

〈総説〉

カイク感染実験系の有用性と課題 —ライソシンEの研究を中心として—

浜本 洋

帝京大学医真菌研究センター

(2016年6月27日受付)

従来の試験管内での抗菌活性を指標とした探索によって見出された抗生物質は、その大部分が体内動態や毒性の問題から感染個体に対し治療効果を示さない。従って、動物実験による治療効果の評価が必須となるが、近年では倫理的、コストの面から、実験動物代替モデルが必要とされてきている。そこで我々は、コストが安く倫理的な問題が無いため、多数の個体を感染実験に供することができるカイクに着目し、細菌感染モデルを用いた抗生物質の定量的な治療評価系を確立した。これまでの我々の研究から、カイクモデルを用いて抗生物質の治療効果、及び毒性が、哺乳動物と同等に評価可能であることを明らかにしている。カイクの様々な利点は、治療効果を指標とした新規抗生物質の探索に応用可能である。そこで本モデルを用いて、我々は実際に治療効果を指標とした探索を実施し、新規抗生物質ライソシンEを発見した。本総説ではカイクを利用した感染症治療薬開発法、及び、その利点と課題について解説する。

1. はじめに

感染症は、今なお全世界において主要な死亡原因であり続けている。また抗生物質の乱用により、多剤耐性菌が蔓延し社会的な問題となっている。2013年のアメリカ疾病管理予防センター(CDC)の推計によれば、米国では多剤耐性菌に少なくとも200万人以上が感染し、2.3万人が亡くなっていると報告されている。中でも多剤耐性黄色ブドウ球菌により、1万人以上が亡くなっていると推計されている¹⁾。さらに、近年、既存の抗生物質が全く効果を示さないスーパーバグが出

現し、深刻な問題になりつつある。従って、これまで以上に抗生物質の乱用を防ぐだけでなく、新たな治療薬の開発が必要とされている。

一方、新しい抗菌薬の探索は、その採算性に対する疑問から製薬会社が二の足を踏んでいるのが現状であり、新しい抗生物質の上市は年々減少している。このような現状を打開するため、米国では抗生物質の開発に対して優先審査の実施や、独占期間の延長などのインセンティブを設けている。すでに、いくつかの抗生物質の開発に、このインセンティブが与えられている。我が国においても、先の伊勢志摩サミットで新規抗生物質の開

発に8億円をかけるなどの対策が公表されている。

しかしながら、新規作用機序を有する抗生物質の開発は容易ではない。このような抗生物質の開発が困難な理由として、以下のような点があげられている。

- (1) 新規抗菌薬を発見したとしても、体内動態や毒性などに問題がある、いわゆるドラックライクでない化合物が大部分を占めること。
- (2) これまで、新規の抗生物質の発見を支えてきた、細菌の二次代謝産物からの、既存の物質の再発見率が高くなり、新規クラスの抗生物質の発見が困難になってきたこと。
- (3) 化合物ライブラリーからの探索においては、標的指向的な探索によって同定された化合物が細菌のトランスポーターで排泄されたり(特にグラム陰性菌では深刻な問題である)、標的特異性が低かったりするなどの理由により、抗菌活性を示さないものが大部分である。

このような問題を克服するためには、新しいアッセイ系を用いて、開発の早い段階で候補化合

物の治療効果を評価することが肝要であると考えられる。しかしながら、これまで治療効果の評価に用いられてきたマウスなどの哺乳動物モデルは、コストが高く、倫理的なハードルも高いため、気軽に用いることは不可能である。そこで、我々は新たな動物モデルとしてカイコに着目した。

2. カイコモデルの利点

カイコは、古来より絹の生産に用いられてきた産業昆虫である。蚕糸農家においては、桑の葉を利用して、夏の季節に多数の個体を安価に飼育する方法が確立されている。一方で、カイコを研究に用いるためには、個体差が少なく、健康な個体を、一年中得ることができるシステムの確立が必要である。カイコは、これまでの様々な研究から人工飼料を利用した、無菌的な飼育法が確立しており²⁾、哺乳動物における Specific pathogen free (SPF) に似たような個体を得ることができる。我々の研究室においても、主な病原体の感染経路である手指の消毒を注意することで、安定してば

