

カイコを用いた化学物質の毒性評価方法の確立

東京大学大学院薬学系研究科 微生物薬品化学教室

関水 和久

Silkworm is less ethical and low cost animal model compared to mammals. We found metabolic pathway in silkworm is equivalent in mammals and LD₅₀ values of several compounds in silkworm is also similar that in mammals. It is suggesting silkworm would be good alternative model for toxicity evaluation of chemicals. In this study, we analyzed cytochrome P450 function, which is important factor on drug metabolisms, and established human metabolism mimic model by transgenic technique. Furthermore, massive toxicity evaluation was performed in silkworm model.

1. 緒言

動物愛護の視点から、動物実験を規制する動きが国際的に強まっており、3Rと呼ばれる動物実験の規制についての国際基準化がなされるようになった¹⁾。化粧品へ添加する化合物の開発について、哺乳動物を犠牲にする実験についての法律による規制が欧米各国で進んでいる。従来の代替モデルとしては、細胞を利用した毒性試験が行われているが、このモデルでは代謝経路を有さないため、実際の個体における毒性を評価することができない。従って、個体でも倫理的な問題がない非脊椎動物を利用した毒性評価方法が必要と考えられる。そこで我々は、倫理的な問題がない昆虫であるカイコに着目した。カイコは、養蚕業から購入でき、飼育も容易で、ほどよい大きさがあるため注射も簡便である^{1, 2)}。この特長を活かして、我々は、カイコを感染症のモデル動物として利用し、細菌の病原性の評価や、抗生物質の評価系として利用している^{3, 4)}。このカイコ細菌感染モデルにおいて、臨床で使用されている抗生物質は、体重あたりに換算したとき、哺乳動物と同様な用量で治療効果を示した。さらに、我々はこの治療効果を指標とした探索を行い、新規抗生物質カイコシンの発見に成功している。また、カイコの薬物動態についても解析を行い、モデル化合物であるエトキシマリンはヒトと同様なシトクロームP450による第一相反応による代謝に続く、第二相の抱合反応を受け排泄されることを見いだしている⁵⁾。さらに、カイコでの典型的な細胞毒性を示すいくつかの化合物の個体の半数を殺傷するのに必要な用量(LD₅₀値)が、哺乳動物と一致することを見いだしている⁵⁾。そこで、我々

はカイコを化合物の毒性評価系として利用できるのではないかと考え、本研究において、カイコにおける薬物の体内動態、及びシトクロームP450反応の詳細な解析、及びさらに多数の化合物の毒性評価を実施した。

2. 実験

2.1 薬物の体内動態の解析

Hu・Yo×Tukuba・Ne系統のカイコの卵を愛媛蚕種から購入し、5齢幼虫まで抗生物質含有人工飼料(片倉工業)を与えて飼育した。薬液をその5齢幼虫(1.8-2.0g)に注射し、一定時間後に腹肢を切断し体液を採取した。50%アセトンにて薬剤の抽出を行い、HPLC(PEGASIL ODS SP100(4.5φ250mm)、流量1mL/min)にて解析した。HPLCのクロマトグラムのピーク面積から検量線を作成し、サンプル中の化合物を定量した。移動相はバンコマイシン(アセトニトリル:20mMリン酸二水素ナトリウム=92:8)、テトラサイクリン(メタノール:5mMEDTA=30:70)、クロラムフェニコール(メタノール:20mMリン酸カリウム緩衝液=45:55)、フルコナゾール(アセトニトリル:25mM酢酸緩衝液=1:4)、リファンピシン(40%アセトニトリル0.05%ギ酸)、ミカファンギン(40%アセトニトリル0.1%トリフルオロ酢酸)、ケトコナゾール(30%アセトニトリル0.05%ギ酸)、クロトリマゾール(40%アセトニトリルリン酸溶液pH3)のアイソクラティックで行った。

2.2 シトクロームP450反応の解析

代謝の場の検討

5齢4日目以降のカイコを緩衝液(10mM HEPES 0.9% NaCl pH7.9)中で解剖し、各組織を摘出した。摘出組織は、10%牛血清を含有するTC-100昆虫細胞培養用培地を2ml中で培養し、7-ethoxycoumarinを終濃度6μMとなるように加え、27°Cで震盪培養した。経時的に培地及び臓器を回収し、ホモジナイズ後、50%アセトン抽出し蒸発乾固した。この試料を50mM酢酸ナトリウム緩衝液pH=6.0



Establishment of the toxic evaluation method of the chemical substance using the silkworm model

Kazuhisa Sekimizu

Laboratory of Microbiology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo.

