

図 9 高血糖カイコにおけるインスリン抵抗性

18 時間餌を食べたカイコの脂肪体を摘出し、1 時間ヒトインスリン処理を行った。脂肪体のタンパク質を抽出し、ウェスタンブロットを行った。

N.D.; 通常餌、G.D.; 高グルコース餌、

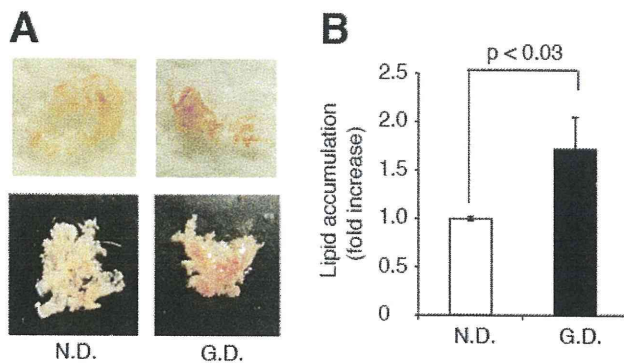


図 10 高血糖カイコの脂肪体における脂質の蓄積量の増加

18 時間餌を食べたカイコの脂肪体を摘出し、Oil Red O 染色を行った。写真(A)、定量結果(B)。

N.D.; 通常餌、G.D.; 高グルコース餌、

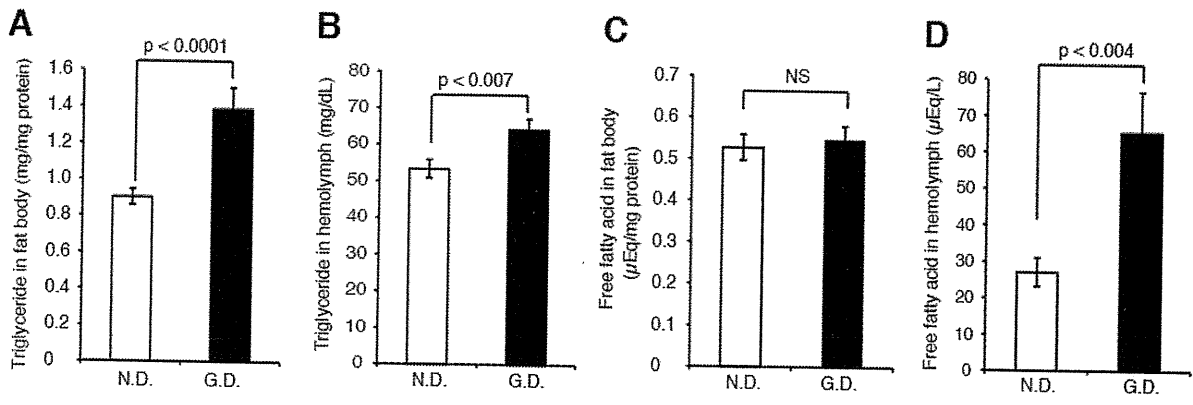


図 11 糖尿病カイコにおけるトリグリセリド、遊離脂肪酸量の増加  
 脂肪体(A)、体液中(B)のトリグリセリド量、及び脂肪体(C)、体液中(D)の遊離脂肪酸量を示す。  
 N.D.; 通常餌、G.D.; 高グルコース餌、