表1. カイコと他のモデル動物との比較

	カイコ (幼虫)	ハチノスツツ リガ	ショウジョ ウバエ	ミツバチ	線虫	ゼブラ フィッシュ	マウス
サイズ	2-5cm	3-4cm	1-3mm	15-17mm	1mm	5cm	5-10cm
動き	緩慢(飛べない)	俊敏(飛ぶ)	緩慢(飛ぶ)	緩慢(飛ぶ、刺す)	泳ぐ	俊敏、泳ぐ	俊敏、跳ねる、噛む
飼育	容易、大量飼育可	容易	容易	やや困難	簡単	やや困難	簡単
コスト	安い	安い	安い	安い	安い	高い	高い
注射	容易	容易	困難	困難	困難	容易	容易
臓器の摘出	容易	容易	困難	容易	困難	容易	容易
倫理的規制	ない	ない	ない	ない	ない	ない	ある

らつきの少ない個体を毎週5000頭のカイコを飼育できている。このような動物はカイコ以外にはないのではないかと考えている(表1)。

また、カイコは昆虫であることから、いわゆる動物愛護の対象になっておらず、産業利用において倫理的な問題も規制もないという利点がある。また、カイコは昆虫の中でも比較的大きく、動きも緩慢であることから、ヒトの手で扱うことが容易であり、使い捨ての注射器を用いて注射実験を簡便に行うことができる。また、臓器や体液の分離も特別な器具を使わずで、簡単な薬理試験も可能である。さらに、カイコは古来より人間により飼育されてきたことから、さまざまな変異系統が保存されているなど、遺伝学的な研究にも利用されている。つまり、他の昆虫と異なり、系統管理が行われており、実験の再現性も得られやすい。他の昆虫は、ショウジョウバエなどの優れたモデルを除き、カイコほどには容易に実験に利用することは簡単ではなく、再現性にも問題がある場合が多い。従って、カイコは昆虫の中でも、医薬品の開発研究を行う上で、理想的なモデルであると言える。

3. カイコにおける薬物動態

薬の効果の発揮には、個体における薬物動態が

重要な鍵を握っている。カイコにも哺乳動物と同等の薬物動態に関わる臓器が存在している。例えば、薬物の吸収に関わる腸管や、薬物の代謝やエネルギー代謝に関わる肝臓に相当する脂肪体、薬物の排泄に関わる腎臓に相当するマルピーギ管が存在している(図1)。また、薬物動態に関わる4つの因子である、吸収・分布・代謝・排泄について、モデル薬物のカイコでの挙動を解析した結果、哺乳動物とよく一致していることを我々の研究から明らかにしている。例えば、ヒトにおける薬物の腸管からの吸収には、化合物の分子量と疎水性が影響することがわかっている。カイコでも同様の因子が腸管吸収性に影響することを報告している^{3,4)}。実際、抗生物質でも分子量が高く水溶性が高いバンコマイシンやカナマイシンはヒトでも経口吸収性がないが、カイコでも経口吸収性を示さなかった。また、カイコを用いてプロドラッグの腸管吸収性の評価も可能である。水溶性が高く腸管を透過できない抗生物質セフカペンナトリウムと、経口薬として市販するためにプロドラッグ化されたセフカペンピボキシルを、カイコにおいて評価した。その結果、プロドラッグは腸管を透過しカイコの体液中の濃度が上昇するが、元の化合物は腸管透過性が低いことがわかった(図2)。また、経口投与における治療効果はプロド