に再溶解し、抱合反応により負荷されたグルコースをβ-galucosidase処理により除去後、緩衝液(1.6M glycine/NaOH pH10.5)と1:15で混合し、7-エトキシクマリンからシトクロームP450反応によって生じたヒドロキシクマリン量を蛍光測定(Ex=380nm/Em=460nm)によって定量した。

シトクロームP450反応の検討

カイコ腸管を用いて上記と同じ手法によって器官培養した。基質を培地に加え培養後、腸管及び培地をホモジナイズし50%アセトン抽出し、蒸発乾固した。蒸発乾固した試料を50%メタノールに再溶解し、HPLC分析試料とした。Luciferin誘導体については、培地サンプルをDetection reagentと混合してルミノメーターにより定量した。

シトクロームP450の発現解析

5齢のカイコをHEPES/NaCl緩衝液中で解剖し、腸管・脂肪体・マルピーギ管を摘出し、mRNAを抽出した。得られたmRNAから逆転写酵素によってcDNAを調製し、それを鋳型にしてシトクロームP450用プライマーとカイコアクチンBmA3用プライマー⁶⁾でPCRによって増幅した。PCR産物を1.5%アガロースゲルに供して100Vで1時間通電した。4mg/ml エチジウムブロマイドによって染色し、UV照射下でバンドの有無を確認した。カイコゲノム情報データベース KAIKObase (<http://sgp.dna.affrc.go.jp/KAIKObase/>)⁷⁾においてシトクロームP450と分類されている遺伝子を81種類選抜した。これらの遺伝子を対象遺伝子とした。

2.3 ヒト型シトクロームP450発現カイコの樹立

農業生物資源研究所の瀬筒らのグループとの共同研究により、カイコw1-PND系統を用いて、ヒト型シトクロームP450 1A2遺伝子発現系統を樹立した。シトクロームP450 1A2遺伝子はUASプロモーターの下流に接続されており、GAL4遺伝子発現系等と交配することによって、その遺伝子発現が起こるように設計されている⁸⁾。

2.4 ヒト型シトクロームP450発現カイコの解析

ヒト型シトクロームP450 1A2の発現は、それぞれの系統のカイコの脂肪体を摘出し、タンパク質を調製した後、抗ヒトシトクロームP450 1A2抗体(abcam)によりウェスタンブロッティング法により解析した。検出はWestern Lightning ECL Plus (PerkinElmer)を用いた。カフェインの血中濃度は、5齢の2gのカイコシトクロームP450 1A2トランスジェニックカイコに1mMのカフェイン溶液を50μl注射し、経時的に血液を採取し、50%アセトン抽出した物をHPLCにて解析した。固相をPEGASIL ODS SP100カ

ラム(センシユー科学)を用い、移動相は0.05%ギ酸を含む10%アセトニトリルで分析を行った。また、カフェインの毒性試験は、5齢1日のトランスジェニックカイコを体重測定後、50mMのカフェイン溶液を50μl注射し餌を与えて飼育し、経時的に体重測定を行った。

2.5 カイコを用いた毒性試験

5齢1日目、もしくは2日目のカイコに、それぞれの化合物を腸管内、もしくは体液内に注射した。注射2日後のカイコの生存数を測定し、その生存曲線から50%のカイコの殺傷に必要な化合物の体重あたりの投与量(LD₅₀値)を求めた。

3. 結果

3.1 カイコにおける薬物の体内動態の解析

すでに我々は、抗生物質のカイコ感染モデルにおける治療に必要な用量(ED₅₀値)が哺乳類感染モデルでの値と一致することを報告している³⁾。この結果は、薬物のカイコにおける体内動態が哺乳類と共通していることを示唆している。この点をさらに検証するために、本研究で我々は、薬物のカイコにおける血中濃度推移を、哺乳類での既存の報告と比較した。その結果、カイコ血液における抗生物質の濃度推移は哺乳類の血液内におけるそれと同様にα層及びβ層の二相性を示すことが判った(図1)。さらに、種々の体内動態パラメーターを算出したところ(表1)、薬物が血液以外のコンパートメントに分布する割合の指標となるVdss値はカイコと哺乳類で、0.4~9倍の範囲内であった。また、抗生物質の体内からの消失速度を示すCl_{tot}値は、カイコと哺乳類の間で0.1~16倍の範囲であり、テトラサイクリンが最も低く、リファンピシンが最も高い値を示した。それら以外の薬物についてはカイコと哺乳類で一致が見られた。従って、カイコにおける化合物の薬物動態は、哺乳動物の場合とよく一致していると考えられる。

