

# 学位論文

## Doctor's Thesis

論文題名：内因性窒素酸化物パーオキシナイトライトの殺菌作用と変異原性に関する研究

(Study on bactericidal activity and mutagenicity of peroxy nitrite, an endogenously formed derivative of nitric oxide)

著者名 : 桑原 英雄  
Hideo Kuwahara

指導教官名 : 微生物学前教授 前田 浩

紹介教官名 : 感染防御学教授 原田 信志

審査委員名 : 分子遺伝学教授 森 正敬

細胞病理学教授 竹屋 元祐

病態情報解析学教授 岡部 紘明

細胞複製学教授 小椋 光

2004年度

## 要旨

感染・炎症の局所において、一酸化窒素(NO)とスーパーオキシド( $O_2^-$ )の産生が共に亢進し、両者は速やかに反応し、より化学反応性の高いパーオキシナイトライト( $ONOO^-$ ; 過酸化亜硝酸イオン)となる。 $ONOO^-$ は強力な酸化およびニトロ化剤であり、哺乳類細胞に対する細胞毒性と同様に殺菌作用を示す。熊本大学微生物学講座においては、ネズミチフス菌感染マウスの感染局所に同時に産生されるNOと $O_2^-$ が、 $ONOO^-$ の生成となり、それが生体防衛的に作用することをすでに報告している。

本研究は、細菌、特に *Helicobacter pylori* に対する  $ONOO^-$  の殺菌作用およびその変異原性を明らかにする目的のために検討した。予備実験として、各種細菌に対する  $ONOO^-$  の殺菌作用を調べるために、その濃度を一定にする Constant flux 法を使用して *in vitro* で定量した。今回の実験結果は、グラム陰性菌の方が陽性菌より  $ONOO^-$  の殺菌作用に対する感受性が強かった。*H. pylori* は  $ONOO^-$  の殺菌作用に高い感受性を示した。

*H. pylori* 感染の特徴の 1 つは、活動性炎症を長期間、持続的に引き起こすその慢性化にある。殺菌作用を持った  $ONOO^-$  やそれ以外の反応性ニトロ分子種( $^{\cdot}NO_2$ ,  $NO_2^-$  など)の産生にもかかわらず、*H. pylori* が持続的に感染できるメカニズムは十分に解明されていない。そこでまず、*H. pylori* コロニー形成に必須といわれている *H. pylori* ウレアーゼの役割について Constant flux 法を用いて検討した。 $ONOO^-$  による *H. pylori* の殺菌やニトロクロシンの形成は尿素の添加によって抑制された。このことは、*H. pylori* ウレアーゼは  $CO_2$  の産生を経由して、 $ONOO^-$  の細胞毒性に対する抑制の役割を演じており、このことが生体内で持続的な感染に寄与していることが示唆された。

次に、 $ONOO^-$  が *H. pylori* に対して変異原性を示すかどうかをクラリスロマイシン(CLR)に対する薬剤耐性を指標として検討した。生理的濃度の  $ONOO^-$  を *H. pylori* に暴露させると、 $ONOO^-$  非存在下の獲得に比べて、CLR 耐性変異菌株の出現は顕著な増加を示した。CLR 耐性 18 菌株について、DNA シークエンス解析を実施し DNA の変異部位の同定を行った。リン酸緩衝食塩液のみの対照群の *H. pylori* (自然変異群)は、A2142G (2 菌株)と A2143G (2 菌株)変異が見られた。これに対して、生理的濃度(1.0  $\mu M$ )の  $ONOO^-$  で処理した場合は、A2142G(7 菌株)、A2143G (4 菌株)は顕著であったが、さらに A2142T (1 菌株)、C2695G (2 菌株)、A2142G の変異に加えて 2604 部位に G の挿入のある 5 群がより高頻度に認められた。以上のことは、生体内において感染によりもたらされる炎

症反応は、その感染細菌を除去するために有効に作用する反面、強力な変異原となり、薬剤耐性の誘導あるいは生存と適応のための他の機能を備えた細菌を誘導することがわかった。

最後に、Ames テストの変法を用いて ONOO<sup>-</sup>の変異原性を直接的に検討した。Constant flux 法を用いた場合、*Salmonella typhimurium* TA 102 は 4~8 μM の範囲内で著明な変異の増加が見られた。ONOO<sup>-</sup>を 20 分間反応させたところ、その濃度に依存して変異頻度は増加し、8 μM ONOO<sup>-</sup>では総生存菌数の 21%が変異菌となっていた。

上記サルモネラ菌を用いて、ONOO<sup>-</sup>を変異原として、各種合成および天然由来の化合物の変異抑制試験を行った。そのうちアミノ酸では、チオール化合物(システイン)およびメチルチオール化合物(メチオニン)は、ONOO<sup>-</sup>の変異原性に対して、100 μM で 65~50%まで抑制が認められた。一方、フラボノイド、ビタミン類および合成由来の種々の抗酸化物質も抗変異原性を示し、α-トコフェロールは 100 μM で 50%、エブセレンは約 5 μM で 50%抑制した。さらに、若松らが新規に見出したナタネ油中の抗酸化成分 4-ビニル-2,6 ジメトキシフェノール(キャノロール)は 8 μM で約 20%まで抑制した。実験に用いた物質の中で、キャノロールは最も強い変異抑制作用を示し、医薬品であるエブセレンと同等以上の活性を有することがわかった。今回、食品中の各種抗酸化活性成分のうち、ナタネ油中のキャノロールおよび植物食品(そば)中のルチンなどは、ONOO<sup>-</sup>による変異に対して特に強い抗変異原性活性を有することを見いだした。

## Abstract

At the site of infection and inflammation, both production of nitric oxide (NO) and superoxide ( $O_2^-$ ) is highly accelerated. Both of them react rapidly with each other to form peroxynitrite ( $ONOO^-$ ).  $ONOO^-$  has a very potent chemical reactivity. It is also a very strong oxidant as well as nitrating agent, and exhibits potent bactericidal activity and cytotoxicity for mammalian cells. In our laboratory, it was reported that both NO and  $O_2^-$  are critically involved in antimicrobial defense in murine salmonellosis (*Salmonella typhimurium* infection), possibly through the formation of  $ONOO^-$ .

In this study, we investigated bactericidal activity and mutagenicity of  $ONOO^-$  against bacteria, especially, *Helicobacter pylori*. In a preliminary examination, bactericidal activity of  $ONOO^-$  were quantified by using the constant-flux method against various bacterial strains *in vitro*. The constant-flux method is a device to maintain a constant concentration of  $ONOO^-$  by infusion of  $ONOO^-$  solution at constant rate into the reaction vessels. Otherwise, spontaneous decomposition of  $ONOO^-$  results in no steady state concentration with spontaneous decomposition rate of a few seconds. Among bacteria used in this examination, gram negative bacteria were highly sensitive against bactericidal activity of  $ONOO^-$  when compared with gram positive bacteria. Among them, *Helicobacter pylori* showed high susceptibility to  $ONOO^-$ .

A unique feature of *H. pylori* infection is its chronic infection, and chronic active inflammation. The mechanism of the chronic infection of *H. pylori* is not clear in stead of production of highly bactericidal  $ONOO^-$  and other oxygen and reactive nitrogen species. By using constant-flux method, therefore, we first examined the effect of urease on *H. pylori*, which is reported to be the essential factor for colonization.  $ONOO^-$ -induced bactericidal activity and formation of nitrotyrosine were suppressed in the presence of urea. This indicates that urease of *H. pylori* plays an important role against the toxicity of  $ONOO^-$  via production of  $CO_2$ , and it may confer the capacity for the sustained infection *in vivo*. The protective mechanism of  $CO_2$  against bactericidal action was attributed to the enhanced reactivity of  $ONOO^-$  carbonate complex. This complex facilitates the reaction to any components in the medium, cell wall/membrane,

proteins or lipids, before reaching the vital substances or nucleic acids in the intracellular location.

We studied whether generation of drug-resistant mutants of *Helicobacter pylori* is facilitated in the presence of ONOO<sup>-</sup> using clarithromycin (CLR) as a model. Treatment of *H.pylori* strains with physiological levels (1.0 μM) of ONOO<sup>-</sup> showed a significant increase in the occurrence of CLR-resistant mutant strains in comparison with control, phosphate-buffered saline (PBS) without ONOO<sup>-</sup>. DNA sequence analyses were performed to identify the mutation sites in the 18 CLR-resistant mutant strains being isolated this time. When *H. pylori* strains were treated with PBS alone without ONOO<sup>-</sup>, only two mutations, A2142G (2 strains) and A2143G (2 strains), were found. However, treatment with ONOO<sup>-</sup> resulted differently: the mutations A2142G (7 strains) and A2143G (4 strains), as well as A2142T (1 strain) and C2695G (2 strains) were noted. In addition, insertion of G at 2604 together with A2142G mutation was observed in one mutant strain.

Inflammatory response will generate reactive free radicals in vivo, which will be beneficial for eliminating infecting microbes. However, it is shown here that such reactive endogenous chemicals will induce a higher incidence of mutant bacteria, either drug resistant or with other functions for survival and adaptation, as these pathogens take advantage of mutant formation generated as free radicals induced thereby.

Finally, we examined mutagenicity of ONOO<sup>-</sup> with modified Ames test. In the constant flux system of 4 to 8 μM ONOO<sup>-</sup>, a level equivalent to that found in pathological states in vivo, yielded a substantial mutation frequency against *Salmonella* TA 102 strain. Treatment of TA102 bacteria with 8 μM ONOO<sup>-</sup> for 20 min resulted in a mutation frequency of 21% among surviving bacteria, and the mutation frequency increased dose dependent manner. Among various amino acids and aromatic compounds tested for suppression of mutation, we found that thiol compound (cysteine) and methylthiol compound (methionine) had a suppressive effect against ONOO<sup>-</sup>-induced mutation. Antioxidative flavonoids (eg. rutin) and vitamins (α-tocopherol) also showed antimutagenic activity at 100 μM. Among various antioxidative substances of natural or synthetic origin, canolol was one of the most

potent antimutagenic compound at 8  $\mu\text{M}$ . Canolol was a newly found antioxidative component in canola oil, and its antimutagenic potency was higher than or equivalent to that of ebselen, one of the most potent ONOO<sup>-</sup> scavengers known.

## 発表論文一覧

1. **Kuwahara, H.**, Miyamoto, Y., Akaike, T., Kubota, T., Sawa, T., Okamoto, S., and Maeda, H. *Helicobacter pylori* urease suppresses bactericidal activity of peroxynitrite via carbon dioxide production. *Infect. Immun.* (2000), 68, 4378-4383.
2. **Kuwahara, H.**, Kanazawa, A., Wakamatu, D., Morimura, S., Kida, K., Akaike, and T., Maeda, H.  
Antioxidative and antimutagenic activities of 4-vinyl-2,6-dimethoxyphenol (canolol) isolated from canola oil. *J Agric Food Chem.* (2004), 52, 4380-4387.
3. **Kuwahara, H.**, Akaike, T., Akuta, T., Yoshitake, J., and Maeda, H.  
Excessive generation of drug resistant mutants of *Helicobacter pylori* in the presence of peroxynitrite, an endogenously formed derivative of nitric oxide. *Antimicrob. Agents Chemoth.* in preparation (2004)
4. Miyamoto, Y., Akaike, T., **Kuwahara, H.**, Kubota, T., Yoshimatsu, S., Sawa, T., Okamoto, S., and Maeda, H.  
Urease functions as a defense system of *Helicobacter pylori* against peroxynitrite through the production of carbon dioxide. *In The Biology of Nitric Oxide. Part 7 (Proceedings of the 6th International Meeting on the Biology of Nitric Oxide)* (eds. S. Moncada, L. Gustafsson, P. Wiklund and E.A. Higgs) Portland Press Ltd., London, p. 30 (2000)

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始、ご指導、ご鞭撻を賜りました熊本大学大学院医学研究科微生物学講座 前田 浩 前教授、ならびに紹介教授としてご指導賜りました熊本大学大学院医学研究科感染防御学講座 原田 信志 教授に深甚なる感謝の意を表します。

一連の研究において、貴重なご教示、ご指導を賜りました熊本大学大学院医学研究科微生物学講座 赤池 孝章 助教授に深く感謝の意を表します。また、本研究にご支援、ご助言を賜りました同微生物学講座 芥 照夫 助手、田村 文雄 助手、宮本 洋一 前助手および澤 智裕 前助手に心より感謝いたします。さらに、本研究を行うにあたりご支援、ご協力を頂きました同微生物学講座研究室の諸氏に深謝致します。