図1. カイコの薬物動態に関わる体の構造

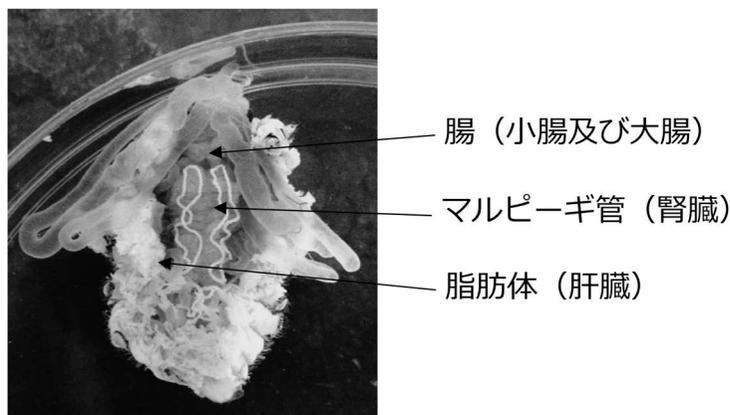
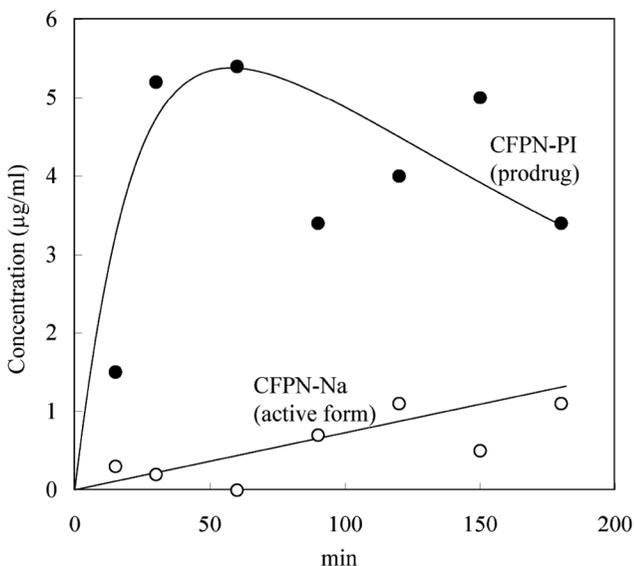
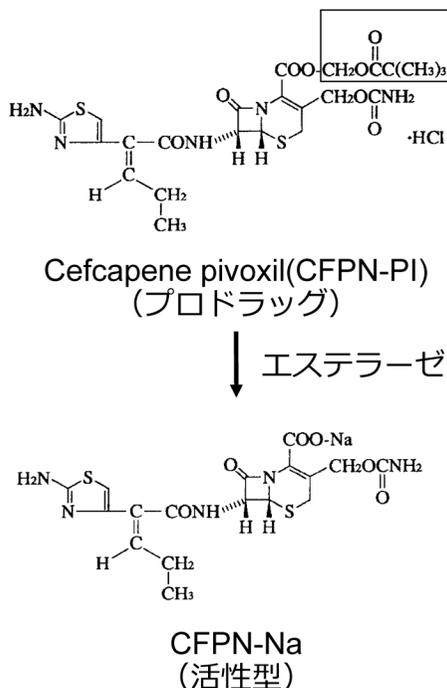


図2. プロドラッグのカイコ腸管の透過性



ラッグ化した方が高いことも明らかにしている。さらに、カイコにおいても、シトクロムP450による第1相反応の後、抱合酵素による第2相反応が起り、薬物が糞に排せつされるなど、ヒトと同様な薬物代謝反応が起こることを見いだしている⁵⁾。従って、カイコを用いることで抗生物質の薬物動態を加味した治療効果の評価を行うことができると思われる。

4. カイコを用いた毒性試験

カイコを用いて毒性試験も可能である。細胞毒性を示す化合物⁵⁾や、経済協力開発機構(OECD)のガイドラインに記載されている化合物をカイコに投与する⁶⁾と、哺乳動物(主にラット)におけるLD₅₀値とほぼ同程度の結果が得られることがわかっている(図3)。その相関係数は0.66であり、実験動物の基準である3R(Replacement, Reduction, Refinement)のうちReplacementにあたる実験動物代替モデルとして十分に利用可能で

ある⁶⁾。ただし、神経毒性や呼吸毒性を示す化合物などについては、乖離が認められることがわかっている⁵⁾。これは、カイコの神経に発現する受容体の種類が哺乳動物と異なっているためである。また呼吸に関して、カイコは受動呼吸で、能動呼吸の哺乳動物とは異なるため、呼吸中枢に作用する薬物の評価が難しい場合がある。ただし、Na⁺チャンネル阻害薬であるテトロドトキシンは、カイコを哺乳動物と同様に殺傷する。すべての呼吸抑制によって死に至る化合物が評価できないのではなく、その作用点によってカイコでも哺乳動物と同様な毒性を示す場合がある。従って、カイコを用いて候補化合物の毒性評価を行う際は、これらの生物学的な違いを考慮する必要がある。

