

学位論文

カイコ幼虫を用いた抗生物質の  
定量的な治療効果の評価に関する研究

浜本洋

# 目次

略語	p. 3
序章	p. 4
第1章 カイコ幼虫を用いた抗生物質の治療効果の定量的な評価	p. 8
第2章 カイコ幼虫を用いた経口投与における抗生物質の治療効果の評価	p. 22
第3章 カイコ幼虫の腸管の物質透過に与える化合物の分子量及び油水分配係 数の影響	p. 31
総括	p. 47
参考文献	p. 50
謝辞	p. 58

## 略語

ATP	:Adenosine 5'-triphosphate
CFPN-Na	:cefcapene sodium
CFPN-PI	:cefcapene pivoxil
<i>cvfA</i>	: <u>c</u> onserved <u>y</u> irulence <u>f</u> actor <u>A</u>
CYP450	:シトクローム P450
dCTP	: 2'-Deoxycytidine-5'-triphosphate
ED <sub>50</sub>	:50%効果量 (50% effective dose)
IMP/CS	: imipenem-cilastatin
MIC	:最小発育阻止濃度 ( <u>m</u> inimal <u>i</u> nhibitory <u>c</u> oncentration)
MRSA	:メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 ( <u>m</u> ethicillin <u>r</u> esistant <u>S</u> taphylococcus <u>a</u> ureus)
MSSA	:メチシリン感受性黄色ブドウ球菌 ( <u>m</u> ethicillin <u>s</u> ensitive <u>S</u> taphylococcus <u>a</u> ureus)
OD	:optical density
PEG	:polyethylene glycol
ST 合剤	: sulfamethoxazole-trimethoprim

## 序章

1929年に Alexander Fleming が青カビから抗生物質ペニシリンを発見してから(1)、80年が経過した。実際の臨床で抗生物質が使用されるようになり、人類の生存を脅かしてきた感染症は治療可能となり、感染症による死亡数は著しく減少した。その後、クロラムフェニコール(2)や、カナマイシン(3)などのいくつもの抗生物質が発見され、臨床で使用されるようになった。ペニシリンの誘導体であるβラクタム系抗生物質は化学修飾による改良により、グラム陰性菌にまで抗菌スペクトラムを拡大したセフェム系抗生物質が開発され、臨床で広く用いられるようになった(4)。しかしながら、抗生物質の乱用は、薬剤耐性菌の出現を招いた。中でも、メシチリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)は、院内感染を起こし、社会問題となっている(5,6)。また、最近では院内感染だけではなく、毒性の高い市中感染型 MRSA の存在が明らかとなり、脅威となっている(7,8)。その MRSA に対する、抗生物質の切り札として、バンコマイシンが用いられているが、ついに最近バンコマイシン高度耐性黄色ブドウ球菌(VRSA)の出現が報告された(9-11)。従って、MRSA や VRSA に有効な新規構造を有する抗生物質を見出すことは、人類の感染症対策として非常に重要かつ喫緊の課題となっている。

一般に抗生物質の開発に当たっては、まず試験管内における抗菌活性を指標とした候補化合物のスクリーニングが行われる。そこで見出された抗菌物質は、マウス等の哺乳類による感染症モデルで治療効果があるか否か検討される。試験管内での試験で抗菌活性を示す検体数は膨大となるため、抗菌化合物の精製や、哺乳動物を用いた感染実験による評価はコストや時間を要する。その上、大部分の化合物は体内動態が不良であるため、治療効果を示さないことが知られている。このように、治療効果を示す新規構造を有する抗生物質の開発には、巨額の費用と長い開発時間が必要である。そのため、現在では多くの製薬会社は、新規抗生物質の開発に消極的である。さらに、近年ヨーロッパを中心とし

て、倫理的な観点から哺乳類を用いた動物実験に対して法律による規制が行われており、世界的な流れとなり始めている(12,13)。これらの問題を解決するために、哺乳類以外で、飼育コストが低く、簡便に治療効果を指標にスクリーニングが可能である系は有用であると考えられる。

新たな哺乳類以外での感染症のモデル動物として、ショウジョウバエ(14-17)や線虫(18-20)が、黄色ブドウ球菌(17)や緑膿菌(21,22)の感染モデルとして提唱されている。しかしながら、これらの動物は体の大きさが非常に小さいため、菌や薬剤の注射には特別な装置が必要であり、定量的な実験は困難である。そこで、私はカイコ幼虫に着目した。カイコ幼虫が黄色ブドウ球菌及び緑膿菌により感染死することは、私が所属する研究室にてすでに明らかにされていた(23)。さらに、カイコ幼虫は、感染実験だけでなく薬物投与実験にも適した適度な大きさがあり、薬物動態の研究に必要な臓器の分離も容易である。実験に用いる5令の初期のカイコ幼虫の体長は2~3cmであり、使い捨てプラスチック注射器を用いて血液中に最大0.2mLのサンプルが注射可能である。また、長い養蚕業の歴史において、カイコ幼虫の飼育方法は様々な面から改良され(24,25)、現在では、カイコ幼虫は生の桑葉を用いずに人工飼料により通年飼育できる。この点は、実験動物としての適性として極めて重要である。また、カイコ幼虫の飼育に必要なスペースは、マウスやラットなどの哺乳類に比べて非常に小さい。そのため、限られたスペースで多数のカイコ幼虫を飼育することが可能である。さらに、カイコ幼虫は実験者に対して攻撃性を示すことがなく、また飼育容器から逃走することはない。また、カイコ幼虫の一個体あたりの飼育に要する単価は、マウスに比べ非常に低い。従って、カイコ幼虫は飼育コストが非常に安く、大量の候補化合物について治療効果の評価を行う実験動物として非常に有用であると考えられる。

無脊椎動物のカイコ幼虫の特徴として、Toll receptor に代表されるような自然免

疫機能を備えている点があげられる(14,15,26)。近年の研究により、無脊椎動物は抗体生産能は有しないが、自然免疫の分子機構は哺乳類とよく共通することが明らかとなっている(27-29)。また、昆虫には哺乳類の薬物代謝、薬物動態に関わる臓器である肝臓・腎臓・腸に相当する器官として、脂肪体・マルピーギ管・中腸(30)が存在する。さらに昆虫には哺乳動物と同様に CYP450(30,31)や、硫酸抱合酵素(30,32)、グルコース抱合酵素（投稿準備中）などの薬物代謝酵素が存在することが知られている。従って、カイコ幼虫においても哺乳類と同様の薬物体内動態が観察されると期待される。

本論文では、カイコ幼虫をモデル動物として、抗生物質の治療効果の定量的な評価、及び薬物の腸管透過の特性について検討した結果を報告する。

## 第1章

### カイコ幼虫を用いた 抗生物質の治療効果の定量的な評価



## 第1節 序

すでに垣内らの研究により、カイコ幼虫への *Staphylococcus aureus* 及び *Pseudomonas aeruginosa* の血液内への注射により、2日以内にカイコ幼虫が感染死することが見いだされており、さらに、バンコマイシン及び、オキサシリン、アンピシリンの投与により *S. aureus* による感染死が抑制されることが見いだされていた(23)。これらの結果は、カイコ幼虫を用いた感染モデルが抗生物質の治療効果を評価する上で有用である可能性を示している。しかしながら、ヒトに感染して病気を引き起こす細菌・真菌が普遍的にカイコ幼虫を殺傷するか否かは明らかではなかった。また、抗生物質の定量的な評価が可能であるかについても検討されていなかった。抗生物質の治療効果の評価系としてのカイコ幼虫の有用性を示すためには、カイコ幼虫感染モデル系における抗生物質の治療効果を定量的に評価し、哺乳動物と比較する必要がある。本章では、まず様々な細菌及び真菌をカイコ幼虫に注射し、感染死するか否か検討した。さらに、その感染に対してヒト臨床で用いられている抗生物質について、カイコ幼虫での ED<sub>50</sub> 値を求め、哺乳動物での結果と比較した。

## 第2節 材料と方法

### 微生物及び、抗菌剤、抗真菌剤

*S. aureus* は九州大学医学部付属病院で分離された株 MSSA1(5)、*S. maltophilia* は東京大学医学部付属病院での臨床分離株を用いた。また、*Candida tropicalis* は pK233(33)及び *Candida albicans*(34)は文献に記載の株を用いた。カナマイシン、クロラムフェニコール、テトラサイクリン、フルシトシンは、それぞれ明治製菓、三共、SIGMA より購入した。アルベカシン、テイコプラニン、バンコマイシン、ミノサイクリン、フロモキシセフ、リネゾリ

ド、アムホテリシン B、フルコナゾールはそれぞれ明治製薬、藤沢薬品工業、塩野義製薬、日本ワイレスダリー、塩野義製薬、ファルマシア、ブリストル、ファイザー製薬より原末の分与を受けた。

## 最小発育阻止濃度の測定

最小発育阻止濃度(MIC)は、微量希釈法に従って決定した(35,36)。

## カイコ幼虫の飼育

カイコ幼虫を用いて感染治療薬の評価を再現性よく、定量的に行うためには、感染実験に用いるカイコ幼虫を、病原体に感染させないように飼育する必要がある。養蚕農家が被害を受けるカイコ幼虫の感染症が知られている。これらにはウイルス(37,38)や、細菌による感染症が含まれる。飼育しているカイコ幼虫のコロニーが、ひとたびこれらの病原体に感染すると、容易には除去できず、カイコ幼虫の飼育は困難となる。これらの問題を防ぐため以下の点に注意し、カイコ幼虫を卵から5令に飼育し実験に用いた。

桑葉には、カイコ幼虫に感染するウイルスが付着していることが知られている。従って、感染実験に用いるカイコ幼虫の飼育には桑葉をさけ、人工飼料を用いて飼育した。4令までは抗生物質を含有する飼料（シルクメイト 2S、日本農産）を用いた。また、昆虫に感染するウイルスや細菌などは自然界一般に存在している。従って、手を消毒せずにカイコにふれてしまうと、手から接触感染によりカイコ幼虫に病原体が感染するおそれがあるため、カイコ幼虫を扱う際は手を 70%エタノールで消毒後、必ずポリエチレン製またはゴム製の使い捨て手袋を着用した。

## カイコ幼虫を用いた治療効果(ED<sub>50</sub>)の測定

5 令 1 日目のカイコ幼虫に抗生物質を含まない人工飼料(片倉工業製)を投与後、翌日のカイコ幼虫の血管に 27G の注射針(テルモ)で  $3 \times 10^7$  個の *S. aureus* あるいは *S. maltophilia*、*C. tropicalis*、*C. albicans* を注射した。さらに、各濃度の抗菌剤又は抗真菌剤 0.05mL を 27G の注射針で血管内注射(*i.v.*)した。薬剤の各容量に対して 1 群 10 匹以上のカイコ幼虫を用いた。菌を注射したカイコ幼虫は絶食させ、温度 27°C、湿度 50% の恒温恒湿安全キャビネット(BHC-1303IIA, 日本エアーテック)内で飼育した。菌を注射したコントロール群の 90% 以上が死亡したときに、50% 生存させる薬剤容量を ED<sub>50</sub> とし、カイコ幼虫の体重 1g 当たりについて求めた。

治療に用いた薬剤は細菌や真菌を注射した直後に血管内投与(*i.v.*)、または腸管内投与(*i.m.*)した。経口投与(*p.o.*)の場合には感染させる前日から餌に薬剤を混合した。2 日後に生存数を計測し、半数の個体が生存する、カイコ幼虫体重 1g あたりの薬剤量を ED<sub>50</sub> とした。

## 第 3 節 結果

### (1) 病原性細菌の血液内投与によるカイコ幼虫の感染死

病原性細菌である *S. aureus* 及び *S. maltophilia*、真菌の *C. albicans*、*C. tropicalis* をカイコ幼虫の血管内に、注射すると 2 日以内にカイコ幼虫が死亡した(data not shown)。感染に必要な菌数は、細菌の場合はおおよそ  $10^7$  個、真菌の場合は  $10^6$  個であった(data not shown)。従って、カイコ幼虫はヒトの日和見感染症原因菌一般に対して感受性があると考えられる。