## 目次

要旨 (和文)	1
要旨 (英文)	3
発表論文一覧	6
謝辞	7
目次	8
略語一覧	11
第1章 研究の背景と目的	12
第2章 材料と実験方法	
2.1 試薬	16
2.2 ONOO <sup>-</sup> の合成と精製	17
2.3 細菌	
2.3.1 <i>Helicobacter pylori</i> の生化学的特性	17
2.3.2 <i>Helicobacter pylori</i> の培養法と CFU 測定	18
2.3.3 Ames テスト用 <i>Salmonella typhimurium</i> TA 株とその特性	18
2.4 Constant flux 法による細菌と ONOO <sup>-</sup> の反応	20
2.5 ONOO <sup>-</sup> の殺菌作用に対する尿素、NaHCO <sub>3</sub> および NH <sub>3</sub> の効果	21
2.6 ONOO <sup>-</sup> 処理による <i>H. pylori</i> チロシンのニトロ化と定量	21
2.7 ONOO <sup>-</sup> 処理によるクラリスロマイシン (CLR) 耐性菌の検出	22
2.8 CLR 耐性菌の MIC 測定	23
2.9 CLR 耐性菌の 23S RNA 遺伝子変異の検出	
2.9.1 DNA の抽出	23
2.9.2 PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) 法による解析	24
2.9.3 シークエンス解析	24
2.10 Ames テスト用菌株の検定	
2.10.1 アンピシリン (ABPC) 耐性試験	25

2.10.2	<i>rfa</i> (細胞壁の deep rough な性質)の検定	2 5
2.10.3	標準変異原物質による検出感度チェック	2 5
2.11	Ames テストの変法: S9-mix を使用しない Ames テスト	
2.11.1	ワンショットバッチ法	2 6
2.11.2	ツーショットバッチ法	2 6
2.12	一定濃度の ONOO <sup>-</sup> 処理における Ames テストの変法	2 7
2.13	ONOO <sup>-</sup> を変異原とした変異抑制試験	2 8

### 第3章 結果

3.1	ONOO <sup>-</sup> の分光特性	2 9
3.2	反応液中の pH の影響	3 0
3.3	<i>Helicobacter pylori</i> の増殖曲線	3 1
3.4	Constant flux 法による反応液中の ONOO <sup>-</sup> の定量	
3.4.1	分光光度計による測定	3 2
3.4.2	Dihydrorhodamine 123 (DHR) 酸化法による反応液中の ONOO <sup>-</sup> 濃度測定	3 3
3.5	各種細菌に対する ONOO <sup>-</sup> の殺菌作用	3 4
3.6	<i>H. pylori</i> に対する ONOO <sup>-</sup> の殺菌作用	3 5
3.7	ONOO <sup>-</sup> の殺菌作用に対する尿素の影響	3 6
3.8	<i>H. pylori</i> HPK5 とそのウレア-ゼ欠損変異株 HPT209 株における ONOO <sup>-</sup> の殺菌作用に対する尿素の影響	3 7
3.9	ONOO <sup>-</sup> の殺菌作用に対する NaHCO <sub>3</sub> および NH <sub>3</sub> の影響	3 8
3.10	ONOO <sup>-</sup> の殺菌作用に対するウレアーゼ阻害剤の影響	3 9
3.11	反応液中の pH の確認	4 1
3.12	ONOO <sup>-</sup> による <i>H. pylori</i> 菌体チロシンのニトロ化	4 1
3.13	ONOO <sup>-</sup> 処理による CLR 耐性菌の検出頻度	4 3
3.14	CLR 耐性菌の MIC 値	4 5
3.15	CLR 耐性菌の遺伝子解析	
3.15.1	PCR-RFLP 法による CLR 耐性菌の解析	4 5
3.15.2	シーケンスによる CLR 耐性菌の解析	4 6

3.16	Ames テスト用菌株の検定	
3.16.1	アンピシリン(ABPC)耐性試験	4 7
3.16.2	<i>rfa</i> の検定	4 8
3.16.3	標準変異原性物質による検出感度チェック	4 8
3.17	S9-mix を使用しない Ames テストの変法による変異原性の評価	
3.17.1	ワンショットバッチ法	4 9
3.17.2	ツーショットバッチ法	5 0
3.18	ONOO <sup>-</sup> の一定濃度存在(Constant flux)下で引き起こされる 復帰コロニー数と変異頻度(洗浄菌と非洗浄菌との比較)	5 1
3.19	ONOO <sup>-</sup> を変異原とした変異抑制試験	
3.19.1	ONOO <sup>-</sup> の変異原性に対する尿酸とエブセレンの変異抑制効果	5 3
3.19.2	ONOO <sup>-</sup> の変異原性に対する各種アミノ酸の変異抑制効果	5 4
3.19.3	ONOO <sup>-</sup> の変異原性に対する各種ポリフェノールおよび ビタミン類の変異抑制効果	5 5
3.19.4	ONOO <sup>-</sup> の変異原性に対するキャノロールおよびその他の物質の 変異抑制効果	5 6
第4章	考察	5 7
第5章	結語	6 2
	参考文献	6 4

## 略語一覽

AHX	acetohydroxamic acid
ATCC	American Type Culture Collection
Canolol	4-vinyl-2, 6-dimethoxyphenol
CFU	colony forming unit
DHR	dihydrorhodamine 123
DMSO	dimethylsulfoxide
FCS	fetal calf serum
Fluorofamide	<i>N</i> -(diaminophosphinyl)-4-fluorobenzamide
HPLC	high-performance liquid chromatography
iNOS	inducible nitric oxide synthase
LOO <sup>·</sup>	lipid peroxy radical
MIC	minimal inhibitory concentration
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standard
NO	nitric oxide
ONOO <sup>-</sup>	peroxynitrite
O <sub>2</sub> <sup>-·</sup>	superoxide anion radical
PBS	phosphate-buffered saline
P-NONOOate	1-hydroxy-2-oxo-3-( <i>N</i> -methyl-3-aminopropyl)-3-methyl-1-triazine
PCR	polymerase chain reaction
RNS	reactive nitrogen species
ROS	reactive oxygen species
RPLF	restriction fragment length polymorphism
SOD	superoxide dismutase
TA98	<i>Salmonella typhimurium</i> TA 98
TA100	<i>Salmonella typhimurium</i> TA 100
TA102	<i>Salmonella typhimurium</i> TA 102
TE buffer	tris EDTA buffer

## 第1章 研究の背景と目的

一酸化窒素(NO)は、生体内で産生される単純な無機ラジカル分子の1つである。このNOは生体内で、NO合成酵素(NOS)により、L-アルギニンから合成される。NOは多種多様な微生物において産生され、感染防御上重要な役割を演じていることが知られている(Hibbs et al., 1988; Doi et al., 1993; Fang, 1997; Nathan, 1997; Akaike et al., 1998)。しかし、NO自身には明らかな殺菌作用は認められない(Yoshida et al., 1993; Kaplan et al., 1996; Miyamoto et al., 2000; Kuwahara et al., 2000)。一方、スーパーオキシド( $O_2^-$ )は主に好中球やマクロファージが微生物と接触した際に、急激な酸素消費を伴ってNADPHオキシダーゼにより産生される。もう1つのスーパーオキシドの発生源としてキサンチンオキシダーゼが知られている(Akaike et al., 1990)。

微生物感染局所において、NOとスーパーオキシドの産生が共に同時に亢進し、そのNOと $O_2^-$ は速やかに反応し、化学反応性の高いパーオキシナイトライト( $ONOO^-$ ; 過酸化亜硝酸イオン)となる(Beckman et al., 1990)。 $ONOO^-$ は強力な酸化およびニトロ化剤であり(Beckman, 1996; Ischiropoulos, 1998)、哺乳類細胞に対する細胞毒性(Beckman et al., 1990; Beckman, 1996)と同様に、殺菌作用を示す(Zhu et al., 1992; Hurst et al., 1997)。微生物学研究室においても、感染部位に同時に産生されるNOと $O_2^-$ が、 $ONOO^-$ の産生を経てネズミチフス菌感染マウスで生態防御的に作用することを報告している(Umezawa et al., 1997)。

そこでまず予備実験として、各種細菌に対する $ONOO^-$ の殺菌作用を*in vitro*で定量することにした。

*Helicobacter pylori*はヒトの胃粘膜に慢性的に感染し、胃炎、胃潰瘍、十二指腸潰瘍の原因となり、さらには胃ガンのリスクを増大することが知られている(Marshall et al., 1984; Blaser, 1990; Nomura et al., 1991; Asaka et al., 1997; Honda et al., 1997; Sugiyama et al., 1998; Watanabe et al., 1998)。*H. pylori*感染の特徴の1つは、胃粘膜中の好中球や単球の浸潤を伴う活動性炎症を長期間引き起こすその持続性にある(Nielsen et al., 1992; Dixon, 1994)。誘導型NO合成酵素(iNOS)(Mannick et al., 1996; Hahm et al., 1997; Pignatelli et al., 1998; Goto et al., 1999)の発現の増加とニトロチロシンの産生の増加(Mannick et al., 1996;

Goto et al., 1999)が、*H. pylori* 感染症患者の胃粘膜に観察されている。しかしながら、*H. pylori* が持続的に感染できるメカニズムは、殺菌作用を持った ONOO<sup>-</sup>やそれ以外の反応性ニトロ分子種(RNS)の産生にもかかわらず完全に解明されていない。

細菌の生存と病原性に関して、*H. pylori*が産生するウレアーゼの役割が指摘されている(Marshall et al., 1990; Makristathis et al., 1998; Nakamura et al., 1998)。ウレアーゼは尿素を加水分解し、二酸化炭素(CO<sub>2</sub>)とアンモニア(NH<sub>3</sub>)を生成する。*H. pylori* 感染症におけるウレアーゼの機能は、産生された NH<sub>3</sub>によって、胃酸を中和するためであると報告されている(Marshall et al., 1990)。NH<sub>3</sub>の過剰な産生は、モノクロアミンのような生体細胞へ毒性を示す NH<sub>3</sub> 由来の産物の産生を促進するかも知れない(Suzuki et al., 1992)。運動性の増進(Nakamura et al., 1998)と食細胞による細菌のクリアランスの抑制(Makristathis et al., 1998)も、ウレアーゼの機能として報告されている。ウレアーゼの病原性はその酵素反応によって産生される NH<sub>3</sub>に主に起因すると言われている。これに対して、同じ過程で産生される CO<sub>2</sub>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>の役割については、ほとんど記載がない。

ONOO<sup>-</sup>の化学的反応性は CO<sub>2</sub>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>によって調整されているという注目すべきレポートがある(Yermilov et al., 1996; Zhang et al., 1997)。特に ONOO<sup>-</sup>は CO<sub>2</sub>と直ちに反応し ONOOCO<sub>2</sub><sup>-</sup>を形成する。この ONOOCO<sub>2</sub><sup>-</sup>は ONOO<sup>-</sup>を NO<sub>3</sub><sup>-</sup>への分解を促進するばかりではなく(Lymar et al., 1995; Uppu et al., 1996)、ONOO<sup>-</sup>のニトロ化作用は増大させるが、しかしながら、酸化作用は著しく減弱させる(Yermilov et al., 1996; Zhang et al., 1997)。すなわち、CO<sub>2</sub>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>はチロシンやグアニンなどの ONOO<sup>-</sup>によるニトロ化を促進するが、その酸化作用は抑制する(Yermilov et al., 1996; Zhang et al., 1997; Lemercier et al., 1997)。さらに、*in vitro*において、*Escherichia coli* に対して ONOO<sup>-</sup>の殺菌作用は、NaHCO<sub>3</sub>を添加することによって抑制される(Zhu et al., 1992; Hurst et al., 1997)。

このような背景から、第1の研究目的は、*H. pylori*の持続的なコロニー形成におけるウレアーゼの役割を明確にし、とくに *in vitro*において、ONOO<sup>-</sup>の殺菌作用に対するウレアーゼ由来の CO<sub>2</sub>の保護的効果を検討することである。

本研究室において、インフルエンザウイルス感染マウスモデルで変異頻度が増大することを証明している(Akaike et al., 1996; Akaike et al., 2000; Yoshitake et al., 2004)。感染後 10-14 日の期間のマウスでは、健常マウスにおける変異ウイルスの発生

率は、NO 合成酵素欠損マウスに比較して 6-7 倍増加した。この変異は主として ONOO<sup>-</sup> によって引き起こされる (Akaike et al., 1996; Akaike et al., 2003; Yoshitake et al., 2004)。ONOO<sup>-</sup> はスーパーオキシドと NO 間の内因性反応物の 1 つであり、それは、感染部位の炎症細胞あるいは白血球によって産生され (Koppenol et al., 1996; Beckman, 2002)、核酸、蛋白質および脂質を直ちに酸化あるいは切断する機能をもつ強力な酸化物質である (Beckman, 1996; Ischiropoulos, 1998)。ONOO<sup>-</sup> はまた強力なニトロ化剤でもあり (Beckman, 2002; Sawa et al., 2003)、3-ニトロチロシンおよび 8-ニトログアノシンは 8-オキソグアノシンの形成を伴って同時に形成される (Akaike et al., 2000; Yoshitake et al., 2004)。さらに、酸素と NADPH が十分に供給されると、8-ニトログアノシンはチトクローム P450 NADPH 還元酵素、NO 合成酵素、あるいはチトクローム b5 還元酵素が存在することによりスーパーオキシド発生の触媒となることを報告している (Akaike et al., 1996; Maeda et al., 1999; Sawa et al., 2000)。しかしながら、ONOO<sup>-</sup> が細菌遺伝子に及ぼす影響については未だ十分に明らかにされていない。