5. カイコにおける抗生物質の治療効果の評価

当研究室の垣内らにより、カイコを用いた黄色

図3. カイコと哺乳動物における急性経口毒性の比較

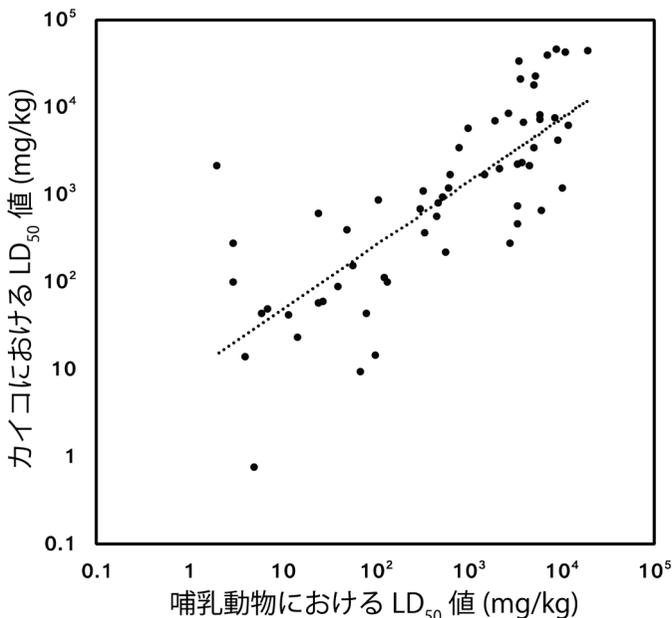


表2. カイコにおける抗生物質の治療効果

抗生物質	ED ₅₀ (mg/kg・animal)	
	カイコ	マウス
Teicoplanin	0.3	0.1
Vancomycin	0.3	1
Minocycline	4	1
Flomoxef	0.2	0.3
Linezolid	9	4
Katanosin B	0.1	0.7

ブドウ球菌と緑膿菌の感染モデルが確立していた⁷⁾。これまでに示したカイコの薬物動態の解析結果から、カイコにおいても哺乳動物と同様な抗生物質の治療効果が期待できる。実際に、黄色ブドウ球菌に感染したカイコに、臨床で使用されている抗生物質を投与すると例外なく治療効果を示した。その50%の生存に必要な体重あたりの薬剤

量 (ED₅₀ 値) を求めたところ、カイコモデルとマウスモデルでの値はよく一致していた (表2)³⁾。従ってカイコモデルを用いて、候補化合物の治療効果を定量的に評価可能であると考えられる。カイコモデルは倫理的な問題がなくコストが安いという利点を活かして、多数の個体を用いて、治療効果が明らかではない細菌の培養上清の治療効果

を簡便に評価できると考えた。そこで、我々はカイコ感染モデルを利用した治療効果を指標とした抗生物質の探索を実施した。

6. カイコ細菌感染モデルを利用した新規抗生物質の同定

著者らは、日本各地から採集した土壌細菌から調製した培養上清のうち、抗菌活性を示した全てのサンプルについて、カイコモデルで治療効果を評価した。その結果、分離した約14,000株のうち、3,800株が抗菌活性を示したが、カイコモデルで治療効果を示したのはたったの27株であった。従って、カイコモデルを利用することで、治療効果を示さない抗菌化合物を候補から除くことができ、治療効果を示すサンプルにリソースを集中することができる。

今日では、培養上清の二次代謝産物の網羅的な質量分析解析を行い、未知物質を同定する手法が確立しているが、未知物質があったとしても抗菌活性を示すか、さらには治療効果を示すかは、ある程度の量を精製しないことには判明しない。そ

こで、我々は治療効果を示した培養上清を、カイコ感染モデルにおける治療効果を指標に分画し、治療活性物質を精製し同定することとした。治療活性を示す画分に存在する化合物の分子量を測定し、その物性ととも、抗生物質データベースと比較することで、これまでに報告がない抗生物質を生産する培養上清を探索した。その結果、沖縄の土壌から分離した *Lysobacter* 属に分類される菌から、新規抗生物質ライソシンEを同定することに成功した⁸⁾。