## (2) カイコ幼虫を用いた細菌感染症治療薬の評価

確立したカイコ幼虫の病原細菌感染実験系を用いて、*S. aureus* あるいは *S. maltophilia* によるカイコ幼虫の感染死に対する、ヒト臨床で有効とされている抗生物質の治療効果の有無を検討した。カナマイシン、クロラムフェニコール、テトラサイクリン、アルベカシン、テイコプラニン、バンコマイシン、ミノサイクリン、フロモキシセフ、リネゾリドはヒトの臨床において、黄色ブドウ球菌感染症に対する治療薬として用いられている。また、ミノサイクリン、ST 合剤、IMP/CS は *S. maltophilia* 感染症に対する治療薬として用いられている。それぞれの細菌の希釈液をカイコ幼虫の血液中に注射後、種々の用量の薬剤を投与し、2日後のカイコ幼虫の生存率を求めた。黄色ブドウ球菌の場合、2日後には薬剤無投与のコントロールでは、カイコ幼虫の全数が死亡したが、クロラムフェニコールを 100 $\mu$ g を投与することによりコントロール群と同様に生存するようになった(Fig.1)。さらに、用いたすべての薬剤について、用量の増加に伴った生存率の上昇が見られた(Fig.2 A,B)(39)。生存曲線から、半数のカイコ幼虫を生存させるのに必要な、体重 1g あたりの薬剤量を ED<sub>50</sub> 値として定量的に求めることができた。その結果、カイコ幼虫での ED<sub>50</sub> 値は、マウスで報告されている値とおよその一致を示した(39)。また、用いたすべての薬剤について、ED<sub>50</sub> 値と感染に用いた *S. aureus* 及び *S. maltophilia* に対する最小発育阻止濃度(MIC 値)の比は 10 以下であった(Table.1)。

## (3) カイコ幼虫を用いた真菌感染症治療薬の評価

ヒトの臨床にける日和見感染症の原因菌として *C. albicans* や *C. tropicalis* などの真菌が重要である。私は、これらの真菌に対するカイコ幼虫の感受性と抗真菌剤による治

療効果の有無を検討した。ヒトの臨床で抗真菌剤として用いられているアムホテリシン B 及びフルコナゾールについて、カイコ幼虫に対する治療効果の有無を検討した。その結果、薬剤用量の上昇に伴ったカイコ幼虫の生存率の上昇が見られた (Fig.3 A,B) (39)。生存曲線から ED<sub>50</sub> 値を求めたところ、その ED<sub>50</sub>/MIC 比はマウスで報告された値とおよその一致を示した (Table.2)。また、得られた ED<sub>50</sub> 値と MIC 値の比は 10 以下であり、これらの薬剤はカイコ幼虫の体内で効率よく真菌の増殖を阻害していると考えられる。

#### 第4節 考察

日和見感染症の原因菌とされる *S. aureus* や *S. maltophilia* や、真菌である *Candida* spp. の感染によりカイコ幼虫は殺傷された。一方、ヒトに対する病原性がないとされる *Escherichia coli* K12 株(23)や、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* (data not shown) は、10<sup>8</sup> 個の細菌を注射しても、カイコ幼虫に対し病原性を示さないことが示されている。また、カイコ幼虫で病原性が低下していることが見いだされた *S. aureus* の *cvfA* 遺伝子変異株などは、マウスでも病原性が低下していたことが見いだされている(40)。これらのことから、これらの日和見病原性細菌がカイコ幼虫に対し病原性をもたらず機構は、カイコ幼虫と哺乳動物の間で共通していると考えられる。

カイコ幼虫の黄色ブドウ球菌感染症モデルにおける抗生物質の ED<sub>50</sub> 値は、マウスモデルにおける値と変わらなかった。従って、カイコ幼虫は黄色ブドウ球菌感染症の抗生物質の治療効果のスクリーニング系として有用であると考えられる。また、どの抗生物質に対しても ED<sub>50</sub> 値は MIC 値の 10 倍以内であった。ED<sub>50</sub> 値と MIC 値の比が低いほど、薬剤のカイコ幼虫に対する治療効果が、試験管内培養条件での細菌の増殖阻害効果と一致することを示すと考えられる。試験管内で抗菌活性があっても、体内動態に問題があるような

化合物は、治療効果が低くなり、この値が大きくなると考えられる。従って、この値は、放線菌培養上清や化合物ライブラリーから、治療効果を示す化合物をスクリーニングする際の指標として有用であると考えられる。

A



B



C



Fig.1 カイコ幼虫の*S. aureus*による感染死と、抗生物質の治療効果  
 A, 生理食塩水 (コントロール)、B, *S. aureus*を血液内投与したカイコ幼虫、  
 C, *S. aureus*及びクロラムフェニコール(100 $\mu$ g)を血液内投与したカイコ幼虫  
 写真はいずれも投与2日後である。

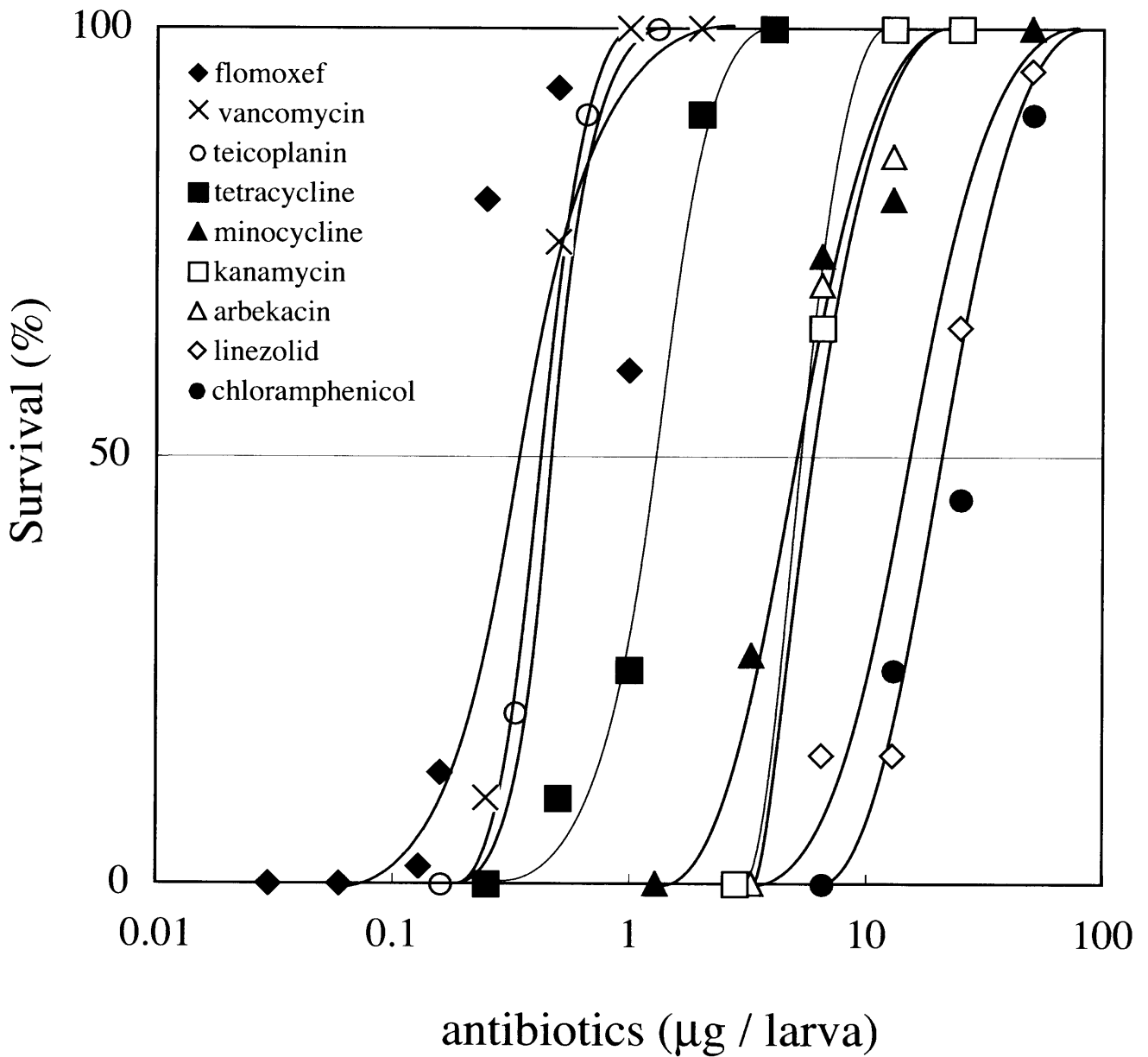


Fig. 2A *S. aureus*に感染させたカイコ幼虫に対する抗生物質の治療効果  
 2回以上の実験を行い、同じような結果が得られている。図には、その代表的な結果を示す。



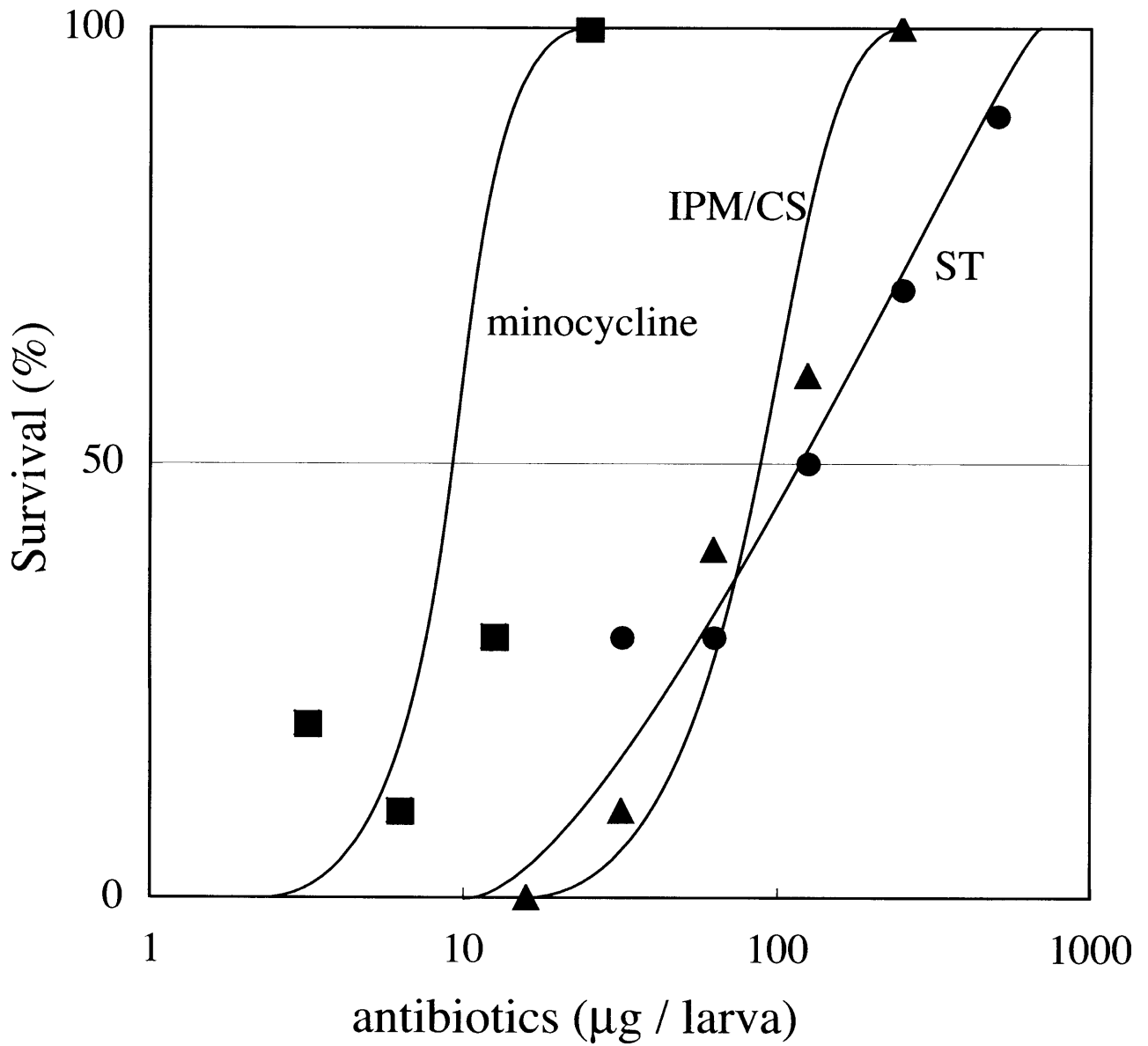


Fig. 2B *S. maltophilia*に感染させたカイコ幼虫に対する抗生物質の治療効果  
 2回以上の実験を行い、同じような結果が得られている。図には、その代表的な結果を示す。