このようなことから、第 2 の研究目的は、細菌、特に酸化ストレスに弱い *H. pylori* に対して、ONOO<sup>-</sup> が変異を促進するかどうかを検討することである。変異の指標は、現在 *H. pylori* 感染の除菌のために使用されている薬剤の 1 つであるクラリスロマイシン (CLR) に対する薬剤耐性菌の出現を用いた。

生命現象はすべて基本的にはデオキシリボ核酸 (DNA) を介して営まれている。DNA は遺伝情報の伝達 (自己複製) と発現の 2 つの重要な機能を持ち、これらの機能は DNA の塩基の相補的な特異性と配列に深くかかわっている。外的因子によってもたらされたこの DNA の構造異常は、DNA の複製を介して塩基配列の乱れとなり、生物の形質を変えていく場合がある (突然変異)。DNA の塩基配列の乱れには、種々のものが知られているが、その代表的なものとして塩基対置換型およびフレームシフト型がある。

化学物質の変異原性を検出する方法として、微生物 (主に細菌) を用いる試験法がある。微生物を用いる変異原性試験法の利点としては、DNA の構造や機能あるいは突然変異誘発機構が微生物においても高等動物においても基本的には共通であると推定されること、微生物は高等動物に比べて扱いが簡単であること、短時間に多くの検体を検査できること、その経費が安価であることなど挙げられる。この方法には一般に微生物の栄養要求性変異株の復帰突然変異が用いられる。使用菌株として最も適している

とされているのは、分子遺伝学的な検討が進んでいて、検査が迅速簡便で再現性に優れており、多くの化学物質について検定がなされているネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) および大腸菌 (*Escherichia coli*) である。

ネズミチフス菌を用いる試験は、B. N. Ames 博士によって開発された変異原性試験法で、Ames テスト (Ames et al., 1975) と呼ばれている。これは、ヒスチジン要求性のネズミチフス菌の変異株が用いられ、His<sup>-</sup> (ヒスチジン要求性) から His<sup>+</sup> (ヒスチジン非要求性) への復帰突然変異を指標として、物質の変異原性の評価を行うものである。

そこで、第3の研究目的は、この Ames テスト (Maron DM and Ames BN 1983) を適用し、ONOO<sup>-</sup> の変異原性を直接的に検討することである。さらに、ONOO<sup>-</sup> が変異原性を有すればそれを変異原として、合成あるいは天然由来の各種物質について、変異抑制作用の強い物質を検索することである。



## 第2章 材料と実験方法

### 2.1 試薬

NO 放出試薬である  $\text{CH}_3\text{N}[\text{N}(\text{O})\text{NO}]-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2+\text{CH}_3$ , 1-hydroxy-2-oxo-3-(*N*-methyl-3-aminopropyl)-3-methyl-1-triazine (P-NONOate)は同仁化学研究所より購入した。尿素、 $\text{NaHCO}_3$ 、 $\text{NH}_4\text{OH}$ 、アミノ酸類、タウリン、ルチン、プロトカテキン酸、カフェイン、アスコルビン酸、 $\alpha$ -トコフェロール、 $\beta$ -カロテン、シナピン酸、尿酸およびエブセレンは和光純薬株式会社よりそれぞれ入手した。ウレアーゼ、3-ニトロ-L-チロシン(ニトロチロシン)およびL-チロシンはSigma社(Louis, MO)、ウレアーゼインヒビターである *N*-(diaminophosphinyl)-4-fluorobenzamide (fluorofamide)はICN Biomedicals社(Aurora, OH)から、acetohydroxamic acid (AHX)はナカライテスク株式会社からそれぞれ購入した。PronaseはCalbiochem-Novobiochem社(LaJolla, CA)から、デヒドロローダミン123はMolecular Probe社(Eugene, OR)より購入した。普通ブイヨンおよびアガロースはDifco社(Detroit, MI)、ソフトアガー用のアガロースは伊那食品工業株式会社、ブルセラブロスはBecton Dickinson社(Sparks, MD)、ハートインフージョン寒天培地は日水製薬株式会社、最少グルコース寒天平板培地はオリエンタル酵母株式会社よりそれぞれ入手した。DNA抽出用のEasy-DNA kitはInvitrogen社から、PCR産物精製用QIAquick kitはQIAGEN社(Hilden, Germany)から、シーケンス解析用ABI PRISM 310キットはApplied Biosystems社(Foster, Calif.)から、制限酵素である *Bsa*I および *Mbo*IIはNew England Biolabs社(Beverly, Mass)からそれぞれ入手した。また、合成キャノロールは昭和産業株式会社より分与していただいた。その他の試薬はすべて特級(分析グレード)のものを使用した。

## 2.2 ONOO<sup>-</sup>の合成と精製

パーオキシナイトライト(ONOO<sup>-</sup>)は図2-1に従って合成した。塩酸を含んだ過酸化水素水と亜硝酸ナトリウム液をシリンジポンプによって、10 ml/分の割合で反応させた。その反応液に水酸化ナトリウム液を同様に24 ml/分の流速で添加し、新しいコルベンに回収した。未反応の過酸化水素は二酸化マンガンを加えて、それを分解・除去した(Koppenol et al., 1996)。ONOO<sup>-</sup>を含む溶液は-10°Cで1夜放置し、未凍結のONOO<sup>-</sup>画分である上清の黄色い液体を回収した。この液を使用時まで-80°Cで保存した。そのpHは11.0以上であり、ONOO<sup>-</sup>は安定に保存された。

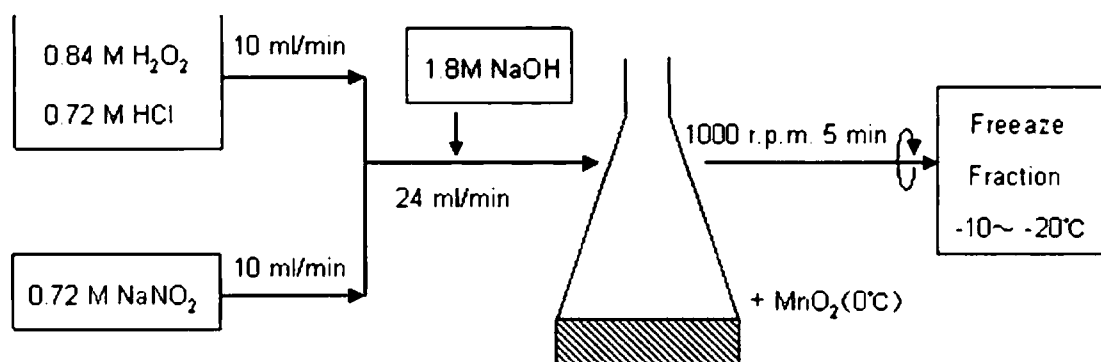


図2-1. Peroxynitriteの合成および精製法

## 2.3 細菌

### 2.3.1 *Helicobacter pylori*の生化学的特性

*Helicobacter pylori*はらせん状のグラム陰性桿菌で、*Campylobacter jejuni*よりもやや大きく、平板培養菌はU字形を呈することが多い。古い培養菌では球状となり、これは死菌のもつ形態学的な特徴という報告がある(Kusters et al., 1997)。菌体の極に数本の鞭毛を有し、活発に運動する。好気的環境では発育せず、湿度の高い微好気的環境(O<sub>2</sub>:5%、CO<sub>2</sub>:10%、N<sub>2</sub>:85%)でのみ発育する。培養には一般にブルセラブロス、またはブルセラ寒天に血清を5~10%の割合で加えた培地が用いられる。*H. pylori*の最も重要な性状はウレアーゼを産生する点である。病原因子としては、ウレアーゼによる尿素分解の結果生じたアンモニアによる細胞障害、好中球放出の活性酸素、モノクロラミンの生成、空胞化毒素(Vacuolating toxin)などがある。分子遺伝学的には、空胞化毒素遺伝子(vacA)、および関連遺伝子(cagA)、ウレアーゼ構造遺伝子(ureA, ureB)、

粘着因子遺伝子 (hpaA)、フラジェリン遺伝子 (flaA) などが明らかになっている (Fennell et al., 1984; Yahiro et al., 1997)。

### 2.3.2 *H. pylori* の培養法と CFU 測定

今回実験に使用した *H. pylori* ATCC 43504 は、American Type Culture Collection (Rockville, MD) から入手した。*H. pylori* HPK5 株とそのウレア-ゼ欠損変異株 HPT209 株は、山口大学医学部微生物学教室の中澤 晶子 教授より分与いただいた。液体培養の場合は、ブルセラブロス (Becton Dickinson & Co., Sparks, MD) に牛胎児血清 (FCS, Intergen Co., Purchase, NY) 5% の割で加え、細菌を接種後ガスパック法 (Becton Dickinson & Co.) により微好気的環境で 3 日間 1 Hz で振盪培養した。CFU 測定には、ブルセラブロスに寒天末を 1.5% になるように加え、さらに牛胎児血清 (5%) を添加した寒天平板培地を準備した。10 倍階段希釈した菌液を、平板培地に 0.1 ml 滴下し、寒天表面に細菌が均一になるように塗布した。接種した平板培地は、ガスパック法により微好気的環境で 5 日間培養した。*H. pylori* と同様に微好気性である *Campylobacter jejuni* は臨床材料から分離した。*Campylobacter jejuni* は液体培地の場合は 24 時間、平板培地の場合は 48 時間 *H. pylori* と同様の条件下で培養した。

### 2.3.3 Ames テスト用 *Salmonella typhimurium* TA 株とその特性

Ames テストで通常使用されている *Salmonella typhimurium* TA シリーズのうち、*Salmonella typhimurium* 98 (TA98)、*Salmonella typhimurium* TA100 (TA100)、および *Salmonella typhimurium* TA102 (TA102) を実験に用いた。これらの 3 菌株は、岡山大学薬学部 薬品化学教室 有元 佐賀恵 先生より分与していただいた。変異原性テストで使用する *Salmonella* 属の TA シリーズの菌株は、ヒスチジンを合成できないヒスチジン要求性の変異株である。*Salmonella typhimurium* におけるヒスチジンの生合成は、ホスホリボシルピロリン酸から始まる 10 段階の反応を経て行われる (図 2-2)。



対置換型の変異を起こした菌株である。

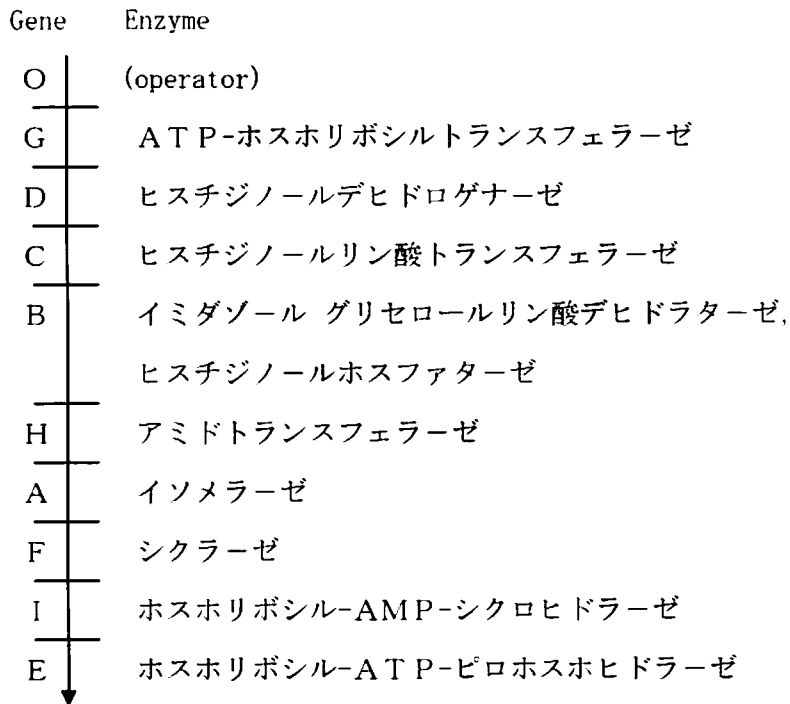


図2-3. *Salmonella typhimurium* のヒスチジンオペロン

(図2-3は変異原性試験法 編集 早津彦哉 より引用)

この TA100 株に変異原性物質が反応すると再度塩基対置換型の変異が起き、復帰変異によりヒスチジン非要求性となる。TA102 株は染色体上の *his G* 遺伝子を持っていない。その代わりプラスミドのヒスチジン *gene G* 428 CAA が TAA に変わったナンセンス変異を起こした株である。TA102 株はそのプラスミドを 30~40 持っているため、過酸化物質やアルデヒドにも感度が高いと言われている (Levin et al., 1982)。