7. ライソシンEの作用機序

ライソシンEは、分子量が1617とやや大きく、その構造から環状リポペプチド系抗生物質に属する(図4)。リポペプチド系抗生物質の仲間では臨床において使用されているものにダプトマイシンがあるが、構造が全く異なることから、その作用機序は異なっていると考えられた。ライソシンEは黄色ブドウ球菌に対してダプトマイシンと同様に膜障害性を有したが、ダプトマイシンが60分ぐらいで殺菌活性を示すのに対して、ライソシンE

図4. ライソシンEとダプトマイシンの構造

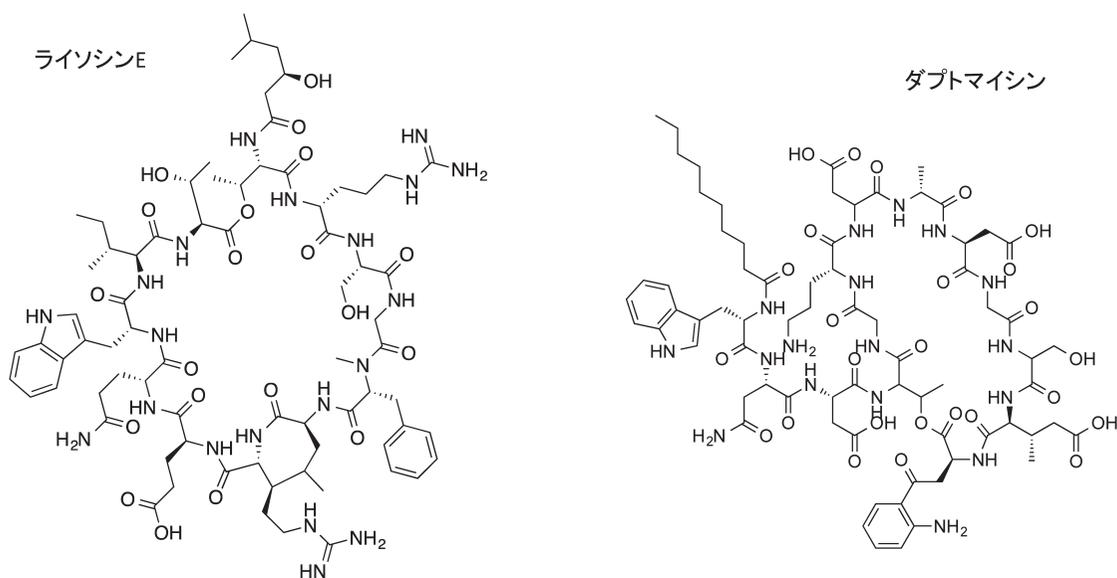


表3. 黄色ブドウ球菌に対するライソシンEの殺菌活性

時間 (分)	生存数 (CFU/ml)				
	ライソシンE	ゲンタマイシン	ダプトマイシン	バンコマイシン	薬剤なし
1	1.6×10^3	1.1×10^8	1.0×10^8	1.1×10^8	1.2×10^8
15	$<1.0 \times 10^2$	4.0×10^5	1.3×10^6	1.0×10^8	1.7×10^8
30	$<1.0 \times 10^2$	6.0×10^4	1.0×10^5	1.2×10^8	2.9×10^8
60	$<1.0 \times 10^2$	9.0×10^2	9.0×10^4	8.9×10^7	1.6×10^9

は薬剤の添加直後、すなわち1分以内という短時間に、99.99%の菌を殺菌するという強力な殺菌活性を示す(表3)。そこで、変異原処理した黄色ブドウ球菌からライソシンEに対する耐性菌を取得し、その変異遺伝子の解析したところ、黄色ブドウ球菌の電子伝達系の唯一の補酵素であるメナキノンの合成経路の遺伝子であることがわかった。一方で、ライソシンEはメナキノン合成を阻害しなかったことから、標的はメナキノン合成経路のタンパク質ではないと考えられた。また、培地にあらかじめメナキノンを加えておくとライソシンEの抗菌活性が抑制されたこと、さらに、ライソシンEとメナキノンを混合すると白濁が認められたことから、ライソシンEはメナキノンそのものと直接相互作用すると考えられた。そこで、それらの相互作用についてマイクロカロリーメトリーを用いて定量的に解析したところ、1:1で相互作用すること、及びKd値がMICと比較しても矛盾しないことが明らかになった。さらに、哺乳動物の電子伝達系の補酵素であるユビキノンとは全く相互作用を示さなかった。このことは、ライソシンEは細菌に対して高い選択毒性を示す理由を説明している。以上の結果から、ライソシンEは、これまでの抗生物質とは全く異なるメカニズムで抗菌活性を示していることがわかった。