3.2 カイコにおけるシトクロームP450の解析

カイコにおけるシトクロームP450反応の場がどこであるかを明らかにするため、カイコ摘出組織を用いて器官培養での7-エトキシクマリンの代謝を検討した。7-エトキシクマリンはヒトにおいてシトクロームP450によって脱エチル化されることが知られている化合物であり、すでにカイコ体内において代謝されることを見いだしている⁵⁾。実験の結果、脂肪体、マルピーギ管、絹糸腺においてはほとんど代謝物が検出されず、腸管において最も強い活性が見出された(図2)。さらに、カイコ腸管培養系における7-ethoxycoumarinの脱エチル化反応はシトクロームP450の阻害剤であるシメチジン⁹⁾の添加によって用量依存的に抑制を受けた。この結果から、腸管がシトクロームP450

の反応の場になっていると考えられる。次に、カイコの腸管においてシトクロームP450遺伝子が発現しているかをRT-PCRによって解析した結果、ゲノム上に存在するシトクロームP450と推定される81種類の候補遺伝子のうち、28種類の遺伝子の発現が確認された(表2)。これらの腸管で発現が確認された遺伝子について、脂肪体及びマルピ

ーギ管における発現を同様に検討し、腸管特異的に発現しているシトクロームP450が5つ見いだされた。従って、カイコ腸管において、シトクロームP450遺伝子が発現し、その薬物代謝活性を担っていると考えられる。