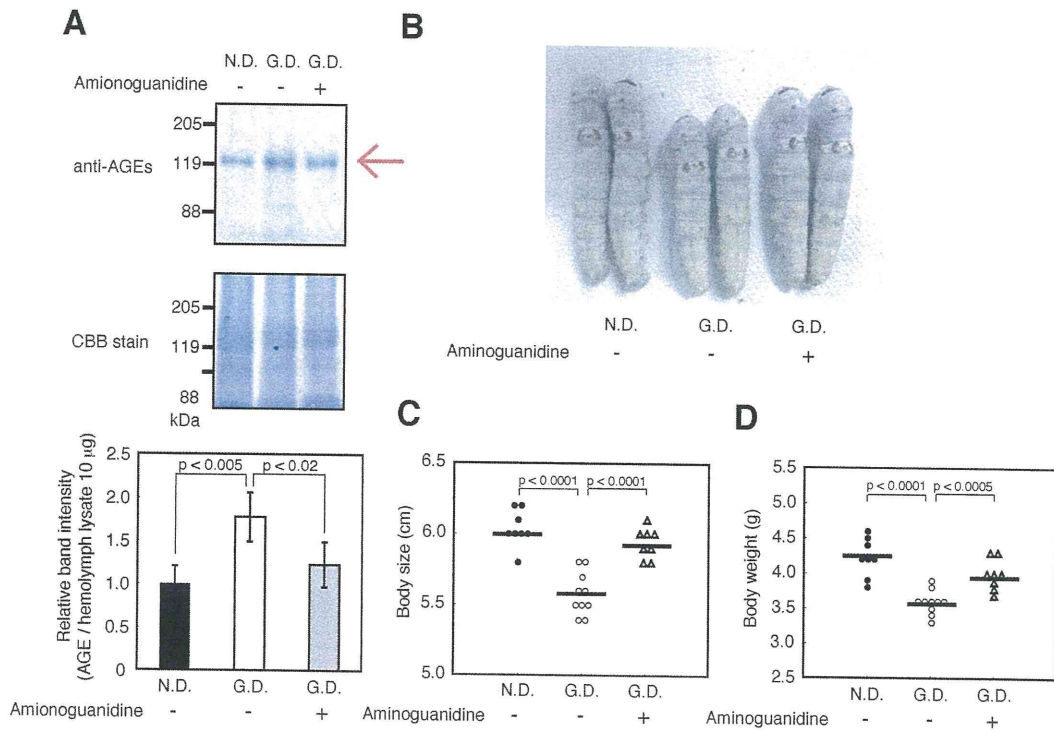


図 12 アミノグアニジンの繰り返し投与による高血糖カイコの血中のメイラード反応の生成物量の低下、及び成長阻害の回復

A. アミノグアニジンによるメイラード反応の生成物 (AGEs) の蓄積量の低下  
 アミノグアニジンの繰り返し注射されたカイコの写真(B)、体長(C)、体重(D)を測定した。

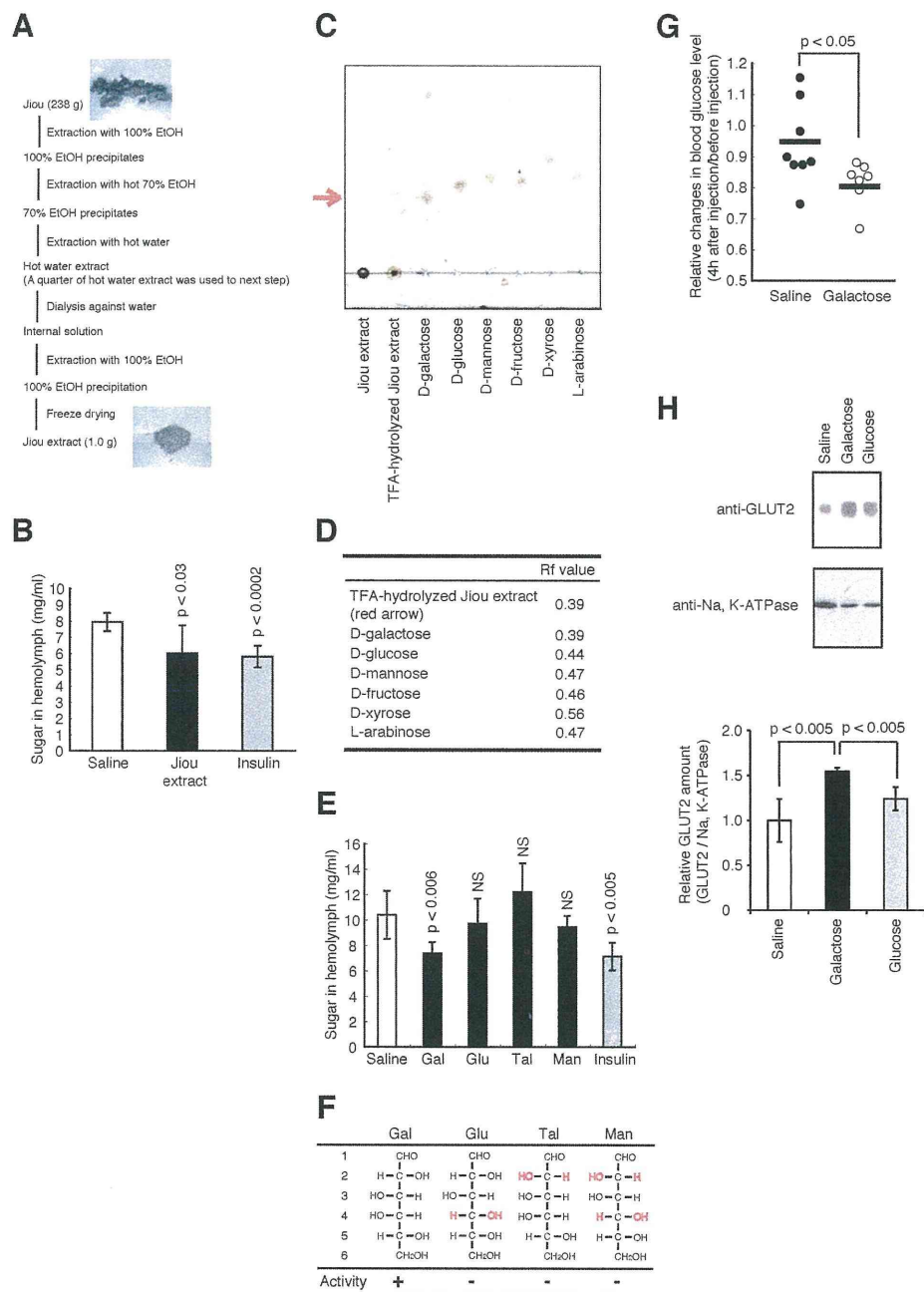


図 13 高血糖カイコを用いた生薬であるジオウからの血糖降下物質の同定

**A.** ジオウ熱水画分の調製、**B.** ジオウ熱水抽出画分の投与による高血糖カイコの血糖値の低下、**C, D.** ジオウ熱水抽出画分中に含まれる糖の同定、**E, F.** ガラクトースの投与による高血糖カイコの血糖値の低下、**G.** ガラクトースの投与による糖尿病マウスの血糖値の低下、**H.** ガラクトースの投与による糖尿病マウスの肝臓における GLUT2 の発現量の上昇



東大・関水氏ら

### カイコで高血糖モデル

#### 糖尿病治療薬開発に応用へ

東京大学大学院理学系研究科の関水 健二教授らの研究グループは、カイコ(絹織物の原料となる蛾の幼虫)を用いて、糖尿病治療薬の開発に応用するモデル動物として、高血糖状態を再現する「高血糖カイコ」を開発した。この高血糖カイコは、糖尿病治療薬の開発に応用するモデル動物として、高血糖状態を再現する「高血糖カイコ」を開発した。この高血糖カイコは、糖尿病治療薬の開発に応用するモデル動物として、高血糖状態を再現する「高血糖カイコ」を開発した。

糖尿病は、血糖値が高くなる病気。血糖値が高くなる原因は、膵臓から分泌されるインスリンというホルモンの不足や、インスリンが効かなくなることにある。関水教授らは、このメカニズムをカイコで再現しようとした。カイコは、血糖値を調節するために、膵臓から分泌されるインスリンと、血糖値を上げるために分泌されるグルカゴンというホルモンを分泌する。このメカニズムをカイコで再現しようとした。カイコは、血糖値を調節するために、膵臓から分泌されるインスリンと、血糖値を上げるために分泌されるグルカゴンというホルモンを分泌する。

関水教授らは、このメカニズムをカイコで再現しようとした。カイコは、血糖値を調節するために、膵臓から分泌されるインスリンと、血糖値を上げるために分泌されるグルカゴンというホルモンを分泌する。このメカニズムをカイコで再現しようとした。カイコは、血糖値を調節するために、膵臓から分泌されるインスリンと、血糖値を上げるために分泌されるグルカゴンというホルモンを分泌する。

### 東大とゲノム創薬研

## カイコの血糖値制御

価格、マウスの100分の1  
糖尿病の実験動物に

東大とゲノム創薬研は、カイコ(絹織物の原料となる蛾の幼虫)を用いて、糖尿病治療薬の開発に応用するモデル動物として、高血糖状態を再現する「高血糖カイコ」を開発した。この高血糖カイコは、糖尿病治療薬の開発に応用するモデル動物として、高血糖状態を再現する「高血糖カイコ」を開発した。