#### 2.4 Constant flux 法による細菌と $\text{ONOO}^-$ の反応

細菌に対して、一定濃度でしかも中性 pH 付近で安定性に欠ける  $\text{ONOO}^-$  で処理するために Constant flux 法 (Castro et al., 1996; Okamoto et al., 1997) を使用した。この方法は、 $\text{ONOO}^-$  の注入と分解のバランスによって、 $\text{ONOO}^-$  の濃度を一定に保つ方法である (図2-4)。pH 7.6 の 0.5 M リン酸緩衝食塩液 (0.5 M PBS) に  $\text{ONOO}^-$  のアルカリ溶液 (20 mM NaOH) を持続注入し、反応液中の  $\text{ONOO}^-$  濃度を一定に保つとともに、しかも反応

液の pH の変化を最小になるようにした。細菌は、24 時間あるいは 48 時間培養した後、滅菌生理食塩水で 3 回洗浄し、0.5 M PBS に再浮遊させた。また、細菌浮遊液は使用時まで氷上で保った。 $10^6$  CFU/ml の細菌浮遊液 1080  $\mu$ l を 5 ml バイアルに入れ、シリンジポンプで ONOO<sup>-</sup> を含む 20 mM NaOH を 240  $\mu$ l/分の流速で注入した。細菌と ONOO<sup>-</sup> を均一に反応させるため、スターラーを用いて攪拌した。ONOO<sup>-</sup> を注入開始後、30 秒ごとに 120  $\mu$ l ずつ反応液を採取し、CFU を測定した。

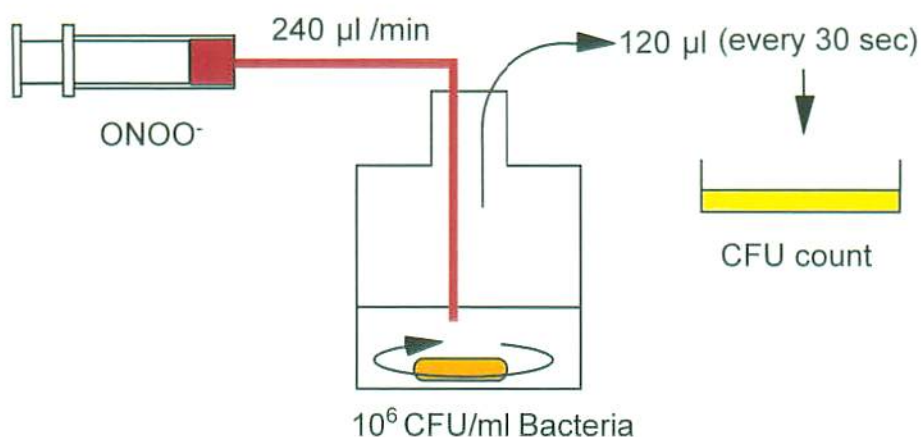


図 2-4. Constant flux 法による細菌と ONOO<sup>-</sup> の反応

## 2.5 ONOO<sup>-</sup> の殺菌作用に対する尿素、NaHCO<sub>3</sub> および NH<sub>3</sub> の効果

尿素、NaHCO<sub>3</sub>、あるいは NH<sub>4</sub>OH を最終濃度が各 10 mM、20 mM、20 mM になるように添加した *H. pylori* または *C. jejuni* の懸濁液(それぞれ  $1 \times 10^6$  cfu/ml)に、上記 Constant flux 系を用いて、ONOO<sup>-</sup> を 1.0  $\mu$ M に維持して反応させた。30 秒ごとに反応混合液から各 120  $\mu$ l を採り、直ちに生理食塩水で希釈し、5%牛胎児血清を含むブルセラ寒天平板 (Becton Dickinson 社, Sparks, MD) に接種した。これを微好気的環境で *H. pylori* は 5 日間、*C. jejuni* は 2 日間培養した後、形成されたコロニー数を計測した。

## 2.6 ONOO<sup>-</sup> 処理による *H. pylori* チロシンのニトロ化と定量

20 mM NaHCO<sub>3</sub>、あるいは 10 mM 尿素存在下あるいは非存在下で、*H. pylori* ( $10^8$  CFU/ml) を 3 分間持続的に 1  $\mu$ M ONOO<sup>-</sup> と反応させた。反応液を 3,000 rpm で遠心し、その沈査を 250  $\mu$ l の 10 mM リン酸緩衝食塩液、pH 7.4 に浮遊させた。さらに 60  $\mu$ g/ml プロナ

ーゼを添加し、50°Cで18時間消化した。プロナーゼ消化液を遠心フィルター (Millipore Co., Bedford, MA) でろ過し、得られたろ液について、電気化学検出器 (ECD) を連結した High Performance Liquid Chromatography (HPLC) を用いて解析した (Crow, 1997; Hahm et al., 1997)。HPLC の条件は次の通りである。カラム, TSK-gel, ODS-80Ts (4.6 × 250 mm; 東ソー, 東京); 移動相, 5%エタノールを含む 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.7); 流速, 0.8 ml/分; 検出電圧, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700 および 750 mV。菌体中の 3-ニトロ-L-チロシン (ニトロチロシン) およびチロシンは、それぞれの標品を用いて作成した標準曲線より同定・定量した。さらに、20 mM 亜ジチオン酸ナトリウム ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ) によりニトロチロシンがアミノチロシンへ還元されることによってニトロチロシンのピークが消失することを利用して、ニトロチロシンの特異的な検出を確認した。ニトロチロシンおよびチロシンはそれぞれ 750 および 600 mV で得られたピークの面積から定量した。

## 2.7 ONOO<sup>-</sup>処理によるクラリスロマイシン (CLR) 耐性菌の検出

*H. pylori* は 5% 血清加ブルセラ平板培地に塗抹し、微好気的環境下で 37°C、3 日間培養した。平板培地上のコロニーを 5% 血清加ブルセラブロス 20 ml に浮遊させ、同様に微好気的環境下で、37°C、3 日間 1 Hz で振盪培養した。培養液を生理食塩水で 3 回洗浄し、最終的に *H. pylori* は 0.5 M リン酸緩衝食塩液, pH 7.6 (0.5 M PBS) 2 ml (約  $10^9$  CFU/ml) に再浮遊させた。*H. pylori* の ONOO<sup>-</sup> 処理は、滅菌したバイアルに菌液を 900  $\mu$ l 採り、スターラーでよく混和し、ONOO<sup>-</sup> をマイクロシリンジポンプで、10  $\mu$ l/分の割合で 10 分間持続注入した。この反応液の一部を菌数測定に、残りを CLR 耐性菌検出にそれぞれ使用した。菌数測定は希釈した処理液を 5% 血清加ブルセラ平板培地に塗抹した。また、CLR 耐性菌検出は処理液を、5% 血清を含む 0.2  $\mu$ g/ml CLR 入りのブルセラ平板培地 10 枚に約 100  $\mu$ l ずつ塗抹した。コントロールとして 0.5 M PBS を用い同様の操作を行った。塗抹したすべての培地はジャーに入れ、微好気的環境で 37°C、1 週間培養し、ONOO<sup>-</sup> 処理液およびコントロールの菌数をコロニーカウンターを用いて定量した。ONOO<sup>-</sup> 処理液およびコントロールを塗布した 5% 血清を含む 0.2  $\mu$ g/ml CLR 入りブルセラ平板培地にコロニー (耐性菌) が出現するかどうかを観察した。発育したコロニーは寒天ごと切り取り、5% 血清を含む 0.2  $\mu$ g/ml CLR 入りブルセラブロスに浮遊さ

せ、そのボトルをジャーに入れ、微好気的環境で 37°C、3 日間 1 Hz で振盪培養した。そして、この CLR 耐性菌が *H. pylori* であることをウレアーゼ活性、運動性、グラム染色性および形態により確認した。

## 2.8 CLR 耐性菌の MIC 測定

実験で得られた CLR 耐性菌株、標準菌株および臨床分離株に対する CLR の MIC は、National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS、米国臨床検査標準化委員会)法を準拠とした寒天平板希釈法(Osato et al., 2001)によって求めた。つまり、CLR の濃度が 0, 0.013, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2, 6.4, 12.8, 25.6, および 51.2 µg/ml になるよう 5%血清入りブルセラ寒天培地に加え、平板培地を作成した。それぞれの CLR 濃度の平板培地に振盪培養した菌液を塗抹し、微好気的環境下で 37°C、1 週間培養し、菌の発育が阻止される CLR の最小濃度をその耐性菌の MIC(minimal inhibitory concentration, 最小発育阻止濃度)値とした。

## 2.9 CLR 耐性菌の 23S rRNA 遺伝子変異の検出

CLR 耐性菌の 23S rRNA 遺伝子変異の検出の方法は、Versalovic らの方法を一部改変して行った(Versalovic et al., 1997)。

### 2.9.1 DNA の抽出

菌懸濁液 2 ml を遠心(6000 rpm, 5 分間, 室温)し、Easy-DNA™キット(Invitrogen)を用いてゲノム DNA を抽出し、TE (Tris, EDTA)buffer に溶解し template DNA とした。すなわち、菌体に 350 µl の Solution A を添加した後、65°Cにて 10 分間加温した。さらに 150 µl の Solution B を加え、攪拌後 1 分間静置し、500 µl のクロロホルムを加えた。よく攪拌した後 1 分間静置し、遠心(14 K rpm, 15 分間, 4°C)した。上層の水溶液を別の新しいチューブに移し、これに 100%エタノールを 1 ml 加え、氷上で 30 分間静置し、遠心(14 K rpm, 15 分間, 4°C)によりゲノム DNA を沈殿させた。上清を捨てた後、1 ml の 80%エタノールで遠心洗浄(14 K rpm, 3 分間, 4°C)し風乾した。その後、TE buffer 100 µl を加え、さらに 2 mg/ml RNase 2 µl を加え 37°Cで 30 分間インキュベーションすることにより RNA を完全に分解した。この液を遠心(14 K rpm, 5 分間, 4°C)し、上清をゲノム DNA 溶液として 4°Cで保存した。



## 2.9.2 PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP 法)による解析

PCR 反応は、23S rRNA の domain V を増幅できるように設定した sense primer 5' -AGTCGGGTCCTAAGCCGAG-3' および antisense primer 5' -TTCCTGCTTAGATGCTTCAG-3' を用いた。DNA の増幅は 94°C で 3 分のプレインキュベーションの後、94°C 1 分、50°C 2 分、72°C 2 分を 40 サイクル行い、最後に 72°C 7 分を追加した。得られた PCR 産物 (1.4 K bp) をアガロースゲル電気泳動した後、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社) にて精製した。これを制限酵素 *Bsa*I (A2143G 変異を認識) または、*Mbo*II (A2142G 変異を認識) で処理した。*Bsa*I 処理サンプルは 50°C で、*Mbo*II 処理サンプルは 37°C でそれぞれ 14 時間反応させ、アガロースゲル電気泳動した後、エチジウムブロマイドで染色し切断パターンを比較した。

## 2.9.3 DNA のシーケンス解析

BigDye Terminator v1.1 Cycle sequencing Kit (Applied Biosystems 社) の方法に従ってダイレクトシーケンスを行った。プライマーは、PCR 反応に用いた sense primer および antisense primer に加え、内部配列プライマー 5' -ATGAGATGAGTATTCTAAGG-3' の 3 種を用い、ABI PRISM 310 (Applied Biosystems 社) を用いて配列解析をおこなった。反応液の調製は、Big Dye Terminator Ready Reaction Mix 8  $\mu$ l、Template 1  $\mu$ l、3.2 pM/ $\mu$ l primer 1  $\mu$ l に蒸留水 10  $\mu$ l を加え 20  $\mu$ l とした。サーマルサイクリングは、96°C 1 分間に続いて、96°C 10 秒間、50°C 5 秒間、60°C 4 分間を 25 サイクルおこなった。反応済みのサンプルは、未反応の蛍光色素を除去するために、エタノール/EDTA 精製をおこなった。具体的には、反応済み 20  $\mu$ l のサンプルに 125 mM EDTA 5  $\mu$ l、100% エタノール 60  $\mu$ l を加え、室温で 15 分間放置し、遠心 (15,000rpm, 20 分間) 後、上清をピペッティングにより除去した。ペレットに 70% エタノール 60  $\mu$ l を加え遠心 (15000rpm, 10min) し、上清をピペッティングにより除去した後、風乾した。これに Template Suppression Reagent (ABI 社) を 15  $\mu$ l 加え、95°C で 2 分間反応させた後、氷上におき DNA シーケンスに供した。

## 2.10 Ames テスト用菌株の検定

### 2.10.1 アンピシリン(ABPC)耐性試験

L字試験管に普通ブイヨン 5 ml 入れ、*Salmonella typhimurium* を 1 白金耳接種し、37°C で 20 時間振盪 (1 Hz) し、好氣的環境下で培養した。培養菌液を 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.4 で約  $10^3$  CFU/ml に調整し、その 0.1 ml をアンピシリン (400 µg/ml) を含むあるいは含まないソフトアガー 2.0 ml に加え、よく混和後、寒天平板培地に重層した。この平板培地を 37°C で 24 時間培養後、生じたコロニー数をカウントした。なお、アンピシリン (ABPC) の有無菌数が異なる場合は、ABPC 入りアガープレートに発育したコロニー (耐性菌) を釣菌し、再び ABPC 入り平板培地で発育させる操作をくり返した。