Table 1. カイコ幼虫感染モデルにおける *S. aureus* または *S. maltophilia* に対する抗生物質の ED<sub>50</sub> 値

Antibacterial agent	Bacteria	ED <sub>50</sub> in silkworm ( $\mu\text{g/g-larva}$ )	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )	ED <sub>50</sub> /MIC	
				Silkworm	Mouse
Kanamycin	<i>S. aureus</i>	3	8	0.4	
Arbekacin	<i>S. aureus</i>	4	8	0.5	
Teicoplanin	<i>S. aureus</i>	0.3	0.5	0.6	
Vancomycin	<i>S. aureus</i>	0.3	1	0.3	1.1 <sup>a</sup>
Tetracycline	<i>S. aureus</i>	0.4	0.5	0.8	
Minocycline	<i>S. aureus</i>	3.9	0.4	9.8	3.5 <sup>b</sup>
Chloramphenicol	<i>S. aureus</i>	7	16	0.4	
Flomoxef	<i>S. aureus</i>	0.2	0.4	0.5	0.8 <sup>b</sup>
Linezolid	<i>S. aureus</i>	9	4	2.3	1.5 <sup>a</sup>
Minocycline	<i>S. maltophilia</i>	7.8	1	7.8	
ST	<i>S. maltophilia</i>	57	256	0.2	
IPM/CS	<i>S. maltophilia</i>	50	256	0.2	

<sup>a</sup> ED<sub>50</sub> 値と MIC 値は過去に論文 46 にて報告された値である

<sup>b</sup> ED<sub>50</sub> 値と MIC 値は過去に論文 47 にて報告された値である

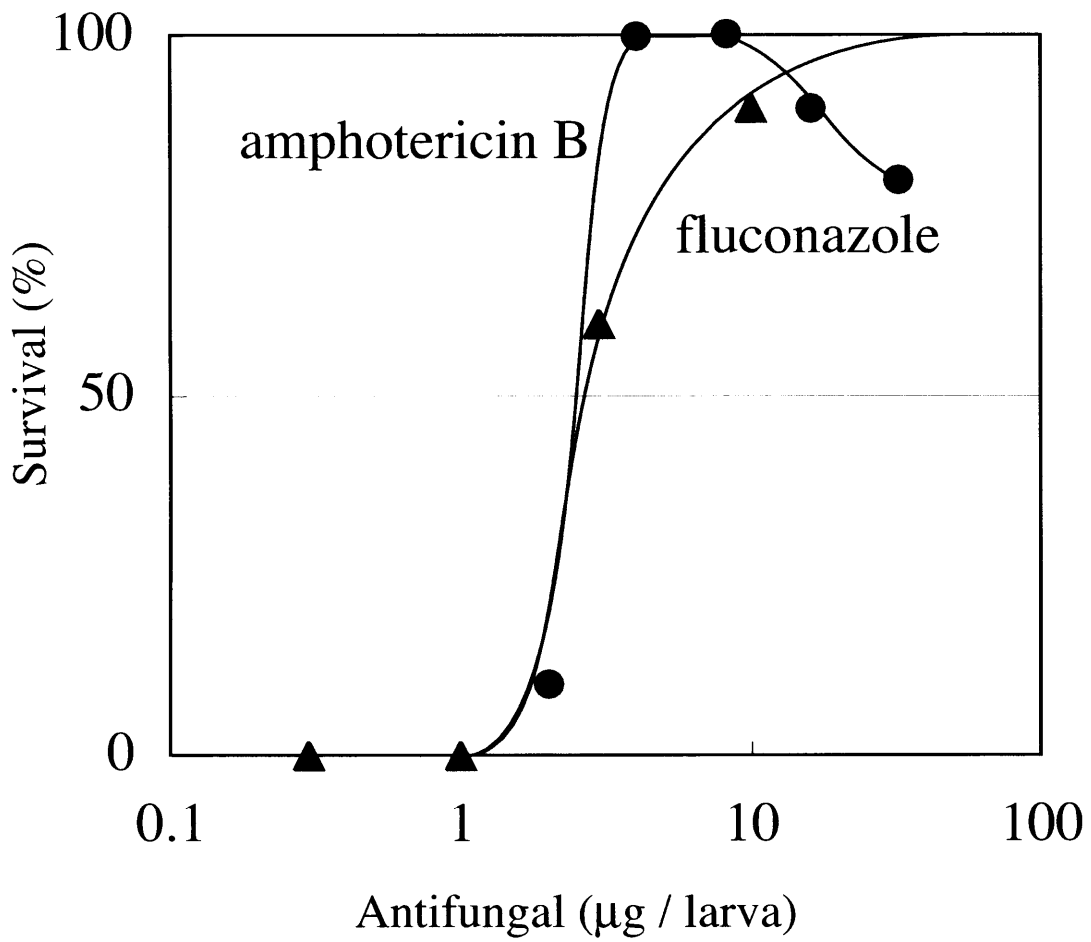


Fig. 3A *C. tropicalis*に感染させたカイコ幼虫に対する抗真菌薬の治療効果  
 2回以上の実験を行い、同じような結果が得られている。図には、その代表的な結果を示す。

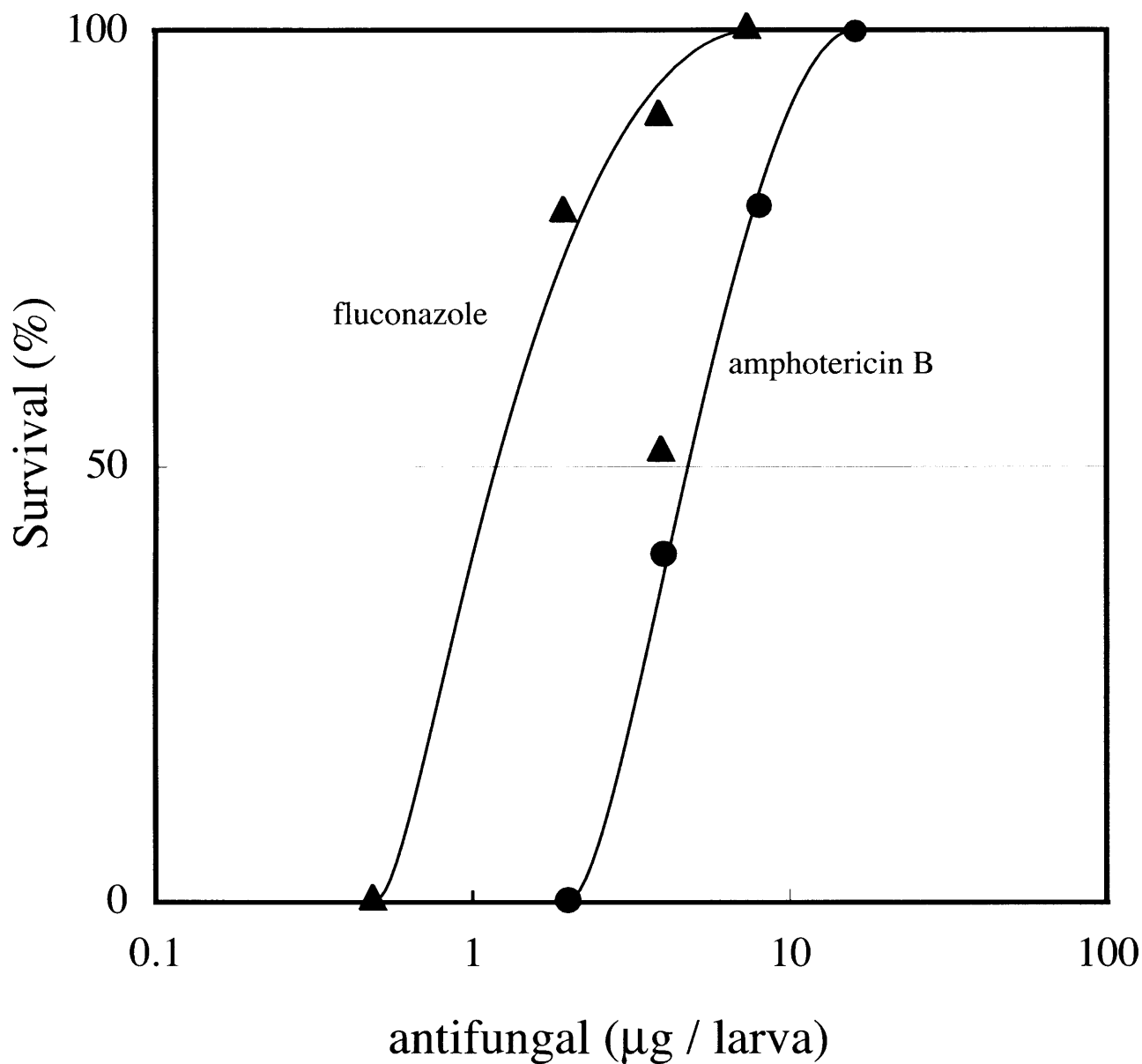


Fig. 3B *C. albicans*に感染させたカイコ幼虫に対する抗真菌薬の治療効果  
2回以上の実験を行い、同じような結果が得られている。図には、その代表的な結果を示す。

Table 2. カイコ幼虫感染モデルにおける *C. tropicalis* または *C. albicans* に対する抗真菌薬の ED<sub>50</sub> 値

Antifungal agent	True fungus	ED <sub>50</sub> in silkworm ( $\mu\text{g}/\text{g}\cdot\text{larva}$ )	MIC ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	ED <sub>50</sub> /MIC	
				Silkworm	Mouse <sup>a</sup>
Amphotericin B	<i>C. tropicalis</i>	1.8	3.2	0.6	0.2
	<i>C. albicans</i>	4.1	1.6	2.6	1.3
Fluconazole	<i>C. tropicalis</i>	1.8	1.6	1.1	7.4
	<i>C. albicans</i>	1.8	0.4	4.5	8.6

<sup>a</sup> ED<sub>50</sub> 値と MIC 値は過去に論文 48 にて報告された値である

## 第2章

### カイコ幼虫を用いた経口投与における 抗生物質の治療効果の評価

## 第1節 はじめに

ヒト臨床において抗生物質は血液内投与されるだけでなく、経口投与でも用いられる。抗生物質が経口投与で効果が現れる場合、薬物の使用が簡便であり、患者の生活の質の向上にも役に立つ。従って、薬物が経口投与可能か否かを調べることは必要不可欠である。ヒト臨床においてテトラサイクリンやクロラムフェニコールは経口投与されるが、カナマイシンやバンコマイシンは、敗血症の治療に対して経口投与では無効であることが知られている。この章ではカイコ幼虫での黄色ブドウ球菌感染モデル系における、これらの抗生物質の経口投与による治療効果のヒト臨床との対応の有無を検討した。

## 第2節 材料と方法

### 生きたカイコ幼虫における抗生物質の輸送

生きたカイコ幼虫の腹側から 27G シリンジ (テルモ) を用いて、抗生物質を腸管内に注射した。経時的に後足を切断し血液を採取した。採取した血液には 1 $\mu$ L の  $\beta$ メルカプトエタノールを加え、解析を行うまで -70 度にて保存した。クロラムフェニコールとバンコマイシンの濃度の定量は、カラムスイッチ HPLC を用いた。HPLC は、RT730 system controller (GL Sciences, Tokyo, Japan)、及び model 33 autosampler, plate cooler (System Instrument, Tokyo, Japan)、intelligent pumps (model 301) (Labo System, Tokyo, Japan)、valve unit (model 401) (Labo System)、Gastor 154 (Labo System)、L-4200 UV-VIS detector (Hitachi, Tokyo, Japan)、D-2500 integrator (Hitachi)により構成される。カラムには、trap カラム(CAPCELL PAK MG-C18 (35 x 4.6 mm i.d., 5  $\mu$ m, Shiseido))及び分離カラム(CAPCELL PAK MG-C18 (250 x 4.6 mm i.d., 5  $\mu$ m, Shiseido))を用いた。前処理は 50mM のリン酸ナトリウムバッファーを移動相とし、流速 0.5mL/min で溶出した、2.3 から 4.0 分のフラクションを、トラップカラムを介