糖尿病は、血糖値が高くなる病気。血糖値が高くなる原因は、膵臓から分泌されるインスリンというホルモンの不足や、インスリンが効かなくなることにある。関水教授らは、このメカニズムをカイコで再現しようとした。カイコは、血糖値を調節するために、膵臓から分泌されるインスリンと、血糖値を上げるために分泌されるグルカゴンというホルモンを分泌する。

この高血糖カイコは、糖尿病治療薬の開発に応用するモデル動物として、高血糖状態を再現する「高血糖カイコ」を開発した。この高血糖カイコは、糖尿病治療薬の開発に応用するモデル動物として、高血糖状態を再現する「高血糖カイコ」を開発した。

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

分担研究報告書

カイコをモデル動物とした生活習慣病モデルの開発に関する研究

研究分担者 片岡 啓子 ゲノム創薬研究所・主任研究員

研究要旨

我々は、安価で倫理的な問題が少ないカイコをモデル動物とした生活習慣病モデルの開発と、その疾患モデルを用いた創薬法の開発を目指している。本課題で、カイコをモデル動物とした肝障害、高脂血症モデルを確立した。また、糖尿病モデルを用いた血糖値の調節に寄与する生薬、食品を同定した。さらに、糖尿病合併症モデルを用いて、治療有効物質を特定した。

四塩化炭素等の肝薬物の投与に依り、カイコの血中 ALT が上昇した（肝障害モデル）。昆虫が生合成できない胆汁酸を餌に添加する事で、カイコの血中中性脂肪濃度が上昇した（高脂血症モデル）。また、血液注射では効果が無くても、経口投与を行う事によって、糖の吸収を穏やかにする物質（ガバ茶）を探索できる事を示し、その様な生薬として白鶴霊芝を特定した。さらに、糖尿病モデルを用いて新たに血糖降下作用を有する生薬（ニンジンエキス、カロコンエキス、カンゾウエキス）を同定した。カイコの糖尿病合併症モデルを回復させる有効成分として、ポリアミンの一種であるスペルミンを同定した。

従って、カイコをモデル動物として肝障害モデル、高脂血症モデルを確立できたと判断した。また、糖尿病モデル、及び糖尿病合併症モデルを用いて、糖尿病に対して治療有効な候補となる生薬、食品、化合物を特定できることが示された。

平成 23 年度では、カイコの糖尿病合併症モデルを回復させる有効成分のスクリーニングを中心に行った。

A. 研究目的

我々は、これまで他に類を見ない、カイコをモデル動物とした医薬品開発を行っている。カイコは見た目とは裏腹にヒトに似て、ヒトの主たる臓器に相当する器官を備えており、医薬品の効果がヒトに近い。例えばヒトに対する病原性細菌を感染させるとカイコは致死となる

が、抗生剤によって治療される（垣内ら、2002 年）。その動物体重当りの有効量（ED<sub>50</sub>）はカイコと哺乳動物で一致する事から（浜本ら、2004 年）、カイコを用いて抗生物質の探索を開始、既に土壌細菌由来の新規抗生物質を発見している。

また、ED<sub>50</sub> 同様、毒物の致死量（LD<sub>50</sub>）もカ

カイコと哺乳動物で一致する事から (浜本ら、2008 年)、カイコをいわば「炭坑のカナリア」として用い、食品などから事前にその種類に依らず毒物を検出する事を提唱、既に研究分担者が所属する (株) ゲノム創薬研究所 (東京大学アントレプレナープラザ) が受託試験を開始している。

この様にカイコは廉価 (マウスの 1/100) で試験も迅速簡便 (数時間から一日～二日で結果が得られ、試料も少なくて済む)、血液 (静脈注射に相当) や腸内 (経口投与に相当) に区別して注射が出来るなど、実験動物として優れており、動物愛護の精神に基づく倫理的な問題に因り年々哺乳動物を用いる事が困難になっている今日、カイコを哺乳動物に代わるモデル動物として用いる事を提唱している。これまでカイコを医薬品製造の「工場」としてタンパク質発現に用いる事はあっても、医薬品開発の実験動物に用いた例は無く、世界で初となる。

また、感染症モデルの他、餌に添加したグルコースによって血糖値が上昇、成長阻害が起こり、これらがヒト・インシュリンによって回復するという糖尿病モデルを作出している。本研究では、さらにカイコをモデル動物として、高脂血症モデル、肝障害モデルの確立を試みた。そして、糖尿病モデルを用いて、血糖調節に寄与する生薬、食品があるか探索を行った。

## B. 研究方法

カイコの種類、飼育条件、注射条件

カイコの受精卵 (交雑種ふ・よう x つくば・ね)

は愛媛養蚕株式会社から購入した。孵化した幼虫は室温で人工飼料シルクメイト 2S (日本農産工業株式会社) を与えて 5 令幼虫まで育てた。飼育容器は卵から 2 令幼虫までを角型 2 号シャーレ (栄研器材)、それ以降をディスポーザブルのプラスチック製フードパック (フードパック FD 大深、中央化学株式会社) を用いた。飼育温度は 27°C とした。特に記載がない限り、実験には 4 齢眠以後絶食させた 5 令 1 日目の幼虫を用いた。

## 糖尿病モデル作出の方法

人工餌シルクメイト 2S (日本農産工業株式会社) に種々の重量比で Glucose を添加したものを摂食させた後、インシュリン等の血糖降下作用物質をテルモ株式会社製の注射筒 (1ml) と注射針 (27Gx3/4) 5 令幼虫の第 5 体節の模様がある体節から 0.05ml の検体を血体腔に注射した。また、検体を経口投与する場合は、Glucose を添加した人口餌にさらに添加し投与した。

## 肝障害モデル作出の方法

人工餌 (シルクメイト 2S) を 1 日給餌し、約 2g に成長した後 6 時間絶食させ、四塩化炭素等の肝薬物を血体腔に注射、1 日後に採血し、血中の ALT 活性を定量した。尚、脂溶性の肝薬物は、ガラス製注射筒 (HAMILTON 製 MICROLITER™ #710) を用い 0.025ml を、水溶性の肝薬物は、糖尿病モデルと同様にテルモ株式会社製の注射筒 (1ml) を用い 0.05ml を注射した。

## 高脂血症モデル作出の方法

種々の重量比の大豆油と油脂の摂食に因る消化不良や衰弱を防ぐ事に依って治療効果を明確に観察する為（消化不良や衰弱に因って検体（を添加した餌）を摂取しなくなる）、胆汁酸を添加した人工餌を数日間摂食させた後、採血し、血中のトリグリセリド量を定量した。