### 2.10.2 *rfa* (細胞壁の deep rough な性質) の検定

今回使用する 3 菌株は、比較的大きな分子も細菌の DNA に到達しやすいように、細菌表面構成成分であるリポ多糖体が欠失する変異 (*rfa*) を起こしている。そこでこの変異を確認するために、*rfa* の検定を実施した。この試験には ABPC 耐性プラスミドの欠損していない細菌を用いた。つまり、20 時間培養した菌液 0.1 ml をソフトアガー 2.0 ml に加え、よく混和し普通寒天平板培地に重層した。この平板培地にクリスタルバイオレット 1 mg/ml 溶液 10 µl を染み込ませた直径 7 mm の円形ろ紙を置き、37°C で 24 時間培養後、発育阻止円の直径を測定した。

### 2.10.3 標準変異原性物質による検出感度チェック

菌株によって使用する標準変異原性物質はいくつかの種類に限定されており、各々の変異原性の感受性に差がある (Maron DM and Ames BN, 1983)。そこで、TA 98 株の標準変異原性物質は 2-ニトロフルオレン、TA 100 株は N-エチル-N-ニトロ-N-ニトロソグアニジン、TA 102 株はマイトマイシン C をそれぞれ使用した。これらの標準変異原性物質は精製水あるいはジメチルスルホキシド (DMSO) を用いて所定の濃度に調整し、図 2-5 の要領で変異原性試験を実施した。すなわち、滅菌試験管に 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.4 を 0.5 ml を採り、それにそれぞれの濃度の標準変異原性物質 0.1 ml を加え、さらに 20 時間培養した菌液を 0.1 ml 加えて 37°C で振盪 (1 Hz) した。正確に 20 分間処理した後、この混合液にあらかじめ 48°C に保っていた

ソフトアガー2.0 ml (0.5 mM ヒスチジンと 0.5 mM ビオチンの等量混液を 10%の割で含む)を加え、よく混和後、最少グルコース寒天平板培地に注ぎ、一様に広げて固まらせた。平板培地をアルミホイルで遮光して 37°Cの孵卵器で 48 時間培養し、生じた復帰コロニー数をカウントした。

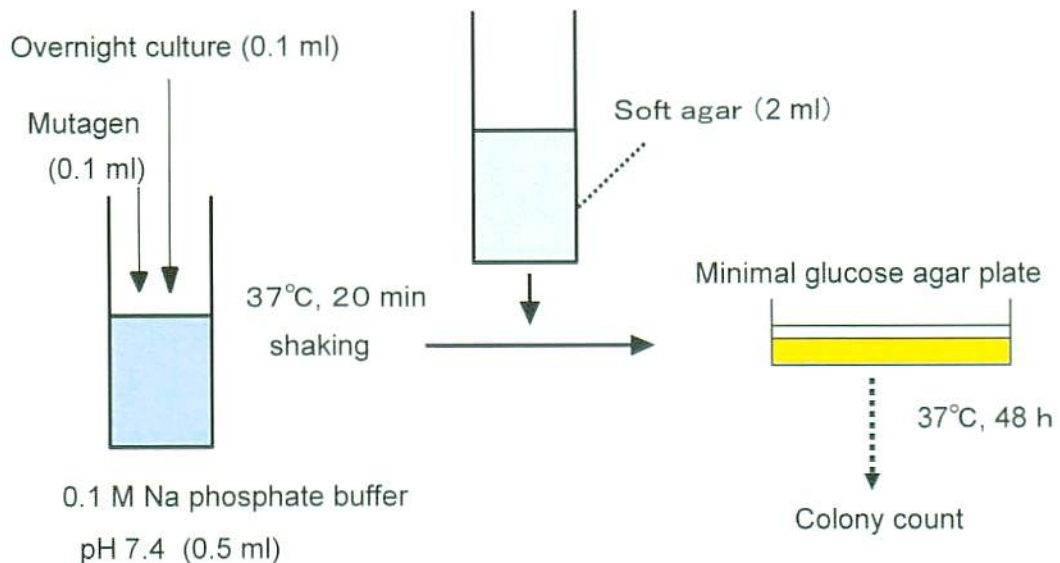


図 2-5. Ames テストの変法

## 2.11 Ames テストの変法: S9-mix を使用しない Ames テスト

### 2.11.1 ワンショットバッチ法

Ames テストの変法は図 2-5 に示す通りである。すなわち、0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.4 を 0.5 ml とり、それに 20 時間培養した菌液と変異原性物質 (ONOO<sup>-</sup>) をそれぞれ 0.1 ml 添加し、37°C で 20 分間振盪して反応させた。さらにヒスチジンおよびビオチン加ソフトアガーを 2.0 ml 添加し、最少グルコース寒天培地に重層した。固まった培地をアルミホイルで遮光して 37°C で 48 時間培養後、復帰コロニー数をカウントした。

### 2.11.2 ツーショットバッチ法

中性 pH 環境における ONOO<sup>-</sup> の半減期の短さを考慮し、同様の方法で ONOO<sup>-</sup> を 2 回に分け、0.05 ml ずつそれぞれ 0 分および 10 分後に添加した。

## 2.12 一定濃度の ONOO<sup>-</sup> 処理における Ames テストの変法

ONOO<sup>-</sup> は中性環境で半減期が非常に短く、直ちに分解されてしまうため、中性 pH 緩衝液中に ONOO<sup>-</sup> を持続注入することにより、その濃度を一定に保つ Constant flux system を応用した Ames テストの変法を確立した。その方法は図 2-6 に示す通りである。あらかじめバイアルに 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液, pH 7.4 を 0.52 ml とり、それに菌液 0.1 ml を加えマグネチックスターラーを用いて攪拌しながら、マイクロシリンジポンプ Model ESP-64 (Eicom 社) で ONOO<sup>-</sup> を 1 分間に 4  $\mu$ l ずつ持続的に 20 分間注入し反応させた。反応液の一部 (20  $\mu$ l) は、ハートインフュージョン寒天培地を用いて総コロニー数、残りの反応液は最小グルコース寒天培地を用いて復帰コロニー数をそれぞれ求めた。

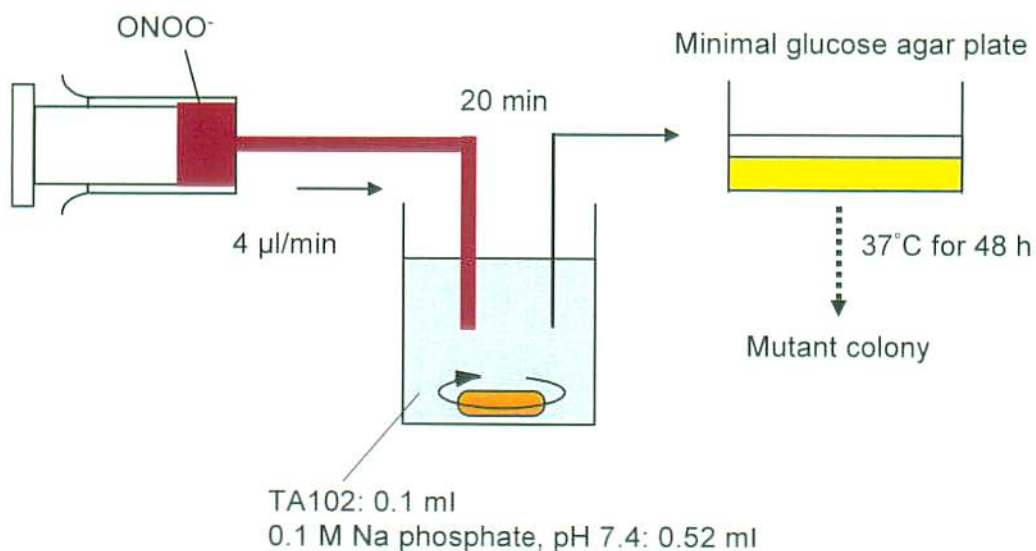


図 2-6. Constant flux を応用した Ames テストの変法

### 2.13 ONOO<sup>-</sup>を変異原とした変異抑制試験

ONOO<sup>-</sup>を変異原として、上記 Ames テストの変法の反応系で各種物質の変異抑制作用を検討した。変異原性試験と一部異なっている点は、あらかじめバイアルに 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液, pH 7.4 を 0.42 ml とり、それに被検物質 0.1 ml を加えた点である。被検物質としては、ONOO<sup>-</sup> 消去剤、各種アミノ酸、抗酸化作用を持つポリフェノール類およびビタミン類、ナタネ油から新規物質として見出されたキャノロール、およびその他の天然由来の物質である。キャノロールの化学構造は 4-vinyl-2,6-dimethoxyphenol (図 2-7) である。ナタネ油中のキャノロールの濃度は、約 200 ppm とされている (Wakamatu, 2001; Tsunehiro et al., 2002)。

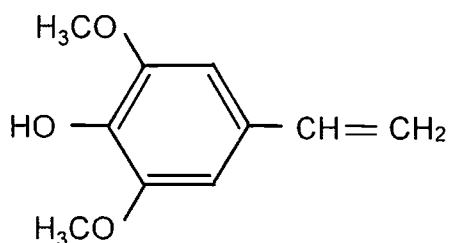


図 2-7. Canolol の化学構造

## 第3章 結果

### 3.1 ONOO<sup>-</sup>の分光特性

0.72 M 亜硝酸ナトリウムを 0.84 M 過酸化水素で酸化し、ONOO<sup>-</sup>を調製した。図3-1は、3回の合成例(サンプル A, B, C)について分光特性を解析した結果を示す。それぞれの合成サンプルを 20 mM NaOH で 200 倍希釈し、吸光度を測定した(図3-1)。合成した ONOO<sup>-</sup>はいずれも 302 nm に吸収極大が認められた。また、不純物の混入もなく、高純度であることが示唆された。302 nm におけるモル吸光係数( $\epsilon = 1670$ )を用いて決定したサンプル A, B および C の ONOO<sup>-</sup>濃度は、それぞれ、110 mM、98.1 mM および 80.8 mM であった。

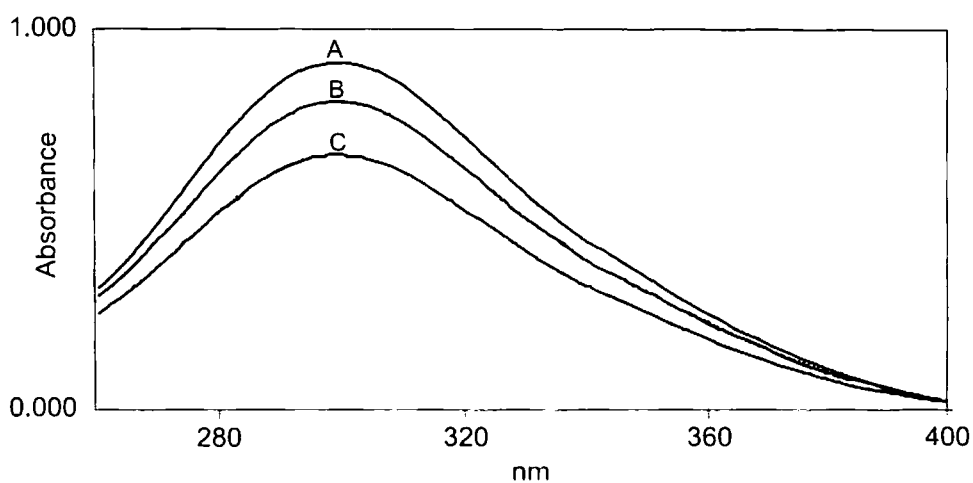


図3-1. ONOO<sup>-</sup>の分光特性

### 3.2 反応液中の pH の影響

種々の pH 環境における ONOO<sup>-</sup> の安定性を調べた(図 3-2)。分光光度計用キュベットに 110 mM ONOO<sup>-</sup> を 5  $\mu$ l 入れておき、90 mM (A)、80 mM (B)、70 mM (C)、60 mM (D)、50 mM (E)、40 mM (F)、および 30 mM (G) のリン酸緩衝液 995  $\mu$ l を勢いよく加え、302 nm における吸光度の経時変化を解析した。終了後、反応液の pH を測定したところ、それぞれ、10.6 (A)、10.2 (B)、9.1 (C)、8.3 (D)、7.6 (E)、7.3 (F)、および 7.1 (G) であった。pH 10 以上では ONOO<sup>-</sup> は全く分解されなかったのに対し、pH が低下することによって、ONOO<sup>-</sup> の半減期は短縮した。