して分離カラムに移した。分離は、移動相に 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8)/acetonitrile (70/30, v/v)を用い流速 1mL、カラムの温度は室温で行った。定量は OD<sub>280</sub> を測定した。用いたカイコ幼虫(1.8g)の血液量は<sup>32</sup>P]デオキシシチジン三リン酸を血管内に投与した実験より 0.67mL と推定した(data not shown)。

### 腸管標本における輸送アッセイ

5 令カイコ幼虫を氷上で 10 分間おいて麻酔後、断頭し腸内容物とともに peritrophic membrane を摘出した。緩衝液中で開腹後、傷を付けないように注意して中腸を摘出した。中腸の下端をもめん糸で結紮し種々の濃度の抗生物質を 500 $\mu$ L を封入し、上端を結紮後、緩衝液 10ml 中で室温 (25 度) にてインキュベートした。外液に出現した抗生物質の 280nm における吸光度を測定し、それぞれの各抗生物質の輸送量を求めた。抗生物質を含まない場合の測定値をバックグラウンドとして差し引いた。

## 第3節 結果

### (1) カイコ幼虫の感染モデル系における抗生物質の経口投与による治療効果の有無

黄色ブドウ球菌に感染させたカイコ幼虫の腸管内に種々の用量の抗生物質を投与しカイコ幼虫の生存率を求めた。クロラムフェニコール及びテトラサイクリンでは腸管内投与において用量の増加に伴った生存率の上昇が見られた。これに対してカナマイシン及びバンコマイシンでは腸管内にこれらの薬剤を 700 $\mu$ g 以上注射しても半数以上のカイコ幼虫が死亡し、治療効果が見られなかった (Fig.4 A, Table.3)。さらに、クロラムフェニコールやテトラサイクリンについては人工飼料中に混ぜて経口投与した場合でも治療効果が見られたのに対し、カナマイシンやバンコマイシンでは治療効果は見られなかった(Fig.4 B、



Table.3)。従って、カナマイシンやバンコマイシンはヒトの場合と同様にカイコ幼虫においても経口投与では無効である。

### (2) 生きたカイコ幼虫における抗生物質の腸管から血液への輸送

抗生物質の経口投与による治療効果は、腸管からの吸収速度の違いにより大きく影響される。カイコ幼虫においてバンコマイシンが経口投与では無効である理由が、低い腸管吸収性によるか否かを検証するため、生きたカイコ幼虫の腸管内に投与後、血中濃度上昇の有無を検討した。薬剤の血中濃度は HPLC による分離法により測定した。その結果、100 $\mu$ g のクロラムフェニコールを腸管内投与した場合には血中濃度が速やかに上昇後、薬物濃度が維持されたのに対し、500 $\mu$ g のバンコマイシンを腸管内投与した場合、血中濃度の上昇はほとんど認められなかった(Fig.5)。

### (3) 摘出腸管における抗生物質の輸送

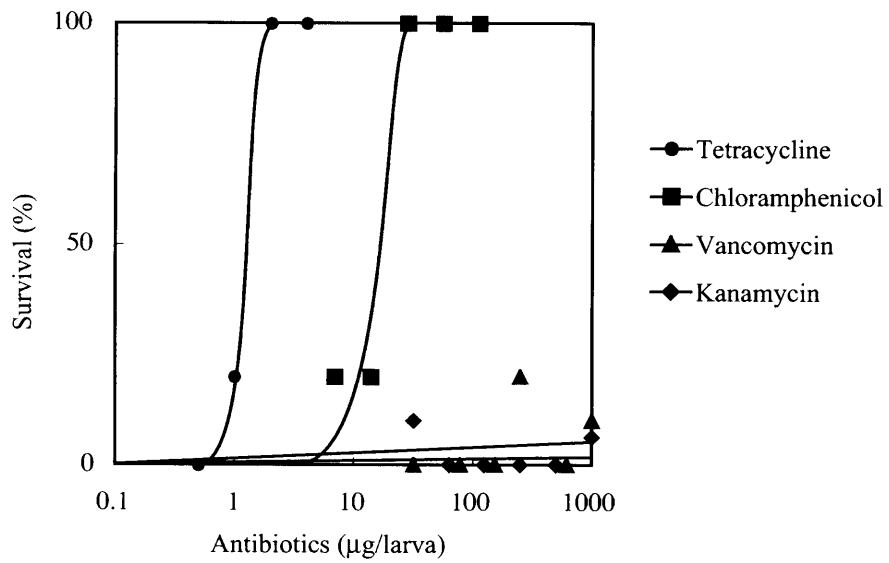
バンコマイシンの低い腸管吸収性を試験管内で検証するため、カイコ幼虫から摘出した腸管を用いてそれぞれの抗生物質の腸管透過速度を求めた。カイコ幼虫の腸管は透明な薄いキチン質から構成される内側の膜(peritrophic membrane)と、細胞から構成される外側の膜(midgut epithelium)の二重構造をとる(41)。それぞれの膜を摘出して両端を糸で縛り袋状にし、内側に 500 $\mu$ L の抗生物質の溶液を封入し、外側への輸送量を測定した。その結果、peritrophic membrane は、バンコマイシン、クロラムフェニコール及びテトラサイクリンのいずれに対しても高い透過性を示した(data not shown)。これに対して、midgut epithelium (以下、摘出腸管と記す) はクロラムフェニコール(Fig.6A)及びテトラサイクリン(Fig.6A)に対して高い透過性を示したが、バンコマイシン(Fig.6A)及びカナマイシン(data not shown)に対し

ではほとんど透過性を示さなかった。またバンコマイシンの濃度を 15mM にまで上昇させてもほとんど輸送が見られなかったが、テトラサイクリン及びクロラムフェニコールは 15mM まで濃度を上昇させても透過量の飽和が全く見られなかった(Fig.6B)。従って、カイコ腸管における、クロラムフェニコールやテトラサイクリンの透過は低親和性経路によると考えられる。以上の結果は、カイコ幼虫のモデル系においてバンコマイシン及びカナマイシンが経口投与で無効であるのは、腸管吸収性が低いためであることを示している。

#### 第4節 考察

ヒトにおいて経口投与では治療効果を示さないバンコマイシンやカナマイシンは、カイコ幼虫においても腸管内投与及び経口投与において治療効果を示さなかった。また、バンコマイシン及びカナマイシンが治療効果を示さないのは、腸管透過性が哺乳動物と同様に低いためであることが考えられた。従って、カイコ幼虫は経口投与で治療効果を示す化合物のスクリーニングに応用可能であると考えられる。また、カイコ幼虫の腸管における物質の腸管透過性は、哺乳動物とよく一致していると考えられる。この点については、次章でさらに検討を試みた。

A



B

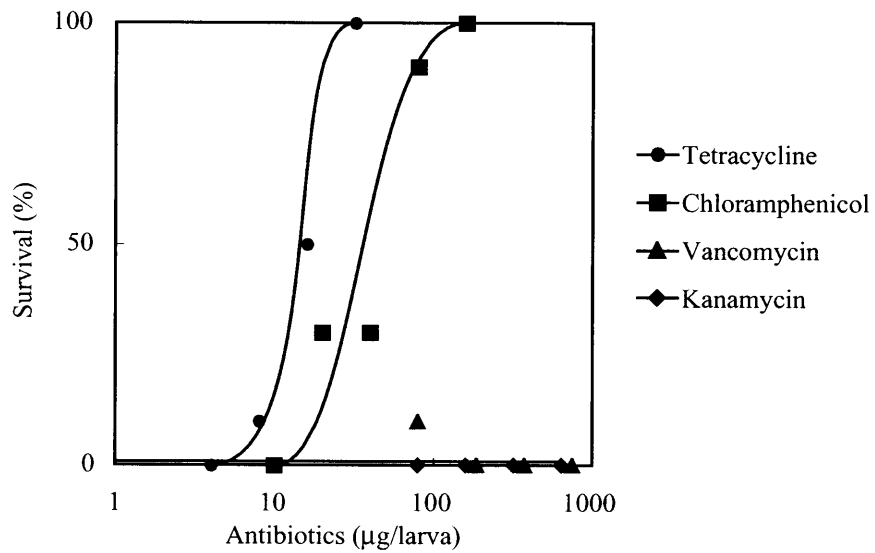


Fig. 4 *S. aureus*に感染させたカイコ幼虫に対する抗生物質の腸管内投与(A)、及び経口投与(B)による治療効果

Table 3. カイコ幼虫感染モデルにおいてバンコマイシン及びカナマイシンは経口投与で治療効果を示さない

Antibiotics	ED <sub>50</sub> (μg antibiotics / g·larva)		
	<i>i.h.</i> <sup>a</sup>	<i>i.m.</i> <sup>b</sup>	<i>p.o.</i> <sup>c</sup>
Chloramphenicol	9	11	40
Tetracycline	0.4	1	8
Vancomycin	0.3	>700	>400
Kanamycin	3	>700	>500

<sup>a</sup> intra hemocoelic

<sup>b</sup> intra midgut

<sup>c</sup> per oral

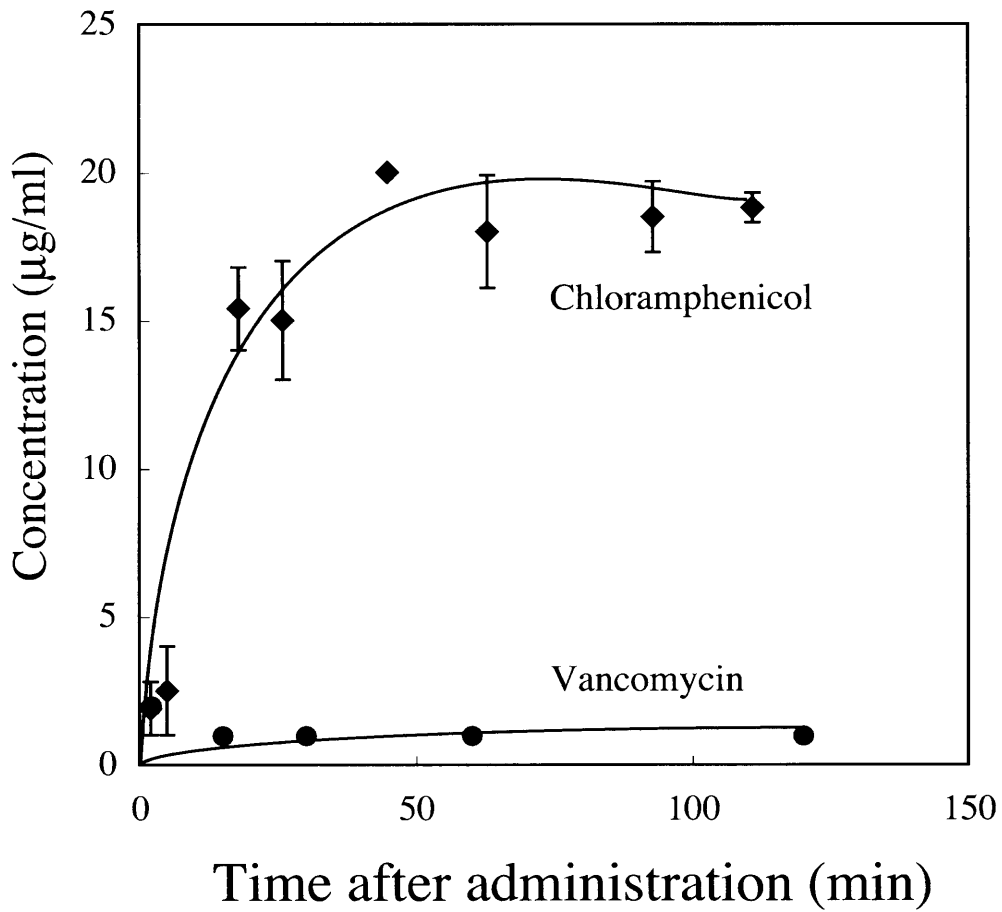
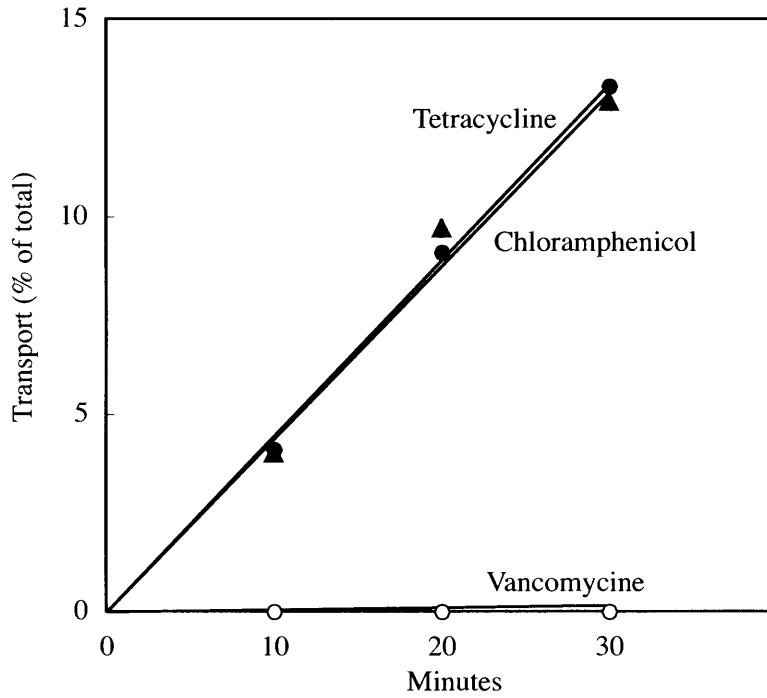