そこで、実際にヒトシトクロームP450の基質をカイコ腸管培養系に加え、それらが代謝されるか否か検討した。

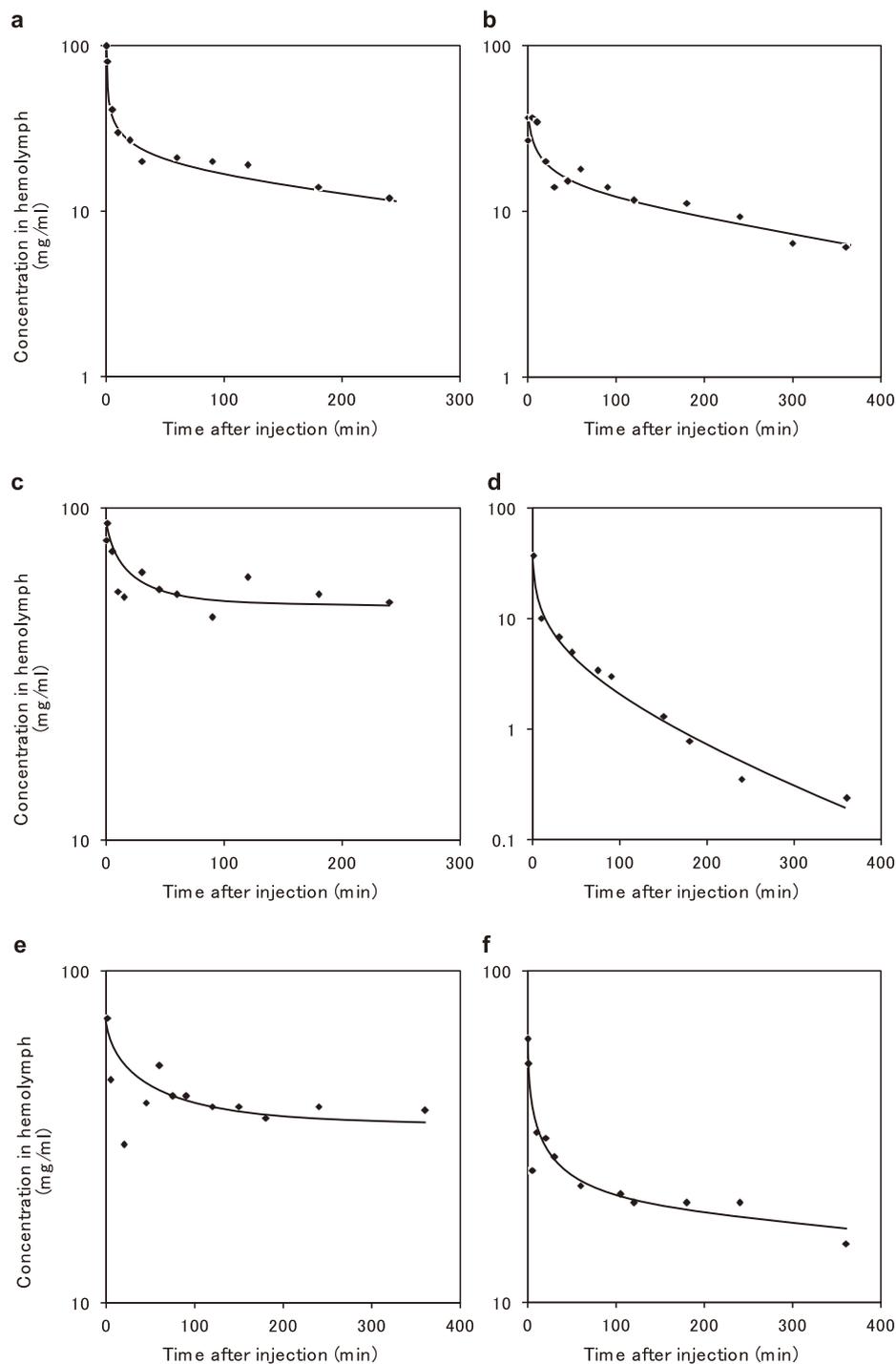


図1 カイコにおける化合物の体内動態

カイコ5齢幼虫に各抗生物質量を血中内投与した後に、経時的に血液を採取し抗生物質濃度をHPLCによって定量した。a.chloramphenicol, b.tetracycline, c.vancomycin, d.rifampicin, e.micafungin, f. flucomazole.

表1 カイコと哺乳類における抗生物質の体内動態パラメーターの比較

各抗生物質のカイコ血液内における濃度推移のデータ (図1) から、全身クリアランス (CLtot), 定常状態における分布容積 (Vdss), 消失過程における分布容積 ($t_{1/2}$) を算出し、哺乳類における値と比較した。chloramphenicol, vancomycin はヒト^{10, 11)}、tetracycline はウサギ¹²⁾、rifampicin はヒツジ¹³⁾、micafangin はラット¹⁴⁾、fluconazole はイヌ¹⁵⁾ のデータを引用した。

Antibiotics	Silkworm				Mammal			
	Dose (mg/g)	CLtot (ml/g•h)	Vdss (ml/g)	$t_{1/2}$ (h)	Dose (mg/g)	CLtot (ml/g•h)	Vdss (ml/g)	$t_{1/2}$ (h)
chloramphenicol	50	0.15	1.3	6.0	10	0.24	0.9	2.3
tetracycline	10	0.07	0.6	5.5	10	0.35	1.0	2.0
vancomycin	25	0.03	0.4	13.0	8	0.08	0.6	2.6
rifampicin	25	2.11	3.1	1.0	10	0.31	1.3	2.9
micafangin	25	0.03	0.5	12.0	1	0.07	0.4	5.0
fluconazole	25	0.02	0.4	12.0	10	0.04	0.7	13.0

表2 カイコ腸管において発現が確認された遺伝子

カイコ腸管から mRNA を調製し、カイコゲノム情報中のシトクローム P450 候補遺伝子について RT-PCR によって発現を確認した。相同性は BLAST 検索を用いて行った。

gene name	similar gene
BGIBMGA001162	<i>Bombyx mori</i> cytochrome P450 CYP4G25 (Cyp4g25)
BGIBMGA001276	<i>Zygaena filipendulae</i> cytochrome P450 CYP333B8 mRNA
BGIBMGA001419	<i>Bombyx mandarina</i> cytochrome P450 Cyp6b29 mRNA
BGIBMGA001573	<i>Bombyx mori</i> cytochrome P450 Cyp6AU1 (Cyp6au1)
BGIBMGA002085	<i>Acyrtosiphon pisum</i> similar to cytochrome P450
BGIBMGA003683	<i>Bombyx mori</i> cytochrome P450 monooxygenase Cyp4M5 (Cyp4m5)
BGIBMGA003943	<i>Bombyx mori</i> strain Dazao cytochrome P450 CYP9A19 mRNA
BGIBMGA003944	<i>Bombyx mori</i> cytochrome P450 (Cyp9a19)
BGIBMGA003945	<i>Bombyx mori</i> cytochrome P450 9a20 (Cyp9a20)
BGIBMGA003957	<i>Bombyx mori</i> cytochrome P450 (CYP9A22) mRNA
BGIBMGA004721	<i>Papilio xuthus</i> CYP341A2 gene for cytochrome P450
BGIBMGA005356	<i>Zygaena filipendulae</i> cytochrome P450 CYP333B8 mRNA
BGIBMGA005496	<i>Bombyx mori</i> cytochrome P450 (Cyp315a1)
BGIBMGA006785	<i>Bombyx mori</i> strain Dazao cytochrome P450 mRNA
BGIBMGA006915	<i>Drosophila melanogaster</i> phm gene for cytochrome P450 Cyp306a1
BGIBMGA006916	<i>Bombyx mori</i> cytochrome P450 18a1 (Cyp18a1)
BGIBMGA006936	<i>Bombyx mori</i> cytochrome P450 monooxygenase (Cyp306a1)
BGIBMGA007195	<i>Spodoptera litura</i> cytochrome P450 (CYP4S9v1)
BGIBMGA009522	<i>Drosophila melanogaster</i> Cyp301a1 (Cyp301a1)
BGIBMGA011708	<i>Bombyx mori</i> cytochrome P450 (P450) similar to CYP305a1 of <i>Drosophila melanogaster</i>
BGIBMGA012089	<i>Bombyx mori</i> cytochrome P450 (Cyp6ab5)
BGIBMGA012385	<i>Bombyx mori</i> cyp6AB4 mRNA for cytochrome 6AB4
BGIBMGA012386	<i>Bombyx mandarina</i> CYP6AB4 mRNA
BGIBMGA013236	<i>Bombyx mori</i> cytochrome P450 Cyp6ae21
BGIBMGA013237	<i>Bombyx mori</i> cytochrome P450 6ae2 (Cyp6ae2)
BGIBMGA013238	<i>Bombyx mori</i> cytochrome P450 CYP6AE7 (Cyp6ae7)
BGIBMGA013240	<i>Bombyx mori</i> cytochrome P450 CYP6AE7 (Cyp6ae7)
BGIBMGA013241	<i>Bombyx mori</i> cytochrome P450 CYP6AE7 (Cyp6ae7)