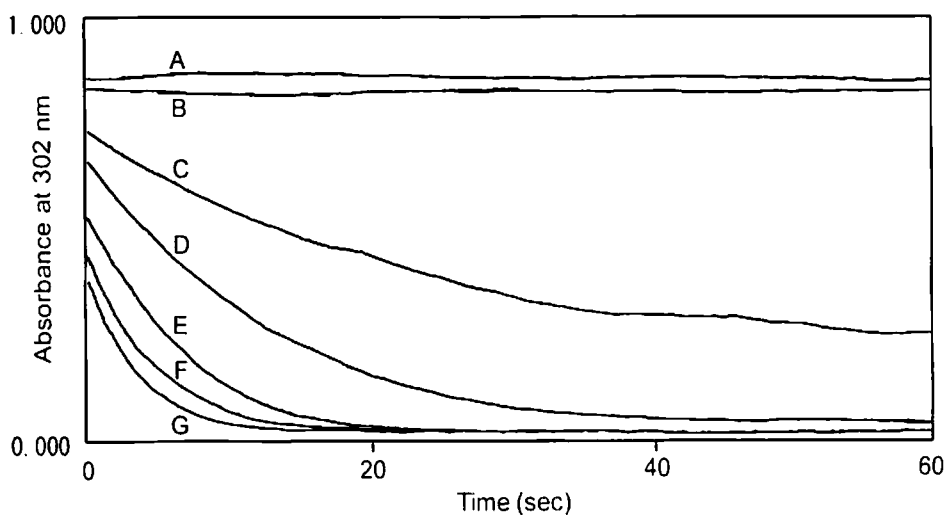


図 3-2. pH による ONOO<sup>-</sup> の分解

反応液の pH は、10.6 (A)、10.2 (B)、9.1 (C)、8.3 (D)、7.6 (E)、7.3 (F)、および 7.1 (G) であった。

### 3.3 *H. pylori* の増殖曲線

5%ウシ胎児血清を添加したブルセラブロスに *H. pylori* を接種し、微好気的環境で振盪培養した。経時的に菌液を採取し、濁度(610 nm)および生菌数(CFU)を測定し、その結果を(図3-3)に示した。濁度は培養開始後48時間まで上昇し、48時間以降ほとんど変化が見られなかった。一方、生菌数も培養開始から48時間後まで上昇し、48時間から72時間までは約 $10^8$  CFU/ml でほぼ一定の値を示したが、その後急速に減少した。細菌の形態は72時間まではほとんどの細菌が桿菌状であったが、96時間後には半数以上が球菌状に変化していた。このことから、以下の実験では、48時間培養した *H. pylori* を使用することにした。

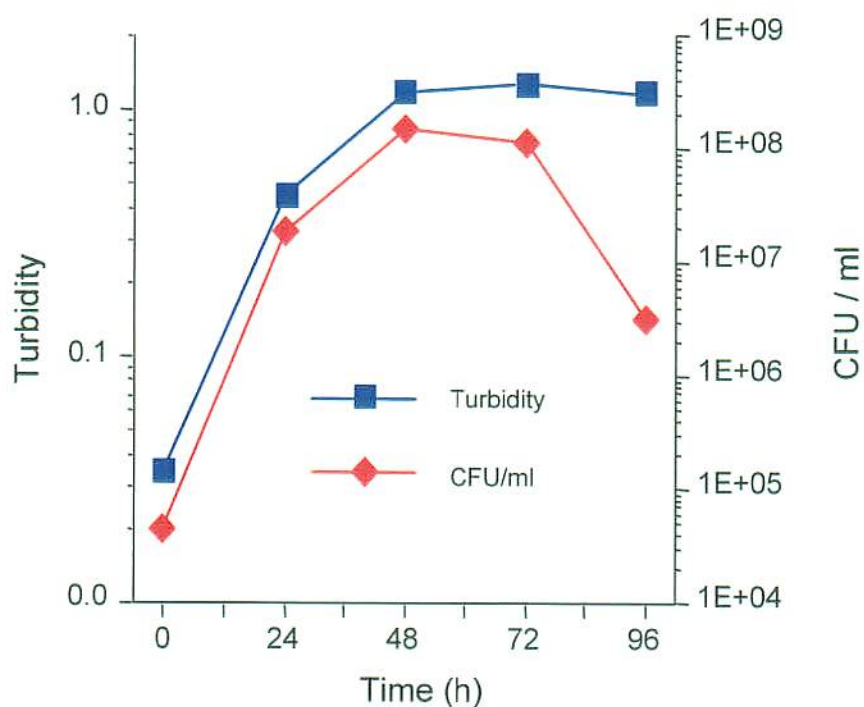


図3-3. *H. pylori* 培養時間ごとの濁度とCFU



### 3.4 Constant flux 法による反応液中の ONOO<sup>-</sup> の定量

#### 3.4.1 分光光度計による定量

分光光度計にセットしたキュベットを反応容器として用いて ONOO<sup>-</sup> の Constant flux を行い、302 nm における吸光度をモニターすることにより、反応液中の ONOO<sup>-</sup> 濃度をリアルタイムで測定した(図 3-4 A)。ONOO<sup>-</sup> の注入を開始すると吸光度が上昇し、5 秒以内に一定値に達した。その後ほぼ一定の ONOO<sup>-</sup> 濃度が維持されたが、注入をやめるとその値はほぼ基線まで下降した(図 3-4 B)。このことから、Constant flux 法を用いることにより、反応液中の ONOO<sup>-</sup> 濃度を一定に保持することが可能であることが明らかとなった。2 mM、1.5 mM および 1.0 mM の ONOO<sup>-</sup> を注入した場合の反応液中の ONOO<sup>-</sup> の濃度は、302 nm における吸光度から、それぞれ、18 μM、13.5 μM および 8.7 μM と計算された。

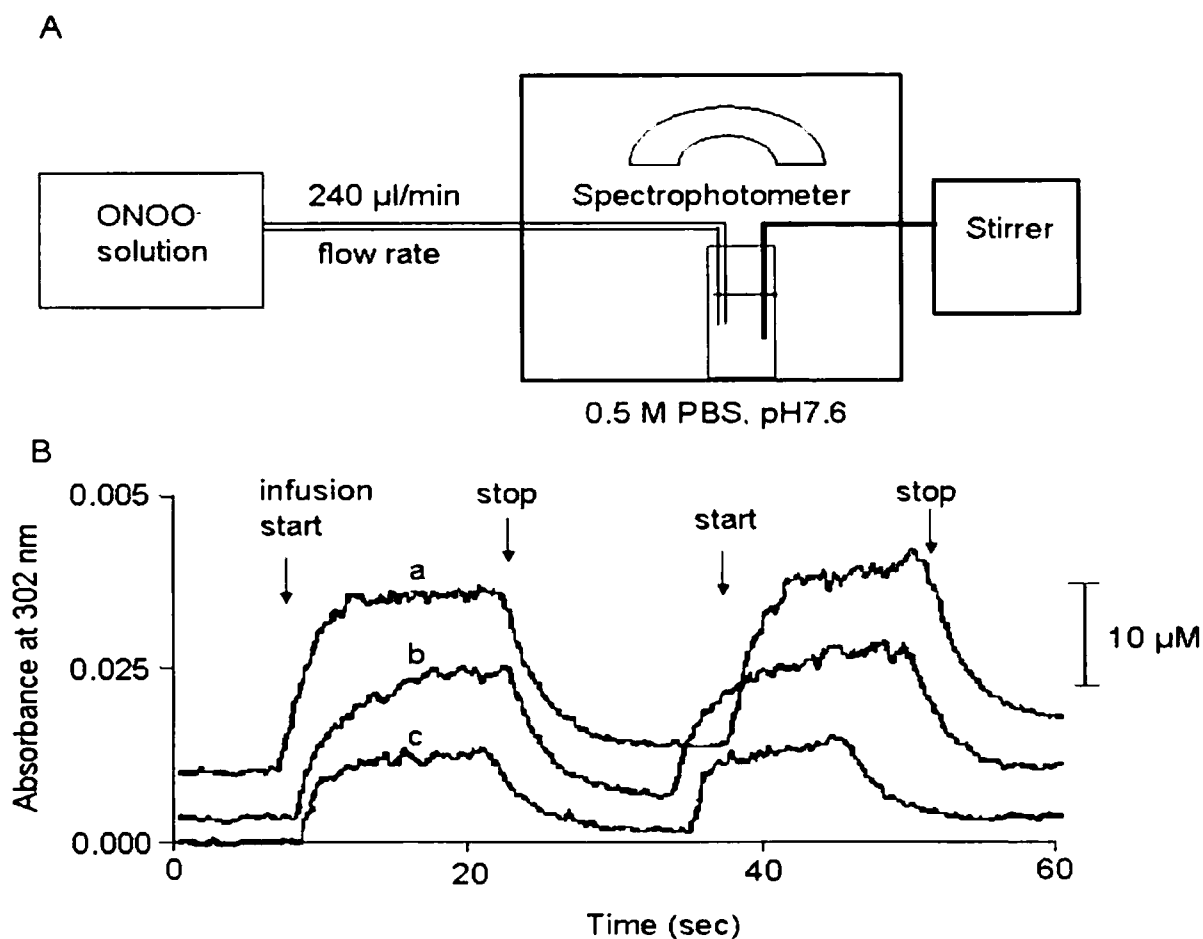


図 3-4. Constant flux 法による反応液中の ONOO<sup>-</sup> の濃度変化

### 3.4.2 Dihydrorhodamine 123 (DHR) 酸化法による反応液中の ONOO<sup>-</sup> 濃度測定

上述の分光光度計を用いた ONOO<sup>-</sup> の定量法は、10 μM 以下の低濃度の ONOO<sup>-</sup> の測定には適していなかった。そこで、低濃度の ONOO<sup>-</sup> の定量には、dihydrorhodamine 123 (DHR) 酸化法 (Crow, 1997) を用いた。すなわち、Constant flux 法により ONOO<sup>-</sup> を持続注入している反応液に、終濃度 28 μM の DHR を加えると同時に ONOO<sup>-</sup> 注入を停止した。DHR の酸化産物であるローダミンを蛍光分光光度計で定量した (図 3-4-2 A)。流速 240 μl/分で 10 μM、100 μM および 1000 μM の ONOO<sup>-</sup> を pH 7.6 の 0.5 M リン酸緩衝食塩液 (1080 μl) に持続注入したところ、反応液中の ONOO<sup>-</sup> の濃度は、注入開始から 5 分後まで 0.3 μM、1.0 μM および 3.0 μM で一定に保たれた。そこで、ONOO<sup>-</sup> 濃度を 10 μM 以下に保持する実験では、この方法で求めた注入 ONOO<sup>-</sup> 濃度と反応液 ONOO<sup>-</sup> 濃度の関係 (図 3-4-2 B) をもとに注入する ONOO<sup>-</sup> の濃度を決めた。

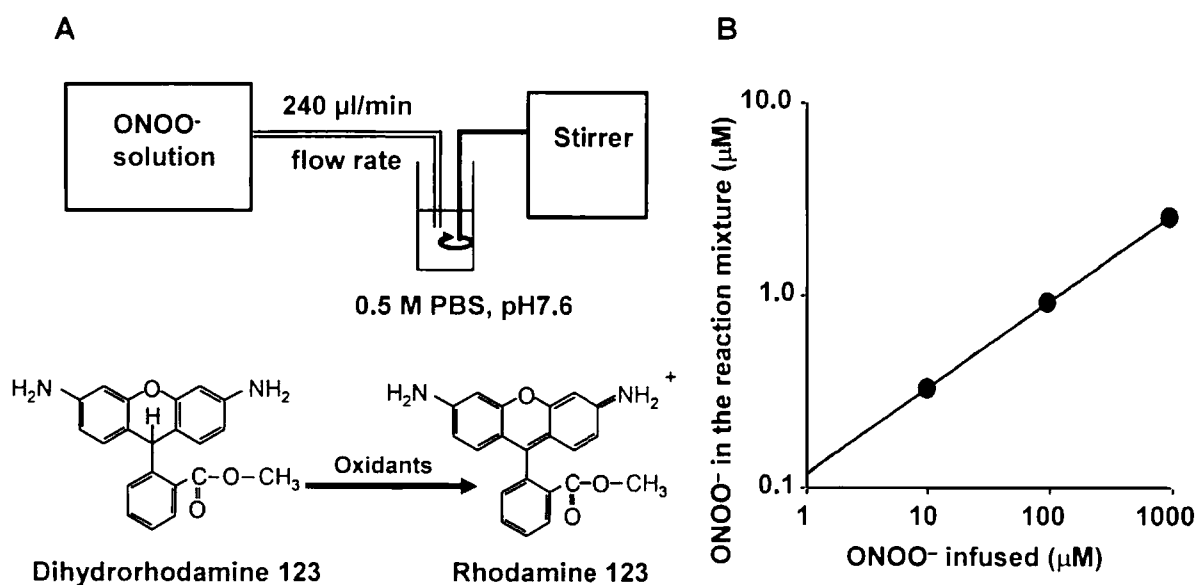


図 3-4-2. DHR 酸化法による注入 ONOO<sup>-</sup> 濃度と反応溶液中の ONOO<sup>-</sup> 濃度の関係

### 3.5 各種細菌に対する ONOO<sup>-</sup>の殺菌作用

Constant flux 法を用いて、各種細菌(10<sup>6</sup>CFU/ml)に 18 μM ONOO<sup>-</sup>を 30 秒から 3 分間持続的に暴露し、30 秒ごとにサンプルをとり、生存細菌数を求めた(図 3-5)。今回使用した細菌では、グラム陰性菌の方が陽性菌と比較して、ONOO<sup>-</sup>に対する感受性が高かった。特に、*H. pylori* は ONOO<sup>-</sup>の殺菌作用に感受性が高く、1 分間の作用によりコントロールの 10 万分の 1(-5 log)まで減少した。