Fig. 5 生きたカイコ幼虫における、クロラムフェニコール及びバンコマイシンの腸管内から血液への輸送  
 すべての点は2回の実験の平均値であり、エラーバーは最大誤差を示す。

A



B

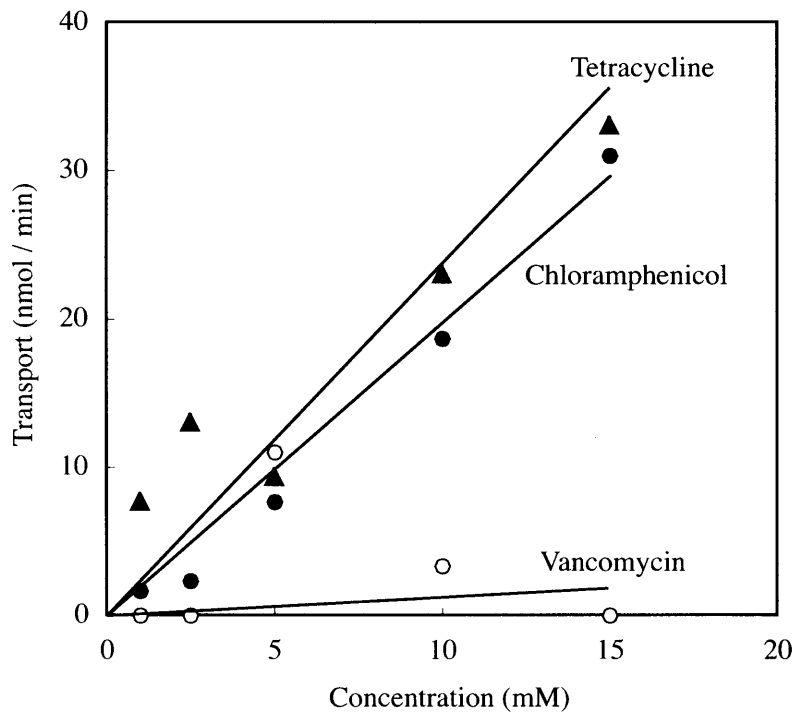


Fig. 6 摘出腸管における抗生物質の輸送  
 (A) 1mMのクロラムフェニコール及びバンコマイシンの摘出腸管からの輸送の時間経過、(B) 各濃度における抗生物質の摘出腸管からの輸送速度  
 すべての点は2回の実験の平均値を示す。

## 第3章

### カイコ幼虫の腸管の物質透過に与える 分子量及び油水分配係数の影響

## 第1節 はじめに

第3章において、バンコマイシン及びカナマイシン、テトラサイクリン、クロラムフェニコールの、カイコ幼虫における腸管内投与及び経口投与における治療効果の有無が、哺乳動物と一致することを述べた。この章では、カイコ幼虫の腸管透過性の特徴をさらに詳細に検討するため、薬物の腸管透過性に影響を与える因子として知られている、分子量及び油水分配係数について検討した。さらに、抗生物質の経口投与用に開発されたプロドラックと、そのエステラーゼによる分解産物（活性体）との、腸管透過性と治療効果の相関について検討した。

## 第2節 材料と方法

### 試薬、動物

カイコ幼虫は、第2章で述べた方法で飼育した。5令1日目のカイコ幼虫に抗生物質を含まない餌を与えて飼育し、実験に供した。バンコマイシン、セフカペンナトリウム及びセフカペンピボキシルは塩野義製薬(Shionogi Co. & Ltd., Osaka, Japan)から分与された。その他の試薬は、シグマ、和光純薬、ナカライテスクより購入した。 $[^3\text{H}]\text{D-Aspartic acid}$ ,  $[^3\text{H}]\text{Polyethylene glycol 400}$ ,  $[^{14}\text{C}]\text{Sucrose}$ ,  $[^{14}\text{C}]\text{Mannitol}$  は、American Radiolabeled Chemicals (St. Louis, Mo.)から、 $[^3\text{H}]\text{N-acetyl D-glucosamine}$ ,  $[^{14}\text{C}]\text{L-glucose}$ ,  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ ,  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  は Amersham Pharmacia Biotech (Tokyo, Japan)から購入した。

### 摘出腸管を用いた薬物の透過アッセイ

本論文第3章に記述した方法を用いて、カイコ幼虫における薬物の透過速度を求めた(39)。すなわち、5令5日目(L5D5)のカイコ幼虫から腸管を注意深く摘出後、腸管の下



端を木綿糸で結紮し、被試験物質の水溶液 1mM を 500 $\mu$ L 封入し、上端を結紮し袋状にした。

この袋状にした腸管を緩衝液中で 25 $^{\circ}$ C にてインキュベートし、経時的に外液 500 $\mu$ L をサンプリングした。放射標識化合物の場合はクリアゾル I (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) に溶解後、液体シンチレーションカウンターにより放射能を測定した。また色素や抗生物質については吸光度を測定し、濃度を求めた。

セフカペンナトリウム及びセフカペンカルボキシルについては、以下の方法に従い前処理を行い、HPLC 法により濃度を求めた。すなわち、サンプル 500 $\mu$ l に、8.5%リン酸を 4 $\mu$ L 加え、pH を 4 に調整後、内部標準液として 2 $\mu$ g/mL coumarin-3-carboxylic acid (Wako Pure Chemicals, Osaka, Japan) を含む acetonitrile (Kanto Chemical Co., Tokyo, Japan) を 500 $\mu$ L 加え、疎水性樹脂 (Varian Bond Elute C18 カラム; 3mL/500 mg, Harbor city, CA, USA) にて、以下の手順で部分精製した。BOND ELUTE C-18 カラムをメタノール 2mL で 3 回、50 mM リン酸緩衝液 (pH4.5) 2mL で 3 回洗浄後、サンプルを吸着させ、50mM リン酸緩衝液 (pH4.5) 2mL で 1 回洗浄し、さらに 10mM リン酸緩衝液 (pH6.0) と 1mM tetra-n-octylammonium bromide (TOAB) (Wako pure chemical, Osaka, Japan) を含むメタノールを 9:1 の比率で混合した液 1mL で洗浄後、80%メタノール 1mL で溶出した。溶出液を遠心エバポレーションにより濃縮した。得られたサンプルを 50mM リン酸緩衝液に溶解し Millex-LH (Millipore, Bedford, USA) でフィルターし、HPLC (model 301, Hitachi, Tokyo, Japan, カラム; ODS C-18, 移動相; 50mM リン酸緩衝液 (pH6.0) と 10mM TOAB (Wako pure chemical, Osaka, Japan) を含むアセトニトリルを 64:36 で混合した液, 流量; 0.8mL/min) によりセフカペンナトリウムとセフカペンピボキシルを分離し、それぞれの濃度を OD<sub>280</sub> 値から求めた。

## 油水分配係数の測定

放射標識化合物や、色素、抗生物質の油水分配係数はフラスコ振蕩法により求めた(42)。すなわち被試験物質を緩衝液(10mM Hepes, 0.9% NaCl)に溶解し、あらかじめこの緩衝液で飽和させておいた n-octanol を等量加え、振蕩後、静置した。その後、水層における被試験物質の濃度を定量した。油水分配係数は、(n-octanol 層における濃度)/(緩衝液層における濃度)として求めた(43)。

### カイコ幼虫の血液内における抗生物質の濃度の測定

セフカペンナトリウム、あるいはセフカペンピボキシルを 0.9% NaCl に溶解し(5mg/mL)、腸管内に 0.05mL 注射後、カイコ幼虫の後足を切断し血液を採取した。採取した血液に、直ちに 1 $\mu$ L の  $\beta$ -メルカプトエタノールを加え、さらに 8.5%リン酸液を添加して pH を 4.5 に調整した。その後は摘出腸管を用いた透過アッセイと同様の方法で、Bond Elute C18 カラムを用いて部分精製を行い、HPLC により分離、定量した。

### 抗生物質の治療効果の評価

第 1 章の方法に従って行った。

### 第 3 節 結果

(1) カイコ幼虫腸管の非特異的経路を介した物質透過に影響を与える薬物分子の分子量及び疎水性の効果

本研究で用いた条件では、いずれの化合物の透過速度は、より高濃度でも飽和することはなかった(data not shown)。従って、これらの物質は特異的なトランスポーターを介

さない非特異的経路を透過していると考えられる。私は、カイコ幼虫の腸管透過性における親水性化合物の分子量の影響を検討した。その結果、分子量 400 を超える化合物は例外なくカイコ幼虫の腸管の内側から外側へ透過しないことが分かった (Fig. 7)。分子量 400 以下の化合物では、分子量が低いほど透過性が高い傾向にあった。以上の結果は、カイコ幼虫腸管には高分子量の親水性物質に対する透過障壁が存在することを示している。

次に私は、カイコ幼虫の腸管透過速度に与える物質の疎水性の影響を検討した。様々な油水分配係数を示す、分子量が 300~700 である色素及び抗生物質について摘出腸管での透過性を検討した。その結果、油水分配係数と腸管透過速度の間には正の相関性が見られることが分かった (Fig. 8)。以上の結果は、物質のカイコ幼虫の腸管の透過性には哺乳動物における場合と同様に透過する化合物の分子量と油水分配係数が影響することを示している。

## (2) プロドラッグのカイコ幼虫腸管からの吸収性と腸管内投与による治療効果

抗生物質の腸管透過性と治療効果の対応について検討した。セフェム系抗生物質であるセフカペンナトリウム(CFPN-Na)は、ヒト臨床において、腸管吸収性が低く経口投与では治療効果が得られない。セフカペンピボキシル(CFPN-PI)は、経口での治療効果を持たせるために開発された CFPN-Na のプロドラッグである (Fig. 9)(44,45)。CFPN-Na のカルボキシル基に疎水性基がエステル結合したことにより油水分配係数が上昇し、腸管からの吸収性が上昇すると考えられている。まず、カイコ幼虫の腸管における CFPN-PI と CFPN-Na の透過性を *in vitro* および *in vivo* で比較した。カイコ幼虫の摘出腸管に CFPN-PI 及び CFPN-Na を封入し、透過する速度を比較した結果、CFPN-PI は CFPN-Na に比べ 3 倍速く透過した (Fig. 10A)。また、CFPN-PI の場合、透過した薬剤の 80% は CFPN-Na に変化していた

(data not shown)。従って、CFPN-PI は腸管に存在するエステラーゼによって CFPN-Na へと分解されたと考えられる。

次に、CFPN-Na 及び CFPN-PI の生きたカイコ幼虫における腸管吸収性を比較した。腸管内注射は、前章でも述べたように薬剤の経口投与での治療有効性を評価する手段となる(39)。それぞれの薬剤を、カイコ幼虫の腸管内に注射し、血中濃度の経時的变化を調べた。その結果、CFPN-PI は投与後すみやかに腸管から吸収され、CFPN-Na として血中に存在することが分かった。CFPN-PI を投与後、3時間以降においても CFPN-Na の血中濃度は保たれていた(Fig. 10B)。一方、CFPN-Na を腸管内投与した場合は、血中濃度はゆっくりと上昇し、投与後3時間後においても CFPN-PI を投与した場合に比べ低い血中濃度を示した。