その結果、検討した14種の化合物のうち、大部分の13種が代謝されることが分かった(表3)。ヒトシトクロームP450 1A2で代謝されるカフェインについては、カイコ腸管培養系で代謝が認められなかった。

3.2 ヒト型シトクロームP450発現カイコの樹立と解析

樹立したUAS-hCYP450 1A2遺伝子を染色体上に有するカイコと、エンハンサーランプ系統であるBmA3-gal4遺伝子を染色体上に有するカイコを交配し、スクリーニングを行ったところUAS-hCYP450 1A2 / BmA3-gal4, UAS-hCYP450 1A2, BmA3-gal4を有する個体、および両方持たない個体がおよそ1:1:1の割合で発生した。この結果はそれぞれの遺伝子が染色体上に単独で導入されて

いることを示唆している。さらにそれぞれの個体について組織脂肪体のマイクロソーム画分を調製し、ウエスタンブロットに供したところ、UAS-hCYP450 1A2/BmA3-gal4特異的にシトクロームP450 1A2タンパク質の発現が確認された(図4A)。以上の結果からシトクロームP450 1A2トランスジェニックカイコが作出されたと判断した。次に、カイコにおけるカフェインの血中濃度推移を測定した。その結果、12時間後の血液内濃度は野生型に比べシトクロームP450 1A2トランスジェニックカイコにおいて有意に低い濃度であった(図4B)。また、半減期は野生型で50時間以上だったのに対しシトクロームP450 1A2トランスジェニックカイコにおいては16時間であった。従って、カイコにおいてヒト型シトクロームP450が発現し、

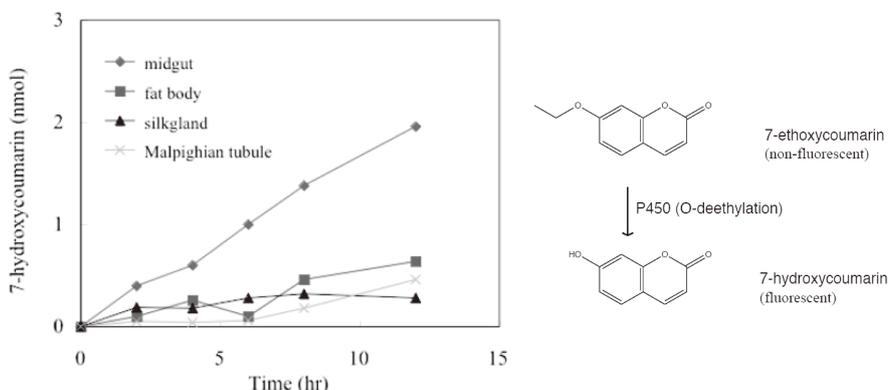


図2 カイコ組織培養系における7-エトキシクマリンの脱エチル化反応
カイコから各組織を抽出し、in vitroの器官培養系を構築した。7-エトキシクマリンを基質として反応を行い、代謝物である7-エトキシクマリンの量を蛍光光度計によって定量した。

表3 カイコ腸管培養系におけるヒトシトクロームP450基質の代謝反応の有無

カイコ腸管培養系にそれぞれの基質を加え、20分後の薬剤量の減少、もしくはLuciferinの生成による発光量の増大により、代謝の有無を検討した。

薬物	代謝に関わるP450種(ヒト)	カイコでの代謝
フェナセチン	1A2	あり
ジクロフェナク	2C9	あり
オメプラゾール	2C19	あり
アミノピリン	2C	あり
デキストロメトर्फアン	2D6	あり
7-エトキシクマリン	2E1	あり
テストステロン	3A4	あり
リファンピシン	3A4	あり
Luciferin-CEE	1A1	あり
Luciferin-ME	2C8	あり
Luciferin-IPA	3A4	あり
Luciferin-PFBE	3A4	あり
Luciferin-BE	3A7	あり
カフェイン	1A2	なし