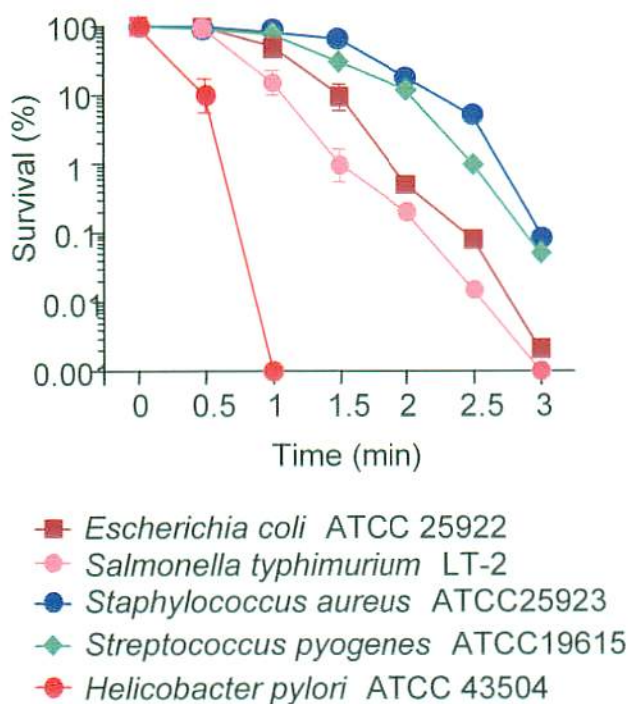


図 3-5. ONOO<sup>-</sup>の殺菌作用に対する各種細菌の感受性  
(means ± SD, n=3)

### 3.6 *H. pylori*に対する ONOO<sup>-</sup>の殺菌作用

そこで、*H. pylori*に対してさらに低濃度の ONOO<sup>-</sup>で処理し、その殺菌作用について検討した(図3-6 A)。ONOO<sup>-</sup>は濃度および時間依存的な殺菌作用を示したが、ONOO<sup>-</sup>分解産物(主に硝酸イオン)は*H. pylori*に対して全く殺菌作用を示さなかった(図3-6 A)。*H. pylori*を0.5 M 磷酸緩衝0.15 M 食塩液, pH 7.6 に浮遊させ( $10^8$  CFU/ml)、中性 pH 環境で5分の半減期で1分子あたり2分子の NO を放出することが知られている NO 放出試薬 P-NONOate (Keefer et al., 1996; Okamoto et al., 1997)を10分間反応させた。1, 10, あるいは100 mM P-NONOate は、細菌の生存には全く影響を与えなかった(図3-6 B)。これらの結果から、ONOO<sup>-</sup>は*H. pylori*に対して強力な殺菌作用を発揮するのに対して、NO 分子はほとんど殺菌作用を示さないことが明らかとなった。

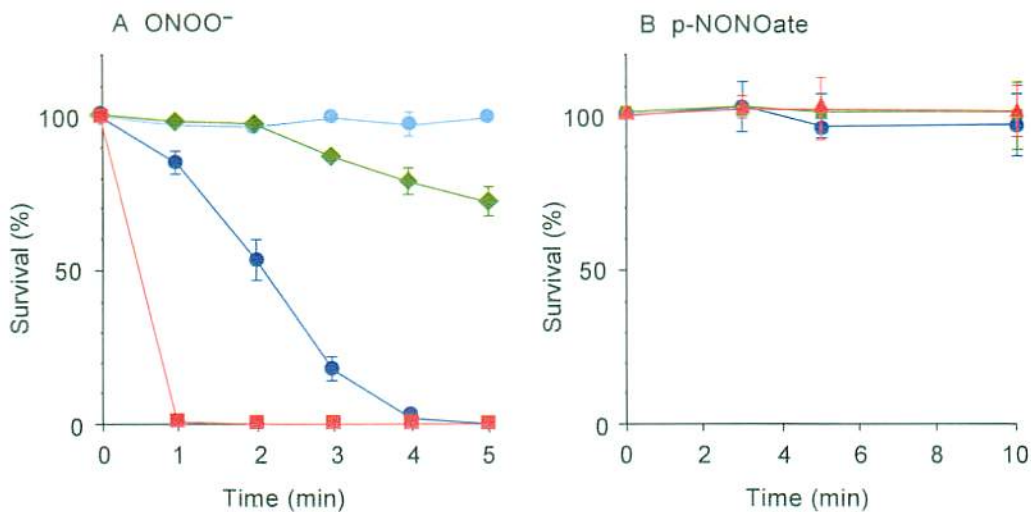


図3-6. *H. pylori*に対する ONOO<sup>-</sup>と NO の殺菌作用

#### A *H. pylori*に対する ONOO<sup>-</sup>の殺菌作用

分解した ONOO<sup>-</sup> を 20 mM NaOH で調整した液 (1 mM ONOO<sup>-</sup>と等価) (●); 10 mM (◆), 100 mM (●), あるいは 1 mM ONOO<sup>-</sup> (■) を、流速 240 ml/分で細菌浮遊液 ( $1 \times 10^8$  CFU/ml) 1080  $\mu$ l に注入した。30 秒ごとに、反応液から 120  $\mu$ l を採り、CFU を求めた。10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M および 1 mM ONOO<sup>-</sup> を注入した場合の反応液中の ONOO<sup>-</sup> の濃度は、(図3-4-2) よりそれぞれ 0.3, 1.0 および 3  $\mu$ M 一定に保持されていると見積もった。

#### B NO ドナーである P-NONOate 処理後の *H. pylori* の生存率

*H. pylori* ( $1 \times 10^8$  CFU/ml) と 1  $\mu$ M (●), 10  $\mu$ M (■), および 100  $\mu$ M (▲) P-NONOate を反応させ、反応後の CFU を求めた。(means  $\pm$  SD, n=3)

### 3.7 ONOO<sup>-</sup>の殺菌作用に対する尿素の影響

ONOO<sup>-</sup>と *H. pylori* の反応系に生理的濃度の尿素(10 mM)を添加したところ、生存する *H. pylori* は明らかに増加した(図3-7 A)。同様に、微好気性でウレアーゼ活性を欠いた *C. jejuni*(臨床分離株)についても実施した。ONOO<sup>-</sup>に対する *C. jejuni* の感受性は、尿素の添加によっても影響を受けなかった(図3-7 B)。このことは、尿素自体には直接的な殺菌作用がないことを意味している。さらに、これらのことは *H. pylori* によって産生されたウレアーゼが ONOO<sup>-</sup> の殺菌作用を抑制したことを示唆している。

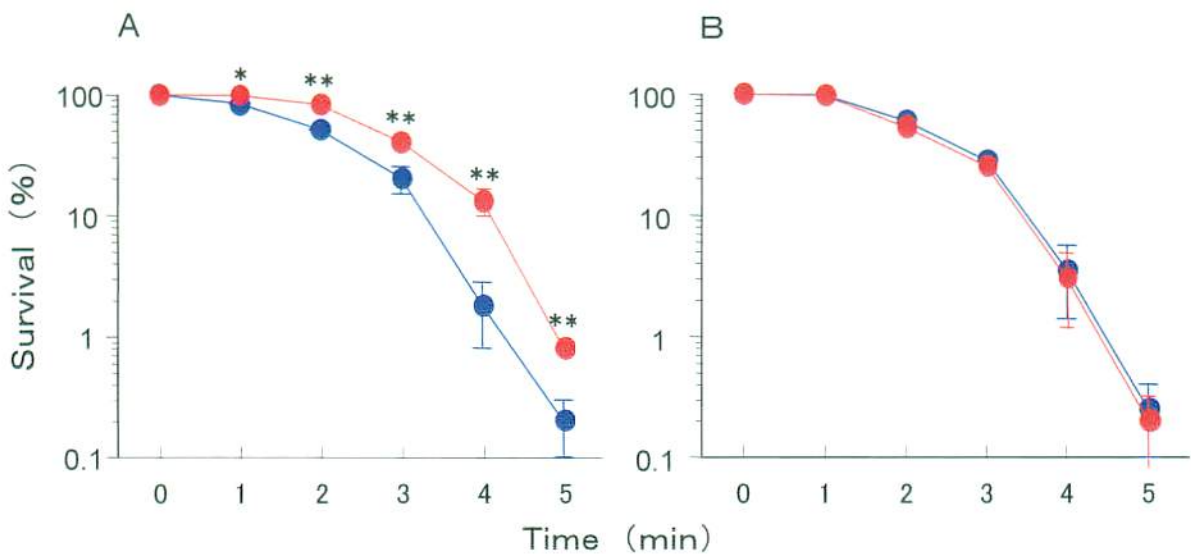


図3-7. *H. pylori* ATCC 43504 株 および *C. jejuni* における ONOO<sup>-</sup> の殺菌作用に対する尿素の効果

A, *H. pylori* ATCC 43504 株; B, *C. jejuni*. 10 mM 尿素存在下(●)および非存在下(●)で、細菌( $1 \times 10^8$  CFU/ml)と ONOO<sup>-</sup> (1  $\mu$ M)を一定濃度で注入し、その後、生存細菌を反応時間ごとにCFU測定法によりカウントした。

(means  $\pm$  SD, n=3, \*, P<0.05 vs control without urea; \*\*, P<0.01 vs control without urea)

### 3.8 *H. pylori* HPK5 株とそのウレア-ゼ欠損変異 HPT209 株における ONOO<sup>-</sup>の殺菌作用に対する尿素の影響

このことをさらに確認するために、*H. pylori* HPK5 株とそのウレア-ゼ欠損変異 HPT209 株を用いて、ONOO<sup>-</sup>の殺菌作用に対する尿素の効果調べた。尿素が存在しない場合、これらの 2 菌株は ONOO<sup>-</sup>に対して同様の感受性を示した(図 3-8 A および B)。尿素を添加すると親株である HPK5 株(図 3-8 A)では、ONOO<sup>-</sup>の殺菌作用は減弱されたのに対して、ウレア-ゼ欠損変異株である HPT209 株(図 3-8 B)では、ONOO<sup>-</sup>の殺菌作用に変化は見られなかった。この結果は、ウレア-ゼ活性が ONOO<sup>-</sup>の細胞毒性の減弱に必須であることを示している。

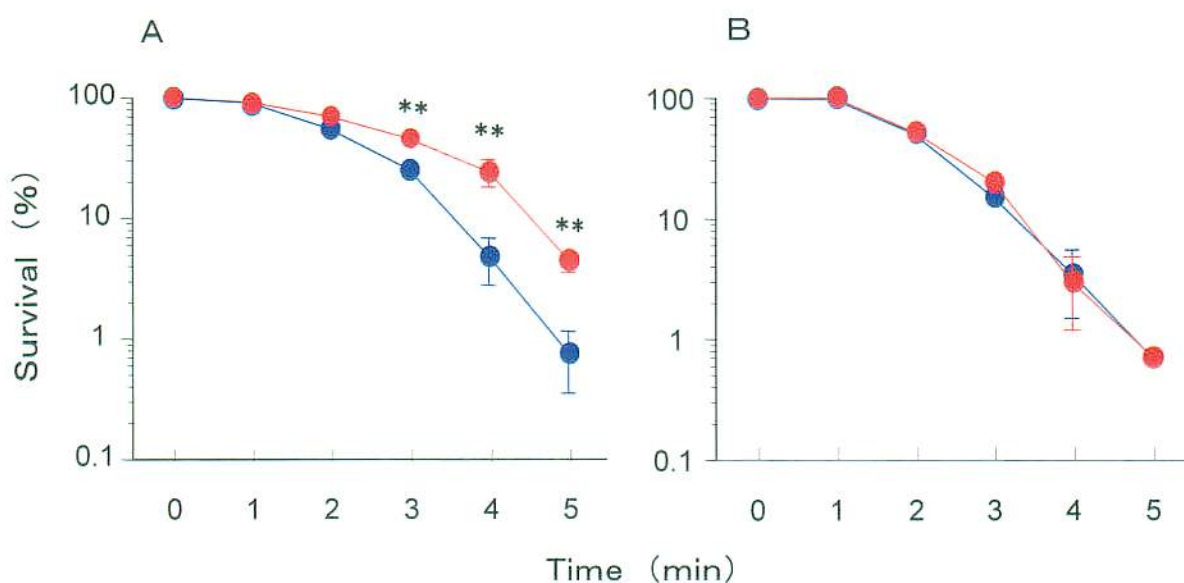


図 3-8. *H. pylori* HPK5 株とそのウレア-ゼ欠損変異 HPT209 株における ONOO<sup>-</sup>の殺菌作用に対する尿素の効果