次に、カイコ幼虫における黄色ブドウ球菌感染モデルにおける CFPN-Na と CFPN-PI の治療効果の差異を検討した。血管内投与の場合には、両薬剤の  $ED_{50}$  値はほぼ同じ値であった(Fig. 11A, Table.4)。HPLC による解析では CFPN-PI を投与した場合でも CFPN-Na が主に検出されたことから、血中に投与した CFPN-PI は、血中に存在するエステラーゼにより分解されて、活性型に変換され、治療効果を示したと考えられる (data not shown)。一方、腸管内投与においては、CFPN-PI の  $ED_{50}$  値は、CFPN-Na に比べ6分の1の値を示した(Fig. 11B, Table.4)。従って、カイコ幼虫感染モデルにおいても、哺乳動物の場合と同様に CFPN-PI は CFPN-Na に比べ腸管吸収性が高く、その結果として治療効果が高まっていると考えられる。

#### 第4節 考察

本章では、特異的トランスポーターが存在しないと考えられる種々の化合物についてカイコ幼虫の腸管透過性を検討した。非特異的経路による腸管透過性は、カイコ幼虫においても、哺乳動物の腸管と同様に物質の分子量と油水分配係数に影響されることが分かった (Fig. 7,8)。従って、両者の腸管の形態的構造は大きく異なっているが、非特異的経路を介した腸管吸収は共通した機構によっていると考えられる。抗生物質バンコマイシン(M.W. 1485)やカナマイシン(M.W. 484)はカイコ幼虫の腸管を透過せず、カイコ幼虫での黄色ブドウ球菌感染モデルにおいて、経口投与では治療効果を示さない。本論文で述べた結果から、水溶性のバンコマイシンやカナマイシンは分子量が大きいため腸管を透過できないと考えられる。また、分子量 400 以下の親水性物質は腸管細胞間の傍細胞経路を透過していると考えられる。その場合、透過速度は必ずしも分子量だけに依存するのではなく、L-glucose や PEG400 のように透過速度が同一の分子量の化合物に比べ著しく高い物質や、D-aspartic acid や Phenol Red のように低い物質が存在する (Fig. 7)。これらの物質のカイコ幼虫腸管の透過性を決定する要因について、細胞間隙に存在する物質と透過物質との相互作用により透過速度が影響される可能性が考えられるが、その詳細は現段階で不明である。一方、ロードミン 6G (M.W. 479)やセフカペンピボキシル(M.W. 622)のような脂溶性が高い分子は、分子量が400以上であるにもかかわらず、カイコ幼虫の腸管を透過する(Fig. 8)。これらの物質は、腸管細胞の細胞膜の脂質二重層に溶け込んで透過すると考えられる。

また、カイコ幼虫腸管における物質透過性は、検討した限りの薬剤においては、ヒトの経口投与でのバイオアベイラビリティと相関している傾向が得られた(Table.5)。従って、カイコ幼虫は薬剤の経口吸収性を調べる上においても有用であると考えられる。ヒトにおける腸管の非特異的経路の透過に影響を与える分子の性質については、不明な点が多く、経口用医薬品を設計する上での障壁となっている。カイコ幼虫の腸管系は、この問題

を解明する上で有用な情報をもたらすと期待される。

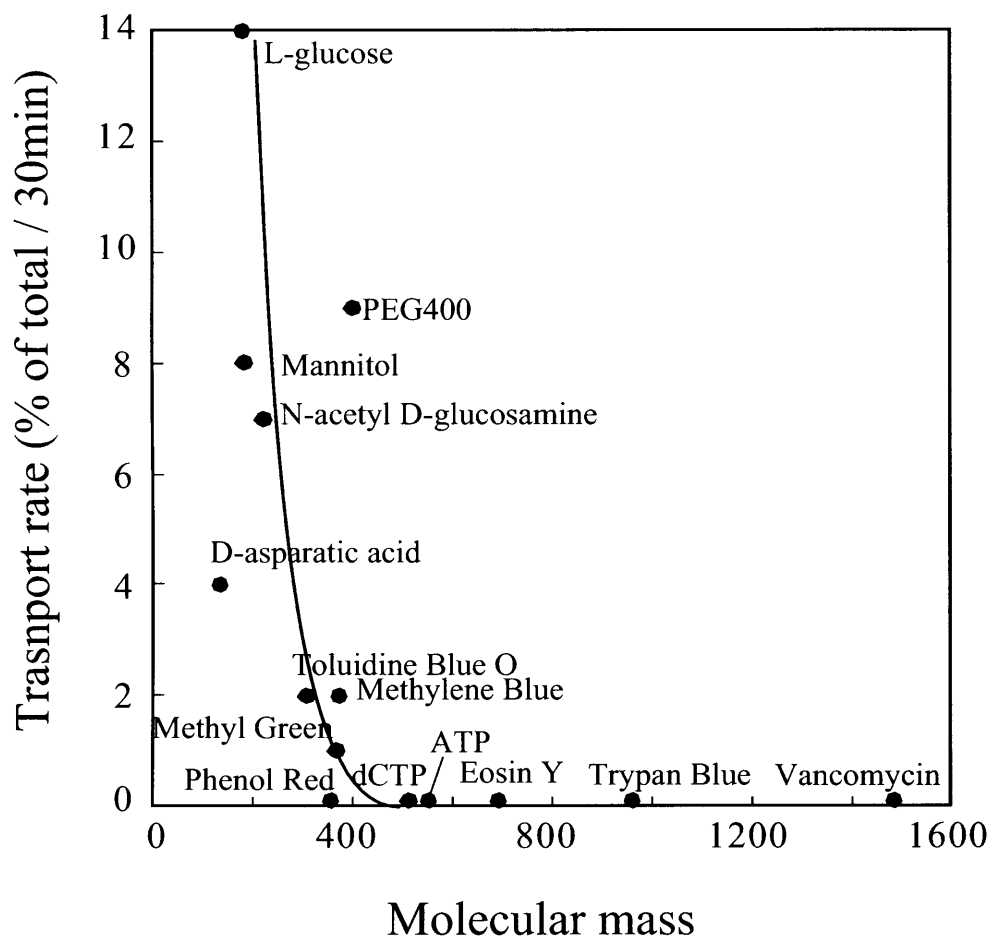


Fig. 7 カイコ幼虫摘出の親水性物質の透過性に与える分子量の影響

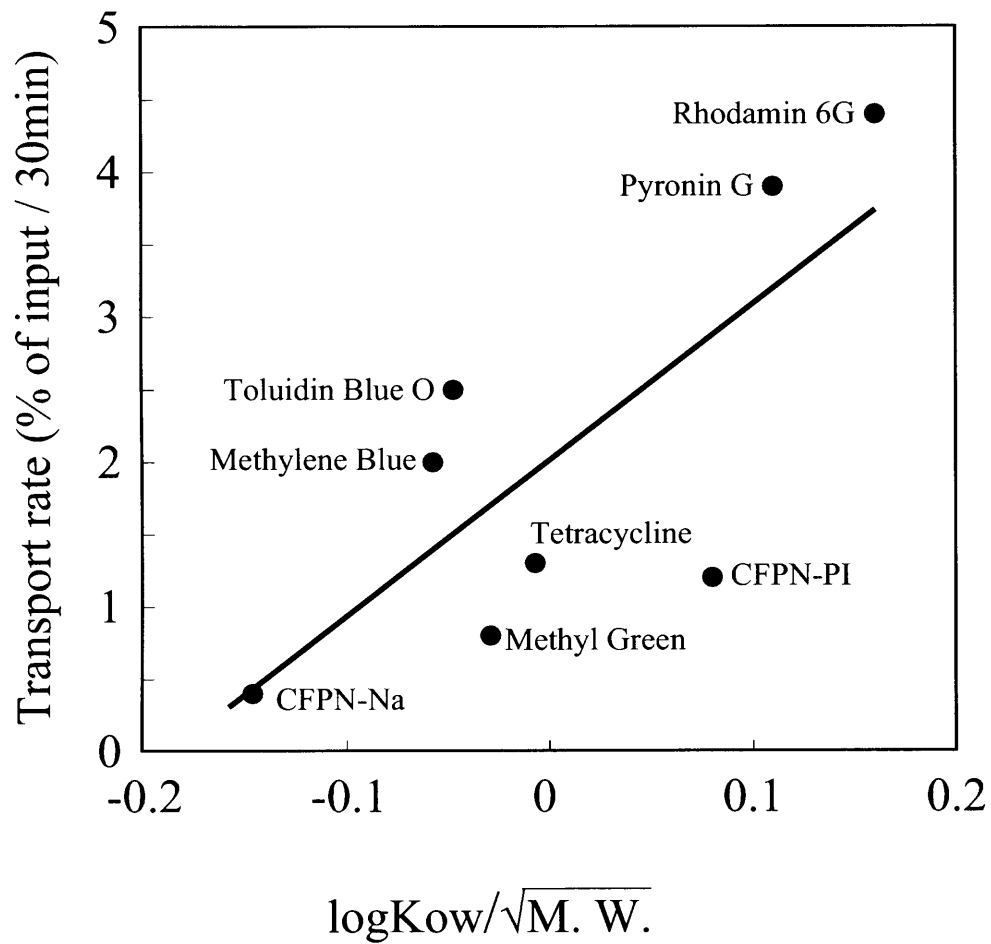
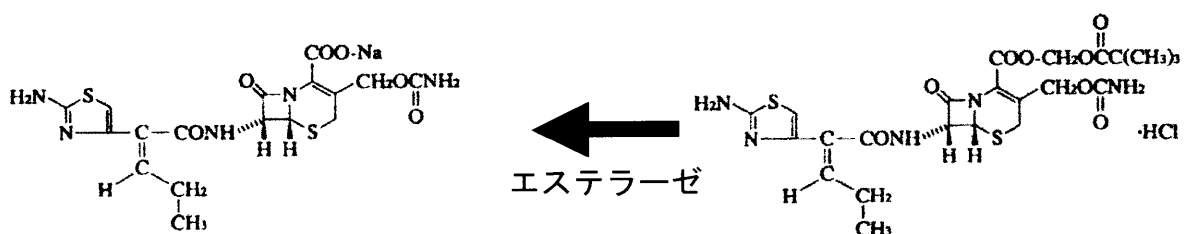


Fig. 8 カイコ幼虫摘出腸管の物質透過における物質の疎水性の影響





セフカペンナトリウム (CFPN-Na)  
(活性型)

セフカペンピボキシル (CFPN-PI)

Fig. 9 セフカペンピボキシルとセフカペンナトリウムの構造  
CFPN-PIはCFPN-Naをピボキシル化したプロドラッグである。CFPN-PIは腸管に存在するエステラーゼによって分解され、活性型のCFPN-Naに変換される。

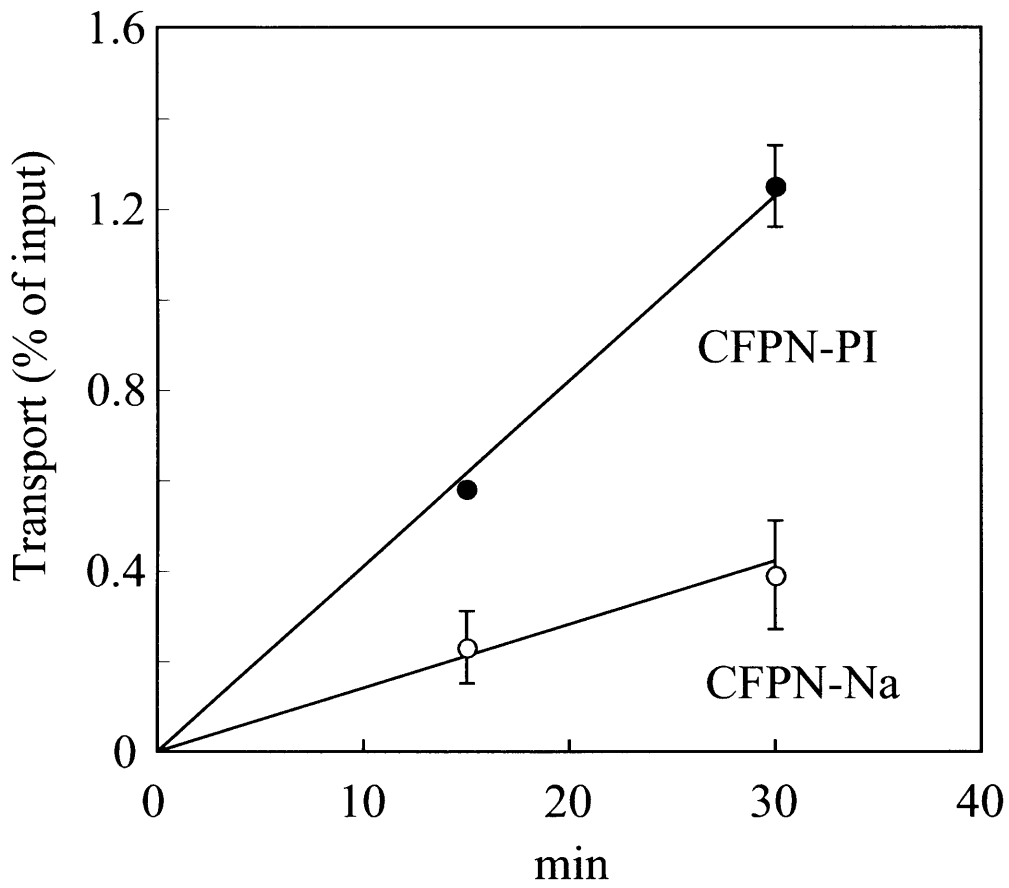


Fig. 10A カイコ幼虫摘出腸管におけるCFPN-PI及びCFPN-Naの透過性  
2回の実験を行い、同じような結果が得られている。図には、その代表的な結果を示す。