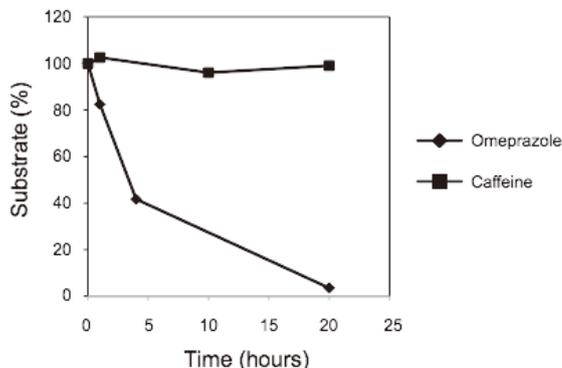


図3 カイコ腸管培養系においてカフェインの代謝
カイコ腸管培養系にカフェイン及びオメプラゾールを加えて培養し、経時的に基質量をHPLCによって定量した。オメプラゾールはカイコ腸管培養系において代謝を受けるポジティブコントロールとして用いた。

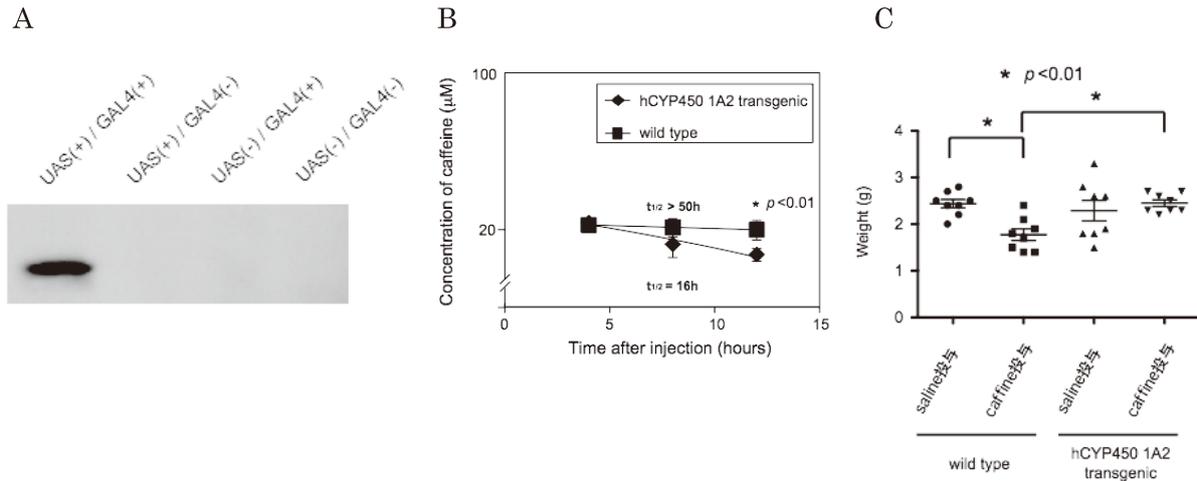


図4 ヒト型シトクローム P450 1A2 トランスジェニックカイコのカフェイン代謝能の獲得

- A) カイコ脂肪体における導入したヒト型シトクローム P450 1A2 の発現
- B) トランスジェニックカイコにおけるカフェインの血中濃度推移
- C) トランスジェニックカイコにおけるカフェインの過剰投与による毒性の軽減

表4 カイコにおける毒性試験

腸管内投与 (*i.m.* : intra midgut) は哺乳動物における経口投与 (*p.o.*) と対応しており、体内内投与 (*i.h.* : intra hemolymph) は哺乳動物における血液内投与 (*i.v.*)、腹腔内投与 (*i.p.*)、及び皮下投与 (*s.c.*) に対応している。