8. ライソシンEの治療効果について

ライソシンEはカイコモデルで、0.3 mg/kgとい

う低用量で良好な治療効果を示した。そこでマウスモデルにおける治療効果を評価したところ、ほぼ同等な用量で治療効果を示した。このことから、カイコモデルを用いて探索された治療有効な化合物は、マウスモデルでも同様な治療効果を示すと考えられ、カイコモデルの創薬における有用性を明らかにできたと考えている。

また、先にも述べたが、ライソシンEをED₅₀値の500倍以上の用量を単回投与してもマウスは殺傷されず、高い安全性を示した。従って、ライソシンEは臨床応用可能な抗生物質であると期待され、現在初期検討を行っている。

まとめ

多剤耐性菌に対して有効な抗菌薬の開発は非常に重要な課題となっているが、現在の製薬会社のパイプライン上にある化合物は、既存薬の改良にとどまっているものが多く、新しいメカニズムをもつ新規のクラスの化合物は極めて限られている。著者らが確立したカイコモデルは、従来の試験管内での探索では同定され得なかった、ライソシンEのような新しいメカニズムを有する抗生物質を発見するのに有用であると考えられる。また、本アッセイ系で同定されたライソシンEについては、日本発の新規抗生物質の実用化を目指したいと考えている。

謝辞

本総説は、2016年3月24日に学士会館で開催された「メディカル・サイエンスセミナー」の講演内容をまとめたものである。本講演の機会を頂きました理化学研究所の長田裕之先生に改めて感謝申し上げます。また、総説の執筆の機会を頂いた、日本感染症医薬品協会の佐原久世様にも深く感謝申し上げます。

利益相反の開示

開示すべき事項なし。

文献

- 1) CDC: Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013. 2013
- 2) ITO, T.: Nutritive values of carbohydrates for the silkworm, *Bombyx mori*. *Nature* 187: 527, 1960
- 3) HAMAMOTO, H.; K. KUROKAWA, C. KAITO, *et al.*: Quantitative evaluation of the therapeutic effects of antibiotics using silkworms infected with human pathogenic microorganisms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48: 774~779, 2004
- 4) HAMAMOTO, H.; K. KAMURA, I. M. RAZANAJATOVO, *et al.*: Effects of molecular mass and hydrophobicity on transport rates through non-specific pathways of the silkworm larva midgut. *Int. J. Antimicrob. Agents* 26: 38~42, 2005
- 5) HAMAMOTO, H.; A. TONOIKE, K. NARUSHIMA, *et al.*: Silkworm as a model animal to evaluate drug candidate toxicity and metabolism. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 149: 334~339, 2009
- 6) USUI, K.; S. NISHIDA, T. SUGITA, *et al.*: Acute oral toxicity test of chemical compounds in silkworms. *Drug Discov. Ther.* 10: 57~61, 2016
- 7) KAITO, C.; N. AKIMITSU, H. WATANABE, *et al.*: Silkworm larvae as an animal model of bacterial infection pathogenic to humans. *Microb. Pathog.* 32: 183~190, 2002
- 8) HAMAMOTO, H.; M. URAI, K. ISHII, *et al.*: Lysocin E is a new antibiotic that targets menaquinone in the bacterial membrane. *Nature Chem. Biol.* 11: 127~133, 2015

Advantage and issue of silkworm model for development of anti-infective agents

HIROSHI HAMAMOTO

Teikyo University Institute of Medical Mycology

We established silkworm infection model for developing a novel antibiotic. Silkworm model has less ethical issues and is low cost compared to mammalian model, thus allow us to use a lot of individuals for screening assay. In addition, we can evaluate therapeutic activity and toxicity of candidate samples because silkworm has similar pharmacokinetics as mammals. Using this system, we identified a novel antibiotic named “Lysocin E”. In this review article, we describe advantages of silkworm model for development of antimicrobial agents.