## 糖尿病合併症の治療薬のスクリーニング方法

10%グルコース含有餌に、生理食塩水、及び検体を12時間ごとに4日間繰り返し注射した。注射後のカイコの体長を測定して、成長阻害の効果を検定した。

## C. 研究結果

カイコの糖尿病モデルの応用ができるか検討した。

血液注射では効果が無くても、経口投与を行う事によって、糖の吸収を「穏やかに」する物質が探索できるか検討した。その結果、食品であるガバ茶を混ぜた餌を食べたカイコは、コントロール群と比較して、血糖値が低かった（図1）。さらに、生薬についても探索し、白鶴霊芝を混ぜた餌を食べたカイコの血糖値は低かった（図1）。

これまでに、哺乳動物に肝障害を起こす薬物である四塩化炭素をカイコに投与すると血中のALT活性が上昇することを見いだしている。そこで、四塩化炭素以外の肝薬物に依り、カイコに肝障害が起こるか検討した。その結果、アセトアミノフェン、サリチル酸、アスピリン、硫酸鉄、バルプロ酸ナトリウム、テトラサイクリン、アミオダロン塩酸塩、メチルドパ錠、ケトコ

ナゾール、ベタナミン錠の投与により、カイコの血中のALT活性が上昇した（図3-5）。さらに、平成14年の中国製健康食品に因る死者を出す程の重篤な健康被害（肝障害）の原因物質であるN-ニトロソフェンフルラミンや、かつてはウイルス性肝炎の病態モデル動物の作出に用いられていたD-ガラクトサミンがカイコにおいてもカイコの血中ALTが上昇した（図6、7、表1）。

次に、高脂血症モデルの確立を試みた。昆虫が生合成できない胆汁酸（コール酸）を餌に添加する事によってカイコの血中中性脂肪濃度の飽和レベルが上昇した（図2）。

糖尿病モデルを用いて、血糖値を低下させる生薬の探索を試みた。ニンジンエキス、カニコンエキス、カンゾウエキス等の投与により、カイコの血糖値が有意に低下した（図8）。

糖尿病合併症モデルを用いて、高血糖カイコにおける成長阻害を回復させる化合物をスクリーニングした。カイコの成長阻害を回復させるメイラード反応の阻害剤であるアミノグアニジン（AG）は、分子中に複数のアミノ基を有していた。このことから、分子中にアミノ基を複数有する化合物の中に、高血糖カイコの成長阻害を回復させる物質があるのではないかと考えて、アミノ基が豊富な化合物群について検討した。その結果、ポリアミンの一種であるスペルミンの投与により、高血糖カイコの成長阻害は抑圧された。このとき、カイコの血糖値は、スペルミンの投与により変化しなかった（図9）。

## D. 考察



本研究で、カイコをモデル動物とした糖尿病モデルを用いて、経口投与で血糖値の上昇を抑える化合物が評価できること、さらに血糖値の上昇を抑える物質として、ガバ茶、白鶴霊芝を同定した。また、カイコを用いた肝障害モデル、及び高脂血症モデルの確立に成功した。

カイコの糖尿病モデルを用いて、血液注射では効果が無くても、経口投与を行う事によって、糖の吸収を「穏やかに」する物質が探索できることが示唆された。糖尿病治療薬であるインシュリンの場合は、経口投与で効果がないので、注射に依る投与が必要であるが、その場合、患者に負担がかかる。食事のときに、経口投与で血糖値の上昇を抑えることができれば、患者の負担が軽減される。これまでに、グリコシダーゼ阻害薬は、糖の吸収を抑える作用を有する薬剤であるが、単糖であるグルコースを摂取した場合には効果がない。今回、我々が同定したガバ茶、及び白鶴霊芝を餌に加えることに依り、単糖であるグルコースを餌に添加しているにも関わらず、血糖値の上昇は抑制された。従って、ガバ茶、及び白鶴霊芝がカイコの血糖値の上昇を抑制する機構は、グリコシダーゼ阻害活性ではないと考えられる。ガバ茶や白鶴霊芝の作用機序を解析し、新規の機構の糖尿病治療薬のターゲットが発見できる可能性があると考えられる。

カイコを用いた肝障害モデルに依り、肝毒性を起こすいくつかの化合物の評価ができることがわかった。肝障害モデルもコール酸を用いた高脂血症モデルも、今後、既存の治療薬の評価ができることが示されれば、それらの

治療活性を有する化合物を探索することができると思われる。この点については、今後の課題である。また、糖尿病モデルを用いて血糖降下作用を有する生薬を同定した。今後は、これらの生薬の血糖降下作用を示す有効成分の単離を行う予定である。さらに、糖尿病合併症を治療する候補化合物として、ポリアミンの一種であるスペルミンを同定できた。このことから、カイコの糖尿病合併症モデルを用いて、候補化合物が同定できることがわかった。さらに、ポリアミンは、人の細胞内に存在する内在性の分子であることから、治療薬として用いる場合、副作用が少ない可能性がある。今後、ポリアミンの糖尿病合併症の治療効果について、臨床試験が必要となるだろう。

## E. 結論

カイコを化合物の探索系のモデル動物として、糖尿病モデル、肝障害モデル、高脂血症モデル、糖尿病合併症モデルが有用であることが示唆された。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