毒物	LD ₅₀ (mg/kg · animal)					
	カイコ	投与経路	哺乳動物	投与経路	動物	比 (カイコ/動物)
ピペラジン	620	<i>i. h.</i>	1300	<i>i. v.</i>	rat	0.5
四塩化炭素	2000	<i>i. h.</i>	5800	<i>i. v.</i>	rabbit	0.3
クレゾール	710	<i>i. m.</i>	2000	<i>p. o.</i>	rat	0.4
硫酸鉄	410	<i>i. m.</i>	1500	<i>p. o.</i>	rat	0.3
硫酸銅	430	<i>i. m.</i>	960	<i>p. o.</i>	rat	0.4
ベンゼン	2600	<i>i. h.</i>	340	<i>i. p.</i>	mouse	8
ホルムアルデヒド	280	<i>i. h.</i>	87	<i>i. p.</i>	rat	3
アセトン	5200	<i>i. h.</i>	1300	<i>i. p.</i>	mouse	4
水酸化ナトリウム	270	<i>i. h.</i>	40	<i>i. p.</i>	mouse	7
トリクロル酢酸	1100	<i>i. h.</i>	270	<i>s. c.</i>	mouse	4
1,4-ビス(sec-ブチルアミノ)ベンゼン	350	<i>i. h.</i>	50	<i>i. p.</i>	mouse	7
スチレン	2100	<i>i. h.</i>	90	<i>i. v.</i>	mouse	23
フタル酸-n-ブチル	5900	<i>i. h.</i>	720	<i>i. v.</i>	mouse	8.2
プロモホルム	2000	<i>i. h.</i>	400	<i>i. p.</i>	rat	5
ロテノン	6	<i>i. h.</i>	2.5	<i>i. p.</i>	mouse	2.5
4-クロロアニリン	830	<i>i. h.</i>	420	<i>i. p.</i>	rat	2
DMSO	27000	<i>i. h.</i>	12000	<i>i. p.</i>	rat	2.2
DMF	15000	<i>i. m.</i>	2800	<i>p. o.</i>	rat	5.4
フェノール	630	<i>i. h.</i>	310	<i>i. p.</i>	mouse	2
塩化ナトリウム	8900	<i>i. h.</i>	4000	<i>i. p.</i>	mouse	2.2
アジ化ナトリウム	273	<i>i. m.</i>	45	<i>i. p.</i>	rat	6.1
青酸カリウム	97	<i>i. h.</i>	8.7	<i>s. c.</i>	mouse	11
エタノール	8800	<i>i. m.</i>	10000	<i>p. o.</i>	mouse	0.9
メタノール	2100	<i>i. h.</i>	2100	<i>i. v.</i>	rat	1
アクリルニトリル	60	<i>i. h.</i>	69	<i>i. p.</i>	rabbit	0.9
エチレングリコール	32000	<i>i. m.</i>	7200	<i>p. o.</i>	rat	4.4
クエン酸	8500	<i>i. m.</i>	6500	<i>p. o.</i>	rat	1.3
乳酸	5000	<i>i. m.</i>	3600	<i>p. o.</i>	rat	1.4
グリセリン	>50000	<i>i. m.</i>	20000	<i>p. o.</i>	rat	>2.5

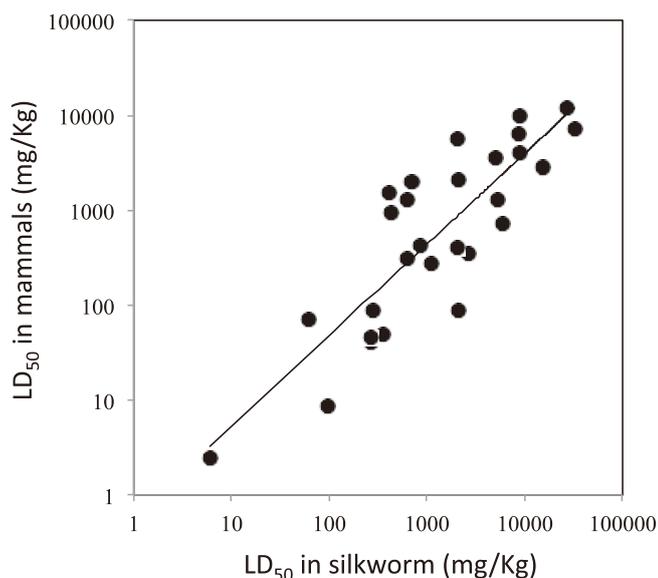


図5 化合物のLD₅₀値のカイコモデルと哺乳動物モデルにおける相関

毒性が低く、カイコにおけるLD₅₀値を算出できなかったグリセリンを除いた化合物についてプロットした。

機能していると考えられる。さらに、カフェインの毒性が軽減されるか否かについて検討した。野生型のカイコに高濃度のカフェインを投与し飼育するカイコの体重増加が抑制される(図4C)。しかしながら、ヒト型シトクロームP450 1A2発現カイコの場合は、その体重増加の抑制がほとんど起こらず、カフェインの毒性が軽減されていることが分かった(図4C)。以上の結果は、ヒト型シトクロームP450 1A2トランスジェニックカイコにおいて、シトクロームP450 1A2タンパク質が機能し、その代謝活性を評価可能であることを示している。

