に関わる酵素が共通して存在することを利用した薬物代謝による臓器障害モデル⁵⁾や、自然免疫に応答する因子群が共通することを利用した自然免疫活性化の評価モデル⁶⁾、糖尿病モデルなどを確立し、研究に利用している。糖尿病モデルについては、本特集の松本らの総説をご覧ください。

また、近年、本特集の瀬筒らの研究により、カイコにおけるゲノム編集技術が向上し、トランスジェニックカイコや、遺伝子破壊カイコを確立できるようになってきた。筆者らは、分子標的薬の候補として RAS 経路に着目し、変異遺伝子を発現させた抗がん剤の治療効果の評価モデルの樹立に成功している。このようにトランスジェニック技術やゲノム編集技術を用いて、変異カイコを用いた病態モデルを樹立し、その表現型を治療する薬剤の探索系を確立できるのも、カイコならではの利点であるといえる。

7. おわりに

カイコは、品質がそろった多数の個体を一度に利用で

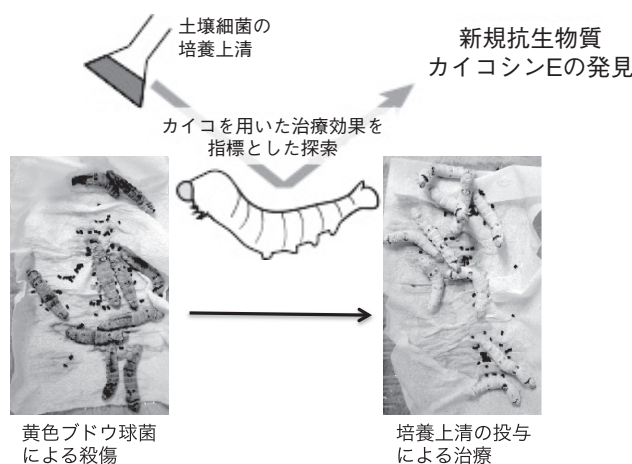


図 5 土壌細菌培養上清からの治療効果を指標とした新奇抗生物質の探索

き、かつ、倫理的な問題がない、創薬のモデル動物として、ほかの動物にはない魅力を秘めている。我々は、カイコを、創薬のスクリーニング段階から、得られた医薬品のリード化合物の誘導体の評価まで利用する、創薬のモデルを提案したい (図5)。カイコを用いた探索によって見いだされたカイコシンEは、宿主因子によって抗菌活性が上昇するなど、ユニークな特長を有する。このように、カイコを動物モデルとして探索することによって、既存の化合物とは作用機序が根本的に異なる治療薬が得られる可能性がある。今後も、薬物動態や病態モデルの確立を通じて、カイコの創薬モデルとしての魅力を高めていきたいと考えている。

文 献

- 1) Hamamoto, H., Kurokawa, K., Kaito, C., Kamura, K., Razanajatovo, I.M., Kusuhashi, H., Santa, T., & Sekimizu, K. (2004) *Antimicrob. Agents Chemother.*, 48, 774-779.
- 2) Hamamoto, H., Tonoike, A., Narushima, K., Horie R., & Sekimizu, K. (2009) *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*, 149, 334-339.
- 3) Hamamoto, H., Kamura, K., Razanajatovo, I.M., Murakami, K., Santa, T., & Sekimizu, K. (2005) *Int. J. Antimicrob. Agents*, 26, 38-42.
- 4) Kaito, C. & Sekimizu, K. (2007) *Drug Discov. Ther.*, 1, 89-93.
- 5) Inagaki, Y., Matsumoto, Y., Kataoka, K., Matsuhashi, N., & Sekimizu, K. (2012) *BMC Pharmacol. Toxicol.*, 13, 13.
- 6) Ishii, K., Hamamoto, H., Kamimura M., & Sekimizu, K. (2008) *J. Biol. Chem.*, 283, 2185-2191.

著者寸描

●浜本 洋 (はまもと ひろし)



東京大学大学院薬学系研究科微生物薬品化学教室助教。博士 (薬学)。

■略歴 1975年熊本県に生る。98年九州大学薬学部卒業。株式会社ゲノム創薬研究所を経て、2008年より現職等。

■研究テーマと抱負 カイコ細菌感染モデルを用いて得られた、新規抗生物質カイコシンの研究、及び開発。最近、それに加え次世代シーケンサーを用いた

新規病原性遺伝子の探索を行い、感染症治療に貢献したい。

■ウェブサイト http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~bisei/research_hamamoto.html

■趣味 写真撮影。