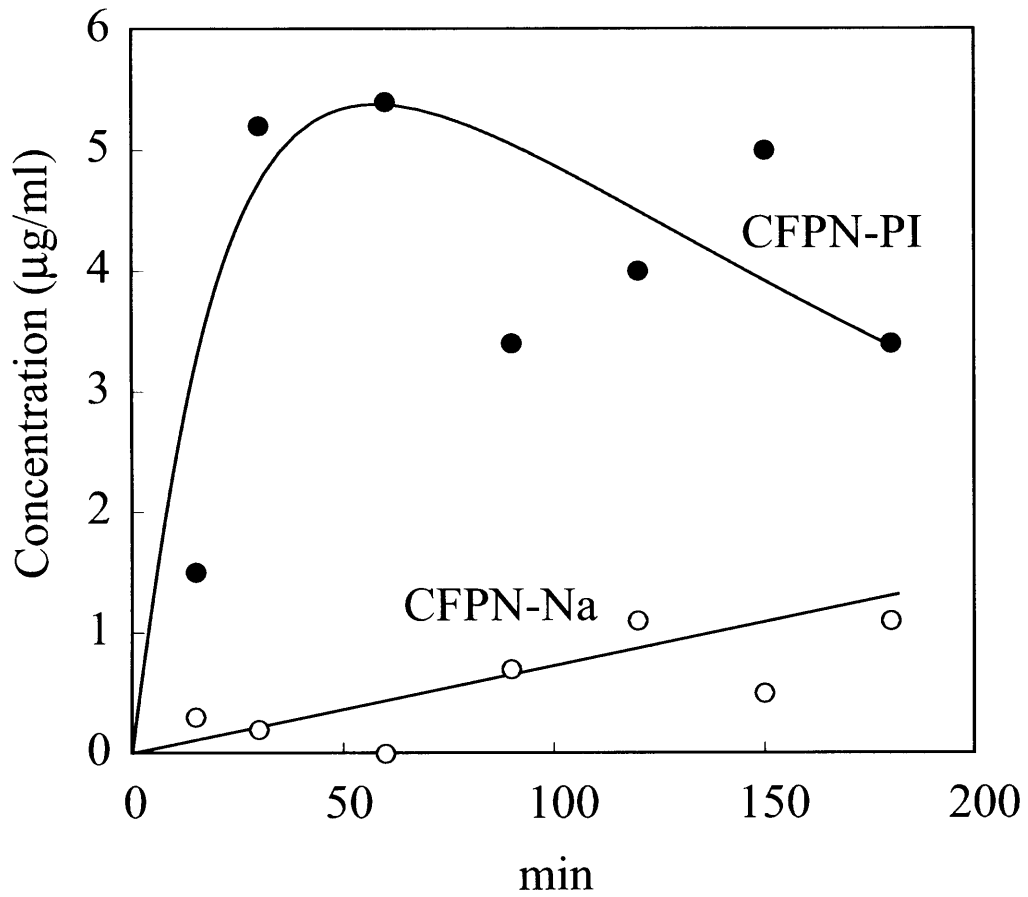
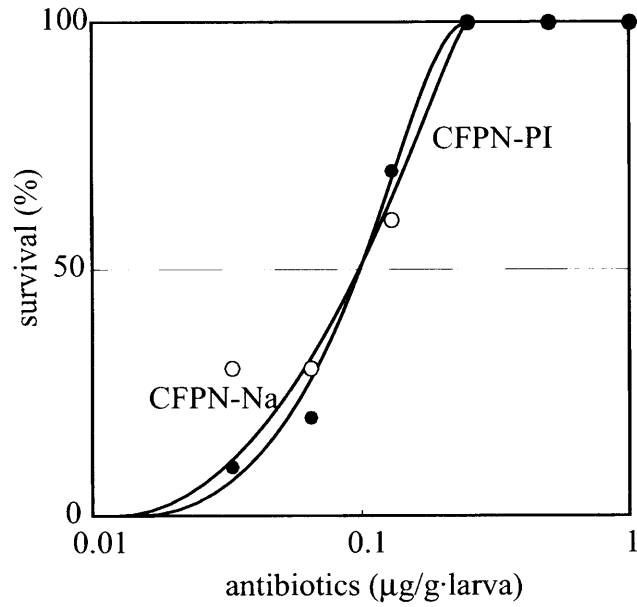


Fig. 10B 生きたカイコ幼虫におけるCFPN-PI及びCFPN-Naの腸管透過性  
 2回の実験を行い、同じような結果が得られている。図には、その代表的な結果を示す。

A



B

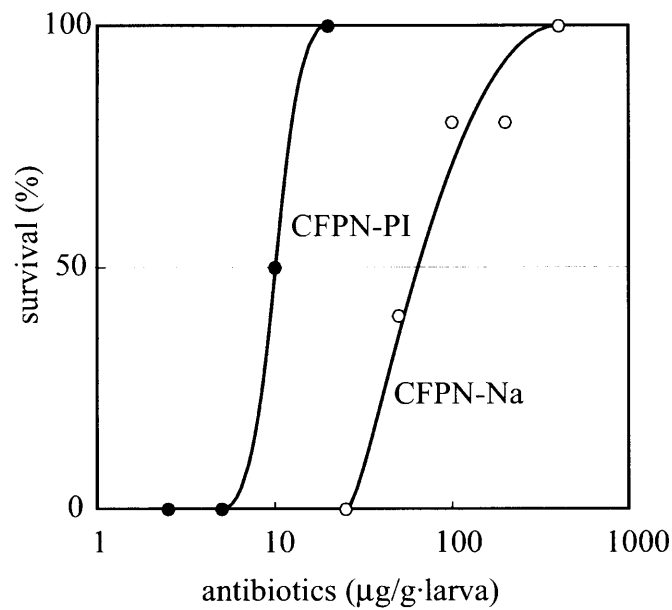


Fig. 11 カイコ幼虫の黄色ブドウ球菌感染モデルにおけるCFPN-PI及びCFPN-Naの治療効果  
 A, 血液内投与、B, 腸管内投与。3回の実験を行い、同じような結果が得られている。図には、その代表的な結果を示す。

Table 4. カイコ幼虫黄色ブドウ球菌感染モデルにおける CFPN-PI 及び CFPN-Na の ED<sub>50</sub> 値

	ED <sub>50</sub> (μg/g•larva)		MIC (μg/mL)
	<i>i.h.</i> <sup>a</sup>	<i>i.m.</i> <sup>b</sup>	
CFPN-Na	0.06	25	0.5
CFPN-PI	0.09	4.2	64

<sup>a</sup> intra hemocoelic

<sup>b</sup> intra midgut.

Table 5. カイコ幼虫の腸管と他のモデルにおける、非特異的輸送による抗生物質の透過性の比較

	Silkworm	Human	Caco-2 cell
	Transport (% of total/30min)	Oral bioavailability <sup>a</sup> (%)	P <sub>app</sub> <sup>a</sup> (10 <sup>-5</sup> cm/s)
tetracycline	1.3	70	0.162
CFPN-PI	1.2	40	0.785
vancomycin	<1	<1	<0.01

<sup>a</sup> ヒトにおけるバイオアベイラビリティ及び Caco-2 細胞における見かけの透過率(P<sub>app</sub>)のデータは論文 49-52 から引用した

## 総括

## (1) 実験動物としてのカイコ幼虫の利点

カイコ幼虫は、取り扱いが簡単で、飼育コストが安いなど、他の哺乳動物に比べ優れた利点を有している。また、マウスなどの哺乳動物に比べ倫理的な問題がない。さらに、他の昆虫のモデルと比べ、簡単に正確な注射ができる。最近、ショウジョウバエや線虫が感染モデル動物として有用であるとの報告がされているが、カイコ幼虫はこれらの無脊椎動物と比べ、大型であり、腸管などの臓器を摘出して薬物の透過性や代謝を調べることができる。また、薬剤や病原性細菌の血液内注射と腸管内注射を区別して行うことが可能である。従って、カイコ幼虫は薬物の治療効果を評価するためのモデルとして優れていると考えられる。また、カイコ幼虫の腸管外膜は単層の細胞からなっている。昆虫は開放血管系なので、腸管の外側に複雑な血管系が存在せず腸管外へ透過した物質はそのまま血液内に入る。また、哺乳動物の場合は吸収された薬物は、門脈を通過して、肝臓で肝初回通過効果を受けるが、カイコ幼虫の場合はその効果はない。このようにカイコ幼虫の腸管透過系は、ほ乳類に比べてきわめて単純な構造からなっている。従って、カイコ幼虫は薬物の腸管吸収機構を理解する上でもよい材料になると考えられる。

## (2) 抗生物質の治療効果の評価系としてのカイコ幼虫

臨床で用いられている抗生物質は、カイコ幼虫でも黄色ブドウ球菌に対し治療効果を示し、ED<sub>50</sub> 値による定量的な評価が可能であった。さらに、カイコ幼虫の系での ED<sub>50</sub> 値はマウスを用いたときの値とおおよそ一致していた。この結果から、カイコ幼虫における抗生物質の体内動態が、哺乳動物と変わらない可能性が考えられる。また、黄色ブドウ球菌だけではなく、*S. maltophilia* や *P. aeruginosa* などの他の日和見病原性細菌や真菌に対する感染症治療薬の治療効果の検討ができた。従って、カイコ幼虫は、抗生物質での治療



効果の評価系として用いることが可能であると考えられる。

### (3) カイコ幼虫腸管の物質透過の特性

カイコ幼虫の腸管の薬剤透過性には、哺乳動物の腸管と同様に、油水分配係数と分子量が影響していた。また、抗生物質の腸管透過性と治療効果の有無は、哺乳動物と一致していた。従って、カイコ幼虫の腸管における物質透過の特性は、哺乳動物と類似していると考えられる。

### (4) 産業への応用

カイコ幼虫を用いた感染実験モデルは、これまでにない治療効果を指標とした抗生物質のスクリーニング系として有用であると考えられる。従来、抗生物質の探索は、抗菌活性を指標に行われており、精製を実施しても治療効果を示すか否かは不明であり、治療効果を示す化合物の探索という観点から極めて非効率であると考えられる。一方、カイコ幼虫の感染モデル系は治療効果を指標にサンプルを効率的に検索することが可能である。また、過去に試されたことがない手法であることから、新規抗生物質が発見できる可能性があるのではないかと考えている。

## 参考文献

1. **Fleming, A.** 1929. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. Influenzae*. Br. J. Exper. Path. **5**:226-236.
2. **Ehrlich, J., Q. R. Bartz, R. M. Smith, and J. D. A.** 1947. Chloromycetin, a new antibiotic from a soil actinomycete. Science **106**:418.
3. **Umezawa, H., M. Ueda, K. Maeda, K. Yagishita, S. Kondo, Y. Okami, R. Utahara, Y. Osato, K. Nitta, and T. Takeuchi.** 1957. Production and isolation of a new antibiotic: kanamycin. J Antibiot (Tokyo) **10**:181-188.
4. **Guignard, B., J. M. Entenza, and P. Moreillon.** 2005. Beta-lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Curr Opin Pharmacol **5**:479-489.
5. **Akimitsu, N., H. Hamamoto, R. Inoue, M. Shoji, A. Akamine, K. Takemori, N. Hamasaki, and K. Sekimizu.** 1999. Increase in resistance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to beta-lactams caused by mutations conferring resistance to benzalkonium chloride, a disinfectant widely used in hospitals. Antimicrob Agents Chemother **43**:3042-3043.
6. **Hiramatsu, K., L. Cui, M. Kuroda, and T. Ito.** 2001. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Trends Microbiol **9**:486-493.
7. **Baba, T., F. Takeuchi, M. Kuroda, H. Yuzawa, K. Aoki, A. Oguchi, Y. Nagai, N. Iwama, K. Asano, T. Naimi, H. Kuroda, L. Cui, K. Yamamoto, and K. Hiramatsu.** 2002. Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. Lancet **359**:1819-1827.
8. **Herold, B. C., L. C. Immergluck, M. C. Maranan, D. S. Lauderdale, R. E. Gaskin, S. Boyle-Vavra, C. D. Leitch, and R. S. Daum.** 1998. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children with no identified predisposing risk. Jama **279**:593-598.

9. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*--Pennsylvania. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2002. **51**:902.
10. **Weigel, L. M., D. B. Clewell, S. R. Gill, N. C. Clark, L. K. McDougal, S. E. Flannagan, J. F. Kolonay, J. Shetty, G. E. Killgore, and F. C. Tenover.** 2003. Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. Science **302**:1569-1571.
11. **Whitener, C. J., S. Y. Park, F. A. Browne, L. J. Parent, K. Julian, B. Bozdogan, P. C. Appelbaum, J. Chaitram, L. M. Weigel, J. Jernigan, L. K. McDougal, F. C. Tenover, and S. K. Fridkin.** 2004. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in the absence of vancomycin exposure. Clin Infect Dis **38**:1049-1055.
12. **Orlans, F. B., T. L. Beauchamp, R. Dresser, D. B. Morton, and J. P. Gluck.** 1998. The Human Use of Animals: Case Studies in Ethical Choice. Oxford University Press, New York and Oxford.
13. **Baumans, V.** 2004. Use of animals in experimental research: an ethical dilemma? Gene Ther **11 Suppl 1**:S64-66.
14. **Lemaitre, B., E. Nicolas, L. Michaut, J. M. Reichhart, and J. A. Hoffmann.** 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. Cell **86**:973-983.
15. **Bernal, A., and D. A. Kimbrell.** 2000. *Drosophila Thor* participates in host immune defense and connects a translational regulator with innate immunity. Proc Natl Acad Sci U S A **97**:6019-6024.
16. **Mansfield, B. E., M. S. Dionne, D. S. Schneider, and N. E. Freitag.** 2003. Exploration of host-pathogen interactions using *Listeria monocytogenes* and *Drosophila melanogaster*. Cell

Microbiol 5:901-911.

17. **Needham, A. J., M. Kibart, H. Crossley, P. W. Ingham, and S. J. Foster.** 2004. *Drosophila melanogaster* as a model host for *Staphylococcus aureus* infection. Microbiology **150**:2347-2355.
18. **Kurz, C. L., S. Chauvet, E. Andres, M. Aurouze, I. Vallet, G. P. Michel, M. Uh, J. Celli, A. Filloux, S. De Bentzmann, I. Steinmetz, J. A. Hoffmann, B. B. Finlay, J. P. Gorvel, D. Ferrandon, and J. J. Ewbank.** 2003. Virulence factors of the human opportunistic pathogen *Serratia marcescens* identified by *in vivo* screening. Embo J **22**:1451-1460.
19. **Ruiz-Diez, B., P. Sanchez, F. Baquero, J. L. Martinez, and A. Navas.** 2003. Differential interactions within the *Caenorhabditis elegans*-*Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis model. J Theor Biol **225**:469-476.
20. **Bae, T., A. K. Banger, A. Wallace, E. M. Glass, F. Aslund, O. Schneewind, and D. M. Missiakas.** 2004. *Staphylococcus aureus* virulence genes identified by *bursa aurealis* mutagenesis and nematode killing. Proc Natl Acad Sci U S A **101**:12312-12317.
21. **Tan, M. W., S. Mahajan-Miklos, and F. M. Ausubel.** 1999. Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Pseudomonas aeruginosa* used to model mammalian bacterial pathogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A **96**:715-720.
22. **D'Argenio, D. A., L. A. Gallagher, C. A. Berg, and C. Manoil.** 2001. *Drosophila* as a model host for *Pseudomonas aeruginosa* infection. J Bacteriol **183**:1466-1471.
23. **Kaito, C., N. Akimitsu, H. Watanabe, and K. Sekimizu.** 2002. Silkworm larvae as an animal model of bacterial infection pathogenic to humans. Microb Pathog **32**:183-190.
24. **Hamamura, Y.** 1959. Food selection by silkworm larvae. Nature **183**:1746-1747.

25. **Hamamura, Y., K. Kuwata, and H. Masuda.** 1966. Effect of gallic acid on the growth of the silkworm larvae *Bombyx mori* L. *Nature* **212**:1386-1387.
26. **Imamura, M., and M. Yamakawa.** 2002. Molecular cloning and expression of a Toll receptor gene homologue from the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochim Biophys Acta* **1576**:246-254.
27. **Vilmos, P., and E. Kurucz.** 1998. Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system. *Immunol Lett* **62**:59-66.
28. **Hoffmann, J. A.** 2003. The immune response of *Drosophila*. *Nature* **426**:33-38.
29. **Beutler, B.** 2004. Innate immunity: an overview. *Mol Immunol* **40**:845-859.
30. **Morris, R. (ed.).** 1978. *Biochemistry of insects*. Academic press, New York.
31. **Niwa, R., T. Matsuda, T. Yoshiyama, T. Namiki, K. Mita, Y. Fujimoto, and H. Kataoka.** 2004. CYP306A1, a cytochrome P450 enzyme, is essential for ecdysteroid biosynthesis in the prothoracic glands of *Bombyx* and *Drosophila*. *J Biol Chem* **279**:35942-35949.
32. **Khoo, H. G., and K. P. Wong.** 1993. Sulphate conjugation of serotonin and N-acetylserotonin in the mosquito, *Aedes togoi*. *Insect Biochem Mol Biol* **23**:507-513.
33. **Tanaka, A., M. Yamamura, S. Kawamoto, and S. Fukui.** 1977. Production of uricase by *Candida tropicalis* using n-alkane as a substrate. *Appl Environ Microbiol* **34**:342-346.
34. **Mukai, H., O. Takeda, K. Asada, I. Kato, S. Y. Murayama, and H. Yamaguchi.** 1992. cDNA cloning of an aspartic proteinase secreted by *Candida albicans*. *Microbiol Immunol* **36**:1207-1216.
35. **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** 1997. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard. NCCLS document M27-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.

36. **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** 2000. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 5th ed. Approved standard M7-A4. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
37. **Iwanaga, M., M. Kurihara, M. Kobayashi, and W. Kang.** 2002. Characterization of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus *orf68* gene that encodes a novel structural protein of budded virus. *Virology* **297**:39-47.
38. **Tan, Y. R., J. C. Sun, X. Y. Lu, D. M. Su, and J. Q. Zhang.** 2003. Entry of *Bombyx mori* cytopovirus 1 into midgut cells in vivo. *J Electron Microsc (Tokyo)* **52**:485-489.
39. **Hamamoto, H., K. Kurokawa, C. Kaito, K. Kamura, I. Manitra Razanajatovo, H. Kusuhara, T. Santa, and K. Sekimizu.** 2004. Quantitative evaluation of the therapeutic effects of antibiotics using silkworms infected with human pathogenic microorganisms. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:774-779.
40. **Kaito, C., K. Kurokawa, Y. Matsumoto, Y. Terao, S. Kawabata, S. Hamada, and K. Sekimizu.** 2005. Silkworm pathogenic bacteria infection model for identification of novel virulence genes. *Mol Microbiol* **56**:934-944.
41. **Mitsuhashi, W., and K. Miyamoto.** 2003. Disintegration of the peritrophic membrane of silkworm larvae due to spindles of an entomopoxvirus. *J Invertebr Pathol* **82**:34-40.
42. **Griffin, S., S. G. Wyllie, and J. Markham.** 1999. Determination of octanol-water partition coefficient for terpenoids using reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* **864**:221-228.
43. **Kubinyui, H.** 1979. Lipophilicity and drug activity. *Prog. Drug. Res.* **23**:97-198.
44. **Nakashima, M., T. Uematsu, T. Oguma, T. Yoshida, K. Mizojiri, S. Matsuno, and S.**

- Yamamoto.** 1992. Phase I clinical studies of S-1108: safety and pharmacokinetics in a multiple-administration study with special emphasis on the influence on carnitine body stores. *Antimicrob Agents Chemother* **36**:762-768.
45. **Totsuka, K., K. Shimizu, M. Konishi, and S. Yamamoto.** 1992. Metabolism of S-1108, a new oral cephem antibiotic, and metabolic profiles of its metabolites in humans. *Antimicrob Agents Chemother* **36**:757-761.
46. **Ford, C. W., J. C. Hamel, D. M. Wilson, J. K. Moerman, D. Stapert, R. J. Yancey, Jr., D. K. Hutchinson, M. R. Barbachyn, and S. J. Brickner.** 1996. *In vivo* activities of U-100592 and U-100766, novel oxazolidinone antimicrobial agents, against experimental bacterial infections. *Antimicrob Agents Chemother* **40**:1508-1513.
47. **Matsuda, H., K. Hori, Y. Kobayashi, T. Kikuyama, and H. Miwa.** 1992. *In vivo* antibacterial activity of vancomycin. *Chemotherapy (Tokyo)* **40**:451-458. (In Japanese with English abstract.)
48. **Ikeda, F., Y. Wakai, S. Matsumoto, K. Maki, E. Watabe, S. Tawara, T. Goto, Y. Watanabe, F. Matsumoto, and S. Kuwahara.** 2000. Efficacy of FK463, a new lipopeptide antifungal agent, in mouse models of disseminated candidiasis and aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:614-618.
49. **He, X., M. Sugawara, Y. Takekuma, and K. Miyazaki.** 2004. Absorption of ester prodrugs in Caco-2 and rat intestine models. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:2604-2609.
50. **Biganzoli, E., L. A. Cavenaghi, R. Rossi, M. C. Brunati, and M. L. Nolli.** 1999. Use of a Caco-2 cell culture model for the characterization of intestinal absorption of antibiotics. *Farmaco* **54**:594-599.



51. **Saitoh, R., K. Sugano, N. Takata, T. Tachibana, A. Higashida, Y. Nabuchi, and Y. Aso.** 2004. Correction of permeability with pore radius of tight junctions in Caco-2 monolayers improves the prediction of the dose fraction of hydrophilic drugs absorbed by humans. *Pharm Res* **21**:749-755.
52. **Wafik Gouda, M.** 1993. Effect of an antidiarrhoeal mixture on the bioavailability of tetracycline. *Int. J. Pharm.* **89**:75-77.

## 謝辞

本研究をご指導頂いただき、研究に対する態度、科学に関する考え方をご教授して頂きました。東京大学大学院薬学系研究科 関水と久教授に感謝いたします。また、未熟な私の研究を導いて下さいました東京大学大学院薬学系研究科 黒川健児講師に厚く御礼申し上げます。

本研究について共同研究者として議論していただきました、東京大学大学院薬学系研究科 楠原洋之助教授、東京大学大学院薬学系研究科 三田智文助教授、東京大学大学院薬学系研究科 垣内力助手、塩野義製薬株式会社 村上和久博士に深く感謝いたします。また、本論文の共同研究者の嘉村格士郎氏、Iony Manitra Razanajatovo 博士に感謝いたします。本研究を、支えていただきました研究員の鯉沼京子さん、萱野寛美さん、石渡繁雄さん、及び、カイコ幼虫の研究を支えて頂いた共同研究者の春日寛司君、成島和哉君、外池亜紀子さん、研究員の小牧宏美さん、斉藤こずえさん、早坂香織さんに感謝いたします。本研究について議論していただいた発生細胞化学教室の教室員の皆様に感謝いたします。

最後に、私が研究者になるのを暖かく応援し、経済的、精神的に支えてくれた、私の家族に深く感謝いたします。

浜本 洋