3.3 カイコを用いた毒性試験

様々な化合物について、カイコに投与し、そのLD₅₀値を求めた。その結果、スチレンと青酸カリウムを除き、ラットにおける結果と比較し10倍以内であった(表4)。スチレンは中枢神経に対する作用があることが知られており、神経系の受容体が哺乳動物と異なるカイコでは毒性が低い可能性が考えられる。カイコと哺乳動物でのそれぞれの化合物LD₅₀値をプロットし相関係数を求めたところ、 $R^2=0.72$ であり良好な相関を示すと考えられる(図5)。

4. 考 察

本研究より、カイコにおける薬物の分布容積や排泄速度は、ほぼ哺乳動物における値と一致していた。また、ヒトにおいてシトクロームP450によって代謝される大部分の化合物は、カイコにおいても同様に代謝されることが明らかになった。そのシトクロームP450による外来化合物の

代謝の場合は、カイコにおいては腸管であると考えられた。これは、開放血管系であるカイコにおいて、腸管から透過した化合物は、直ちに臓器が接触している体液に移行するため、外界との唯一のバリアになっている腸管で化合物が代謝されることは理に適っていると考えられる。さらに、カイコではできなかったカフェインの代謝が、ヒト型シトクロームP450遺伝子の導入によって可能となった。このように、ヒト型のシトクロームP450遺伝子を導入したトランスジェニックカイコを利用することによって、ヒトを模擬した薬物動態の評価が可能になると考えられる。

さらに、本研究においてカイコを毒性評価の実験動物代替モデルとして利用可能であるか検討した。その結果、すでに浜本らの論文⁵⁾において述べたように、神経毒性が主たる毒性の作用を示す化合物を除けば、LD₅₀値はカイコと哺乳動物モデルとで一致することが改めて示された。また、相関係数も良好であった。以上の結果から、カイコは薬物動態を反映した毒性試験の実験動物代替モデルとして利用できると期待される。カイコを用いた化合物の毒性試験方法は、3RのうちのReplacementに適合するものである。近年の動物愛護の高まりから、その重要性は、我が国を含めたアジア諸国においても、今後益々強まると予想される。

(引用文献)

- 1) Sekimizu, N., Paudel, A. & Hamamoto, H. Animal welfare and use of silkworm as a model animal. *Drug Discov Ther* **6**, 226-229 (2012).
- 2) Hamamoto, H. & Sekimizu, K. Evaluation of the therapeutic effects of antibiotics using silkworm as an animal model. *Res Adv in Antimicrob Agents Chemother* **5**, 1-23 (2005).
- 3) Hamamoto, H. *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) Kaito, C. *et al.* Silkworm pathogenic bacteria infection model for identification of novel virulence genes. *Molecular microbiology* **56**, 934-944 (2005).
- 5) Hamamoto, H., Tonoike, A., Narushima, K., Horie, R. & Sekimizu, K. Silkworm as a model animal to evaluate drug candidate toxicity and metabolism. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* **149**, 334-339 (2009).
- 6) Kawaoka, S. *et al.* Functional analysis of four Gloverin-like genes in the silkworm, *Bombyx mori*. *Arch Insect Biochem Physiol* **67**, 87-96 (2008).
- 7) Shimomura, M. *et al.* KAIKObase: an integrated

- silkworm genome database and data mining tool. *BMC genomics* **10**, 486 (2009).
- 8) Imamura, M. *et al.* Targeted gene expression using the GAL4/UAS system in the silkworm *Bombyx mori*. *Genetics* **165**, 1329-1340 (2003).
- 9) Ruffalo, R.L., Thompson, J.F. & Segal, J.L. Diazepam-cimetidine drug interaction: a clinically significant effect. *Southern medical journal* **74**, 1075-1078 (1981).
- 10) Koup, J.R., Lau, A.H., Brodsky, B. & Slaughter, R.L. Chloramphenicol pharmacokinetics in hospitalized patients. *Antimicrob Agents Chemother* **15**, 651-657 (1979).
- 11) Brown, N. *et al.* Effects of hepatic function on vancomycin clinical pharmacology. *Antimicrob Agents Chemother* **23**, 603-609 (1983).
- 12) Percy, D.H. & Black, W.D. Pharmacokinetics of tetracycline in the domestic rabbit following intravenous or oral administration. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire* **52**, 5-11 (1988).
- 13) Sweeney, R.W., Divers, T.J., Benson, C. & Collatos, C. Pharmacokinetics of rifampin in calves and adult sheep. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics* **11**, 413-416 (1988).
- 14) Niwa, T. *et al.* Tissue distribution after intravenous dosing of micafungin, an antifungal drug, to rats. *Biol Pharm Bull* **27**, 1154-1156 (2004).
- 15) Humphrey, M.J., Jevons, S. & Tarbit, M.H. Pharmacokinetic evaluation of UK-49,858, a metabolically stable triazole antifungal drug, in animals and humans. *Antimicrob Agents Chemother* **28**, 648-653 (1985).