## 2. 実用新案登録

なし

## 3. その他

平成 23 年 4 月 1 日に、東京大学アントレプレナープラザにて、カイコを用いて糖尿病治療薬が同定できるという発見について記者会見を行った。

薬事日報や日本経済産業新聞に記事が掲載された。

薬事日報；平成 23 年 4 月 11 日

日本経済産業新聞；平成 23 年 9 月 14 日

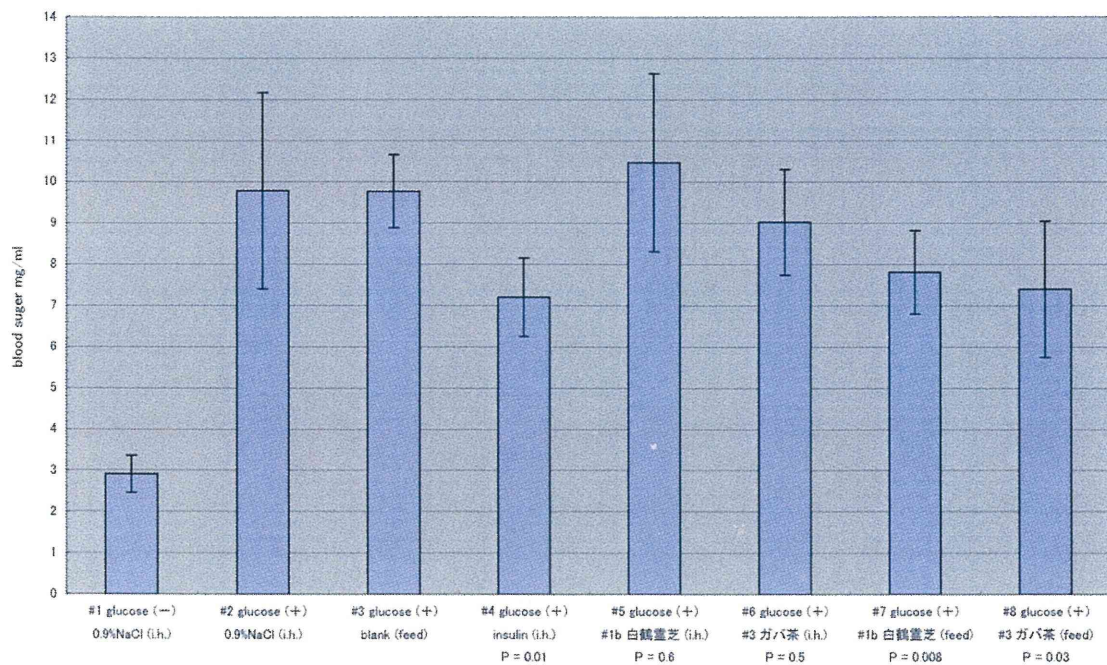


図1 経口投与に依る糖の吸収を「穏やかに」する物質の探索

血液注射では効果が無くても ( $P > 0.05$ ) (#5、#6)、経口投与を行う事によって (#7、#8)、糖の吸収を「穏やかに」する物質 (ガバ茶や白鶴靈芝) を探索できる ( $P < 0.05$ )。

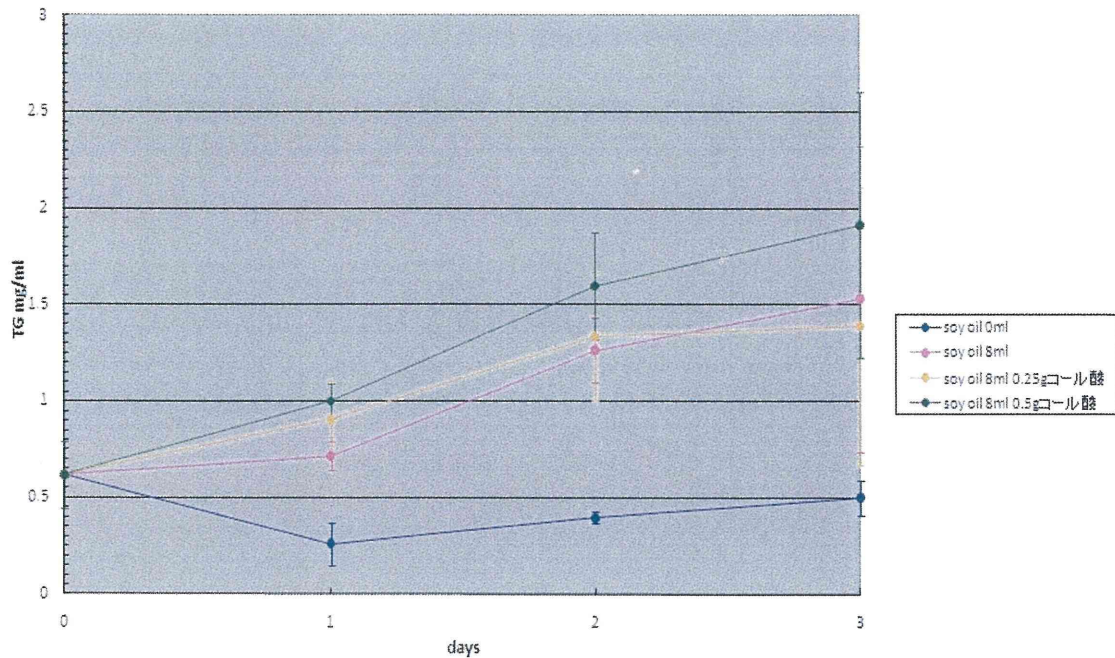


図2 大豆油摂食に依るカイコ血中トリグリセリド上昇に対するコール酸の効果

1日後 (day1) に於いて、大豆油非投与群 (青)、大豆油投与群 (赤)、及び大豆油、5% (5g コール酸/100g 飼料) コール酸投与群 (緑) 間で有意な差が観られる。

表 1 四塩化炭素以外の肝薬物に依るカイコ肝障害モデル (太文字は今回明らかにしたものの)

肝薬物	肝毒性
四塩化炭素	P450 2E1 によって代謝される際に生じる
アセトアミノフェン <sup>a</sup>	ラジカル
サリチル酸 <sup>a</sup>	
アスピリン <sup>a</sup>	
硫酸鉄 <sup>b</sup>	それ自体が生成するラジカル
バルプロ酸ナトリウム <sup>b</sup>	細胞小器官阻害
テトラサイクリン <sup>b</sup>	(ミトコンドリアやリソソーム)
アミオダロン塩酸塩 <sup>b</sup>	
メチルドパ錠 <sup>c</sup>	過剰免疫
ケトコナゾール <sup>c</sup>	
ベタナミン錠 <sup>c</sup>	
<b>N-ニトロソフェンフルラミン<sup>d</sup></b>	P450 2B1、2E1 によって代謝される際に生じるアルキル化剤
<b>D-ガラクトサミン<sup>e</sup></b>	UDP-グルコサミンに代謝され、UTP を捕捉し、核酸や蛋白、脂質の代謝を阻害

<sup>a</sup> 図 3。

<sup>b</sup> 図 4。

<sup>c</sup> 図 5。

<sup>d</sup> 図 6。平成 14 年の中国製健康食品に因る重篤な健康被害 (肝障害) の原因物質。

<sup>e</sup> 図 7。かつてはウイルス性肝炎の病態モデル動物の作出に用いられていた。



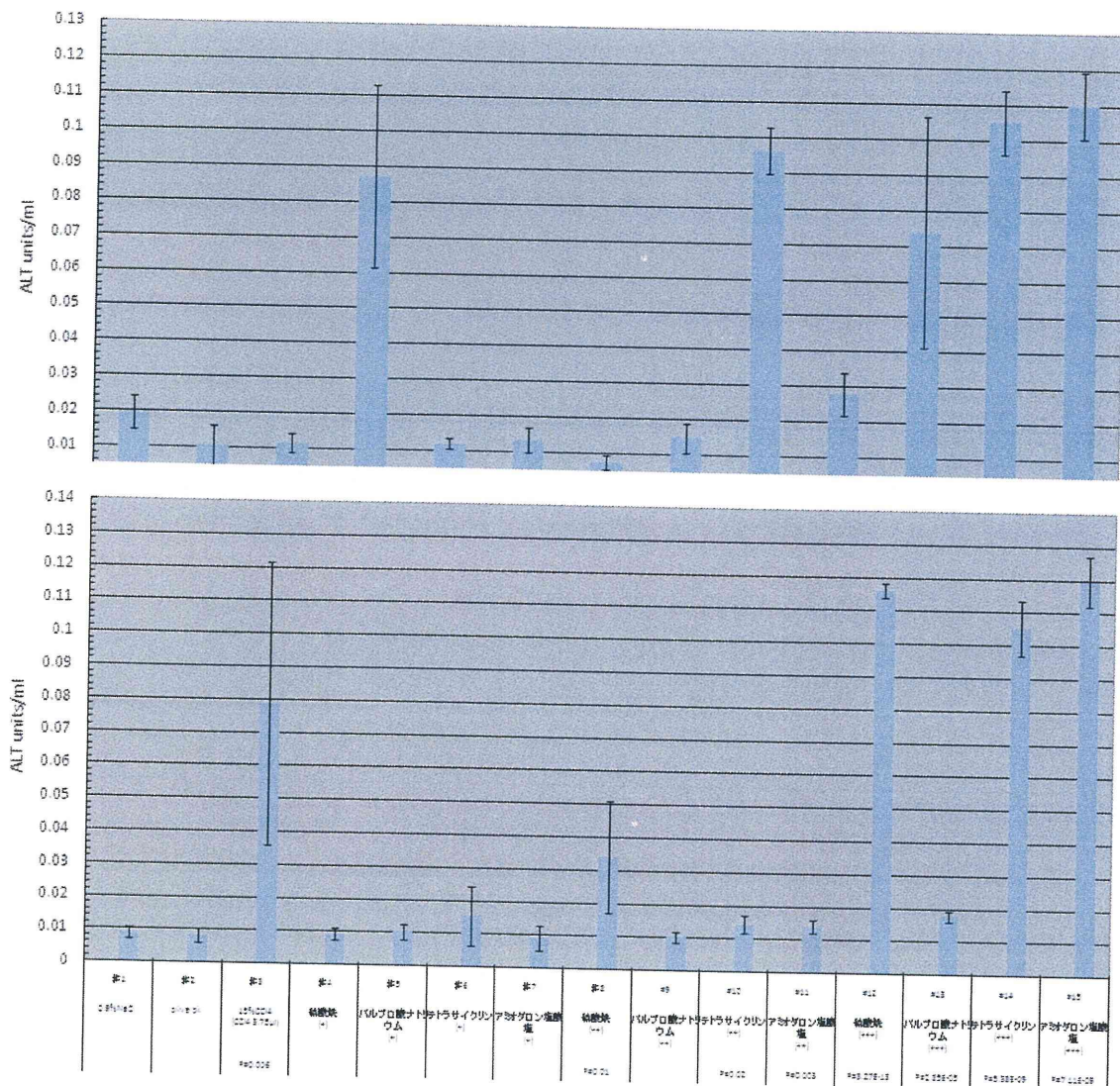


図4カイク血中 ALT 活性に対する硫酸鉄、パルプロ酸ナトリウム、テトラサイクリン、及びアミオダロン塩酸塩の投与の効果

#8、#10～15 に有意な肝毒性が検出された。

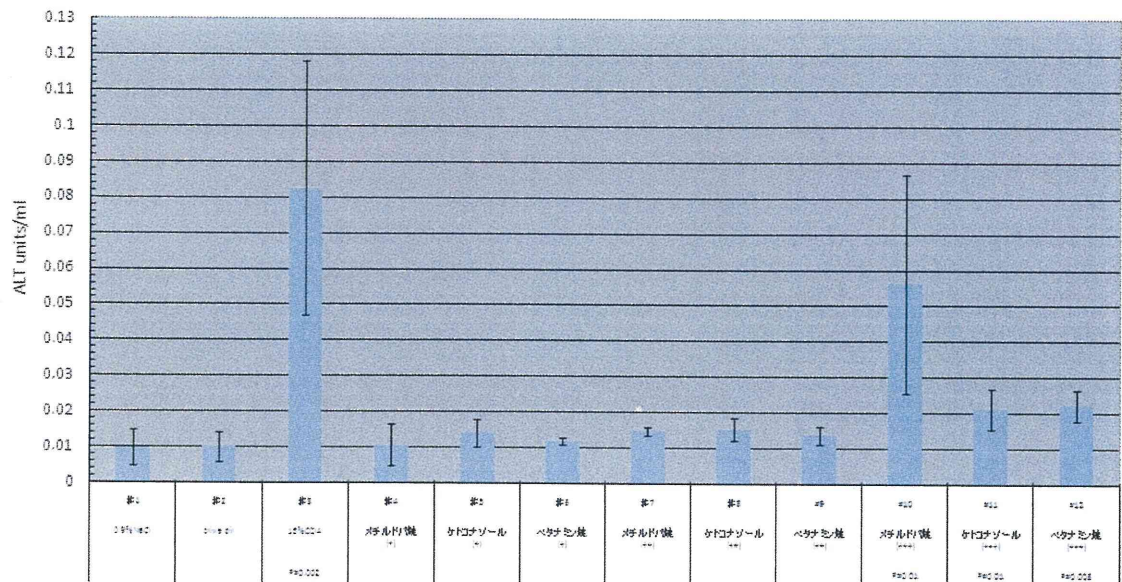


図 5 カイコ血中 ALT 活性に対するメチルドパ錠、ケトコナゾール、及びベタナミン錠の投与の効果

#10~12 に有意な肝毒性が検出された。

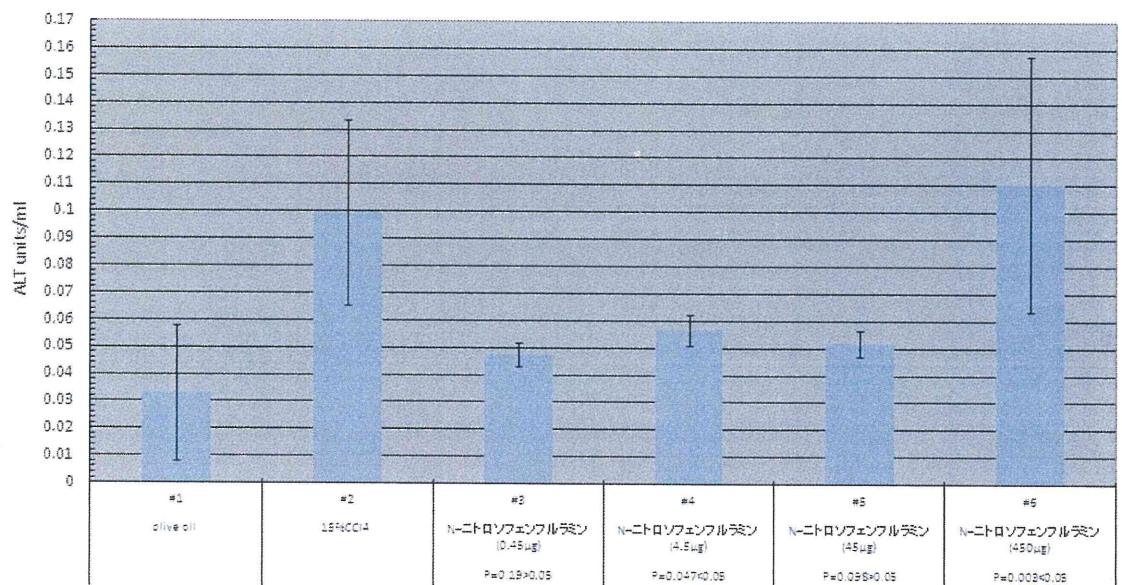


図 6 カイコ血中 ALT 活性に対する N-ニトロソフェンフルラミンの効果

#6 に有意な肝毒性が検出された。



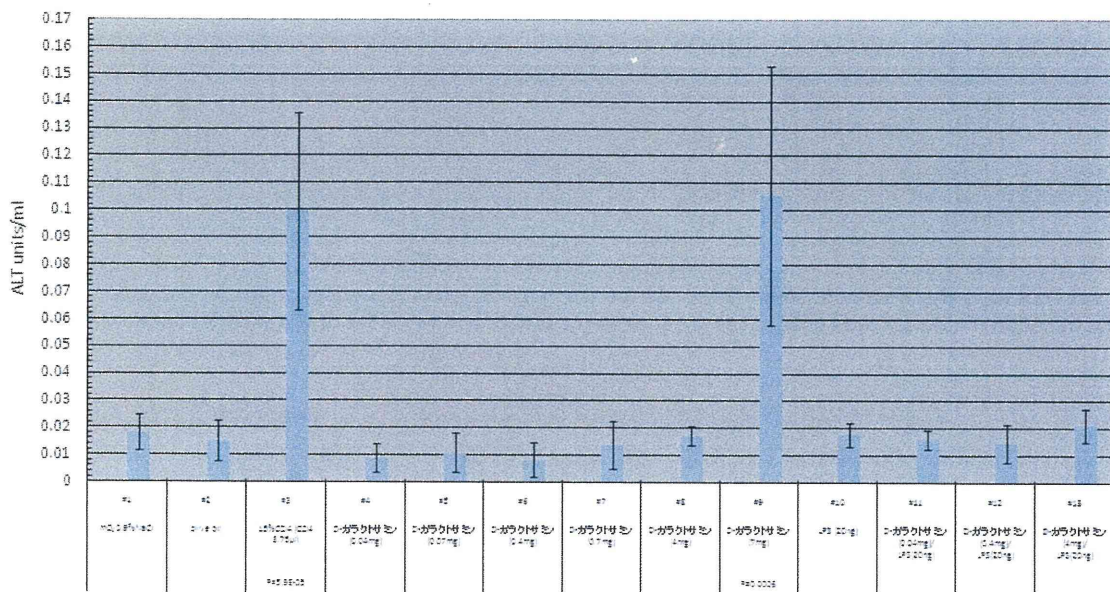


図 7 カイコ血中 ALT 活性に対する D-ガラクトサミン、及びリポポリサッカライド (LPS) の効果

#9 に有意な肝毒性が検出された。

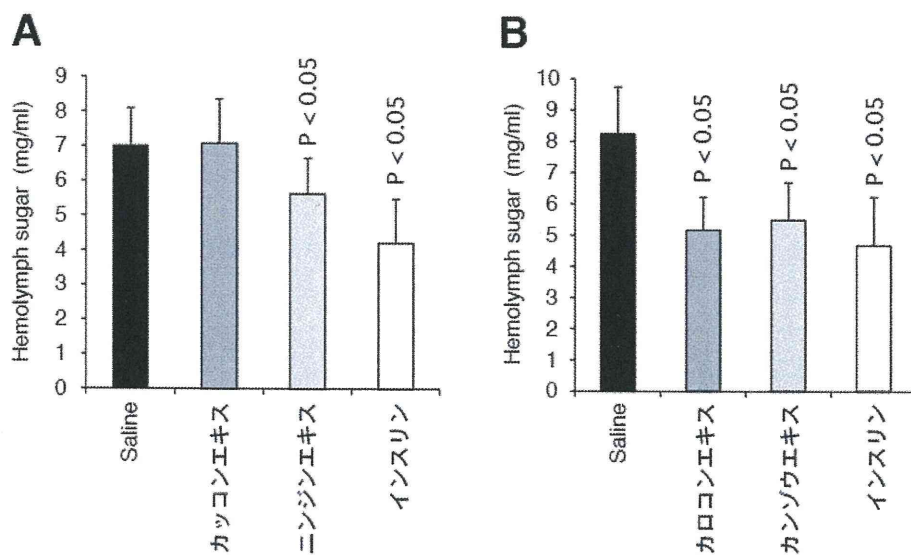


図 8 カイコの血糖値を低下させる生薬の探索

ニンジンエキス、カロコンエキス、カンゾウエキスに有意な血糖降下作用が検出された。

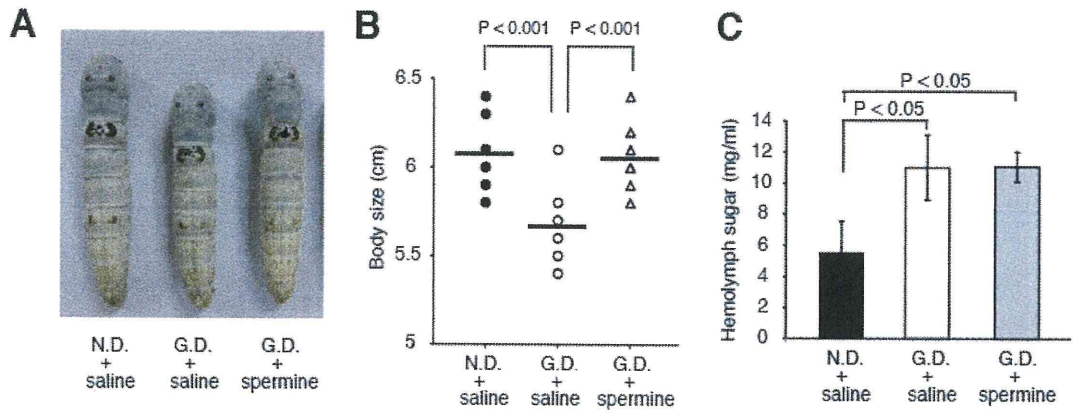


図 9 カイコの成長阻害を回復させる化合物のスクリーニングと同定

高血糖カイコにスペルミンを投与することにより、高血糖カイコの成長阻害が回復する。写真 (A)、体長(B)。血糖値(C)。



研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
関水和久・垣内力・浜本洋・松本靖彦	カイコの新たな実験動物としての利用	杉山雄一・柴崎正勝・長野哲雄・松木則夫	創薬科学の魅力 —東京大学大学院薬学系研究科からの発信—	廣川書店	東京	H22(2010)年	263-274

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Matsumoto Y, Sugita E, Sugita T, Sekimizu K.	An invertebrate hyperglycemic model for the identification of anti-diabetic drugs.	<i>PLoS One</i>	6	e18292	2011

HIROKAWA PUBLISHING CO.

# 創薬科学の魅力

—東京大学大学院薬学系研究科からの発信—

編集

杉山雄一・柴崎正勝

長野哲雄・松木則夫

廣川書店

D-3



# カイコの新たな実験動物としての利用

関水 和久 (微生物薬品化学教室)

垣内 力 (微生物薬品化学教室)

浜本 洋 (微生物薬品化学教室)

松本 靖彦 (微生物薬品化学教室)

## 要約

カイコにおける薬物の体内動態や毒性は、ほ乳動物と共通した結果を示す。また私たちは、カイコを用いて、黄色ブドウ球菌の3つの病原性遺伝子を発見した。さらに、カイコの感染モデルを用いて新規抗生物質の探索に成功している。また、カイコの高血糖モデルを用いて、血糖降下作用物質を発見することができた。これらの結果は、カイコがマウスなどのほ乳動物の代替動物として、医薬品の治療効果を評価する上に有用であることを示唆している。

**キーワード** カイコ, 抗生物質, 高血糖モデル

## 語句説明

### 細菌の病原性遺伝子

病原性細菌は、溶血毒素などの病原性因子を放出し、宿主に障害を与える。このプロセスは、遺伝子発現の調節機構により、転写や翻訳の段階で制御されている。一般に病原性遺伝子は、これらのプロセスに必要な全ての遺伝子を含めて呼ぶ。毒素をコードする遺伝子はその一部である。最近では、毒素をコードする遺伝子の発現を調節する遺伝子の存在が明らかにされている。そのような遺伝子の産物は、細菌の増殖には必要でないが、病原性の発現に必要である。したがって、それらは、「菌にやさしい」新たな抗菌治療薬のターゲットとして期待される。

### 日和見感染症

老人や癌の治療を受けている患者さんは、免疫力が低下しているので、健常人では問題になら

ない細菌や真菌による感染症を生じる場合がある。これを日和見感染症という。黄色ブドウ球菌や緑膿菌は、それ自体の病原性は低いが、多剤耐性である場合が多く、それらによる日和見感染症に対する対策が臨床上重要である。

### 機能未知遺伝子

ヒトを始め、多くの生物種でゲノムプロジェクトと呼ばれる研究手法により、全塩基配列が決定されるようになった。それにより、多くのタンパク質をコードする遺伝子の存在が明らかにされるようになった。しかしながら、それらの多くは未だ機能が明らかにされていない。それらを機能未知遺伝子と呼ぶ。特定の遺伝子を破壊する方法により、対象となる遺伝子が欠失した細胞や個体を人工的に作出し、その表現型を解析するという研究手法が一般的に行われている。

## 1



### はじめに

我が国が有史以来経験したことのない高度高齢化社会を迎える上で、医療の役割はかつてないほど重要性が高まっている。高齢化が進行するに従って増加する、ガンや生活習慣病をはじめとする様々な疾病を治療する医薬品の開発の重要性が高まっている。医薬品開発の最初の段階である、リード化合物の試験管内アッセイ系を用いた探索において、化合物ライブラリーや天然物から得られるほとんどの化合物は、体内動態が不良であったり、毒性を示すため、医薬品としては使えない。そこで私たちの研究室では、カイコをモデル動物として用いることにより、医薬品候補化合物の体内動態及び毒性を開発の初期の段階で判定できる方法の確立を目指している（図1）。本稿では、私たちが行っている、(1) カイコにおける薬物の体内動態、(2) カイコの感染モデルを用いた細菌の病原性遺伝子の同定、(3) カイコの感染モデルを用いた新規抗生物質の探索、及び、(4) カイコの高血糖モデル、に関する研究の成果について概説する。

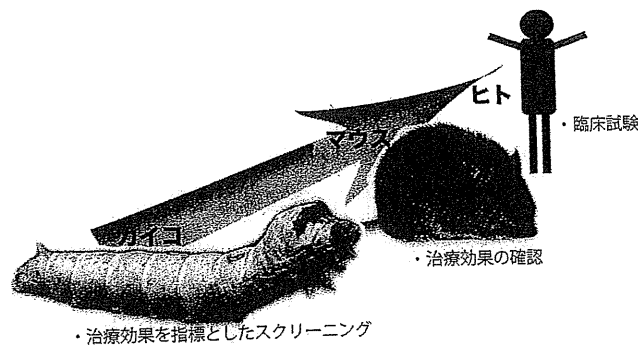


図1 カイコを利用した創薬研究