A, *H. pylori* HPK5 株; B, HPT209 株. 10 mM 尿素存在下(●)および非存在下(●)で、細菌( $1 \times 10^8$  CFU/ml)と ONOO<sup>-</sup> (1  $\mu$ M)を一定濃度になるように注入し、その後、生存細菌を反応時間ごとに CFU 測定法によりカウントした。

(means  $\pm$  SD, n=3, \*\*, P<0.01 vs control without urea)

### 3.9 ONOO<sup>-</sup>の殺菌作用に対する NaHCO<sub>3</sub> および NH<sub>3</sub> の影響

*H. pylori* に対する ONOO<sup>-</sup> の殺菌作用は、尿素存在下でウレアーゼ依存的に減弱した (図 3-7 A、図 3-8)。そこで、ウレアーゼによる尿素的代謝産物である CO<sub>2</sub> および NH<sub>3</sub> の ONOO<sup>-</sup> の殺菌作用に対する効果を、それぞれの生理的な濃度 (Neithercut et al., 1993) を用いて調べた。20 mM の NaHCO<sub>3</sub> は 10 mM 尿素と同じ程度まで ONOO<sup>-</sup> による *H. pylori* の殺菌効果を抑制したが、20 mM の NH<sub>4</sub>OH にはそのような効果は認められなかった (図 3-9)。10 mM 尿素に加え、20 mM の NaHCO<sub>3</sub> を添加したところ、ONOO<sup>-</sup> 処理による *H. pylori* の生存率の低下は、10 mM 尿素のみの場合に比べ、さらに抑制された (図 3-9)。*H. pylori* に対する ONOO<sup>-</sup> の殺菌作用は、生理的な濃度の HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (20 mM) および尿素 (10 mM) によって抑制されたことから、生体内においても、*H. pylori* のウレアーゼによって産生される CO<sub>2</sub>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> が菌体を保護していることが示唆される。

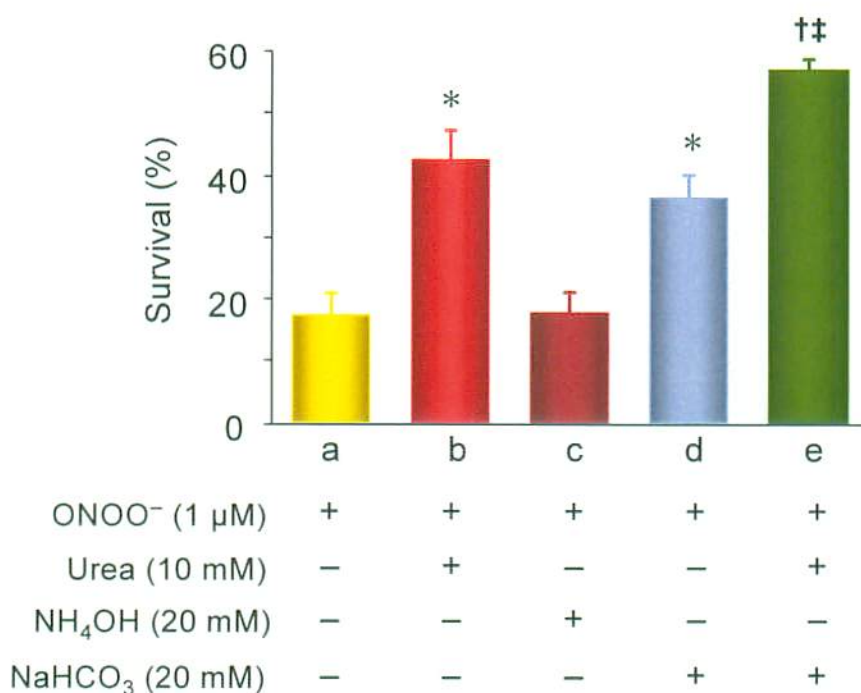


図 3-9 *H. pylori* における ONOO<sup>-</sup> の殺菌作用に対する NaHCO<sub>3</sub> および NH<sub>4</sub>OH の効果  
*H. pylori* (1×10<sup>8</sup> CFU/ml) に下記の条件で一定濃度の ONOO<sup>-</sup> (1.0 μM) を 3 分間暴露させた後、FU を求めた。a, コントロール; b, 10 mM 尿素存在下; c, 20 mM NH<sub>4</sub>OH 存在下; d, 20 mM NaHCO<sub>3</sub> 存在下; e, 10 mM 尿素および 20 mM NaHCO<sub>3</sub> 存在下。

(means±SD, n=3, \*, P<0.01 vs a; †, P<0.05 vs b; ‡, P<0.005 vs d)

### 3.10 ONO<sup>2-</sup>の殺菌作用に対するウレアーゼ阻害剤の影響

*H. pylori*のウレアーゼは、菌体内に存在するのみならず、菌体から遊離した酵素が菌体表面に結合していることが知られている (Phadnis et al., 1996)。菌体内に分布するウレアーゼあるいは菌体表面のウレアーゼのいずれが ONO<sup>2-</sup>の殺菌作用の低下に重要な役割を果たしているかを、2種類のウレアーゼ阻害剤を用いて検討した。菌体内に取り込まれない *N*-(diaminophosphinyl)-4-fluorobenzamide (flurofamide) を細胞表面のウレアーゼの特異的阻害剤として、細胞壁ならびに細胞膜を透過する acetohydroxamic acid (AHX) を細胞内外の両方のウレアーゼ阻害剤として用いた (Nakamura et al., 1998)。尿素が存在しない場合、これらのウレアーゼ阻害剤は *H. pylori* に対する ONO<sup>2-</sup>の殺菌作用に影響を与えなかった。一方、ONO<sup>2-</sup>に対する尿素的保護効果は、10 mM flurofamide あるいは 70 mM AHX の存在下にほぼ完全に消失した (図3-10)。Flurofamide と AHX を比較すると、flurofamide は菌体内に入らないにも係わらず、尿素的影響を無効にする作用がより強力だった (図3-10)。このことは、細菌細胞の表面に局在している細胞外ウレアーゼが ONO<sup>2-</sup>の殺菌作用の抑制に重要な役割を演じていることを意味する。逆に、*B. pasteurii* 由来のウレアーゼを反応液に添加したところ、尿素的保護効果は増大した (図3-10)。以上の結果より、菌体外に分布するウレアーゼが *H. pylori* に対する ONO<sup>2-</sup>の殺菌作用の減弱に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。



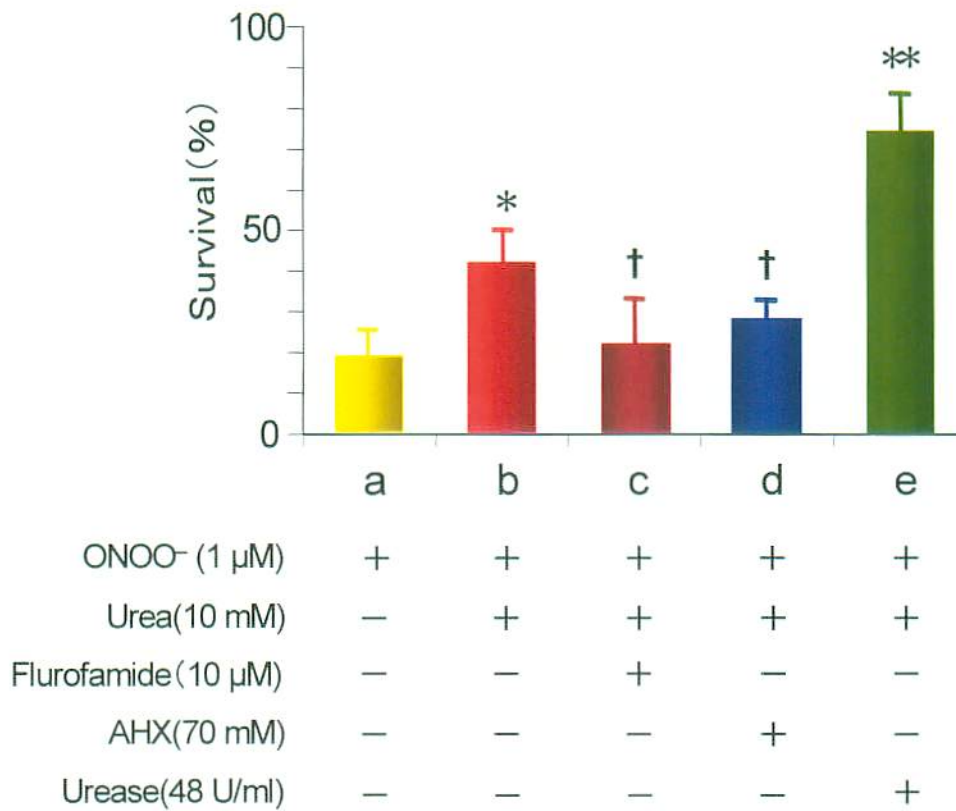


図3-10. *H. pylori* における ONOO<sup>-</sup> の殺菌作用に対するウレアーゼ阻害剤およびウレアーゼの効果

*H. pylori* ( $1 \times 10^8$  CFU/ml) の懸濁液に対し、10 mM 尿素存在下(b-e)および非存在下(a)で、10 mM flurofamidine (c), 70 mM AHX (d), あるいは48 U/ml *B. pasteurii* ウレアーゼ(e)を添加し、一定濃度の ONOO<sup>-</sup> (1 μM) を3分間暴露した後、CFUを求めた。

(means ± SD, n=3, \*, P<0.01 vs a; †, P<0.05 vs b; \*\*, P<0.005 vs b)

### 3.11 反応液の pH の確認

ONOO<sup>-</sup>の化学的反応性は、pHの上昇にともなって低下することが知られていることから(Zhu et al., 1992; Lymar et al., 1995; Lymar et al., 1998)、ウレアーゼによる尿素の代謝産物のひとつであるNH<sub>3</sub>が反応液のpH、さらにはONOO<sup>-</sup>の殺菌作用に影響を与える可能性が考えられたが、今回の実験系では、反応液のpHはほとんど変化を与えなかった。すなわち、pH 7.6の0.5 M 磷酸緩衝食塩液に*H. pylori*を10<sup>8</sup> CFU/mlになるように浮遊させ、この浮遊液に流速240 μl/分で100 μM ONOO<sup>-</sup>を0、1、2、3、4および5分間注入した後の反応液のpH値は、それぞれ7.57 ± 0.01、7.60 ± 0.01、7.63 ± 0.01、7.66 ± 0.02、7.68 ± 0.02および7.69 ± 0.01(3回実験の平均 ± SD)であった。また、同反応系に10 mM尿素を添加した場合の反応液のpH値は、それぞれ7.57 ± 0.01、7.60 ± 0.01、7.63 ± 0.02、7.65 ± 0.02、7.67 ± 0.02および7.69 ± 0.01(3回実験の平均 ± SD)であった。それゆえ、ONOO<sup>-</sup>に対するウレアーゼの保護的効果はCO<sub>2</sub>の産生によるもので、NH<sub>3</sub>の放出あるいはそれに伴うpHの変化ではないと結論した。このことは一般に広く信じられているウレアーゼ pH説を否定するものである。

### 3.12 ONOO<sup>-</sup>による*H. pylori*菌体チロシンのニトロ化

ONOO<sup>-</sup>はチロシン等の芳香化合物をニトロ化することが知られている(Beckman, 1996; Ischiropoulos, 1998)。細菌成分とONOO<sup>-</sup>の反応に対するウレアーゼの効果をしらべるために、尿素存在下および非存在下で、ONOO<sup>-</sup>で処理した*H. pylori*菌体中のニトロチロシンを測定した(図3-11A)。1.0 μM ONOO<sup>-</sup>で3分間暴露した細菌細胞のニトロチロシンの量は267 ± 22 pM/10<sup>8</sup> CFU、あるいは全チロシンの7.48 ± 1.2%であった(図3-11B)。ニトロチロシンはONOO<sup>-</sup>に暴露していない菌体からは検出されなかった(<0.1 pM/10<sup>8</sup> CFU)。P-NONOateで処理した細菌細胞からもニトロチロシンは検出されなかった。一方、反応液に10 mM尿素あるいは20 mM NaHCO<sub>3</sub>を添加することによって、ONOO<sup>-</sup>によるニトロチロシンの産生は、約50%に低下した(図3-11B)。このことは、細菌のウレアーゼ活性によって生じるCO<sub>2</sub>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>がONOO<sup>-</sup>の分解速度を速め、細菌に到達するONOO<sup>-</sup>量を低下させていることを示唆している。

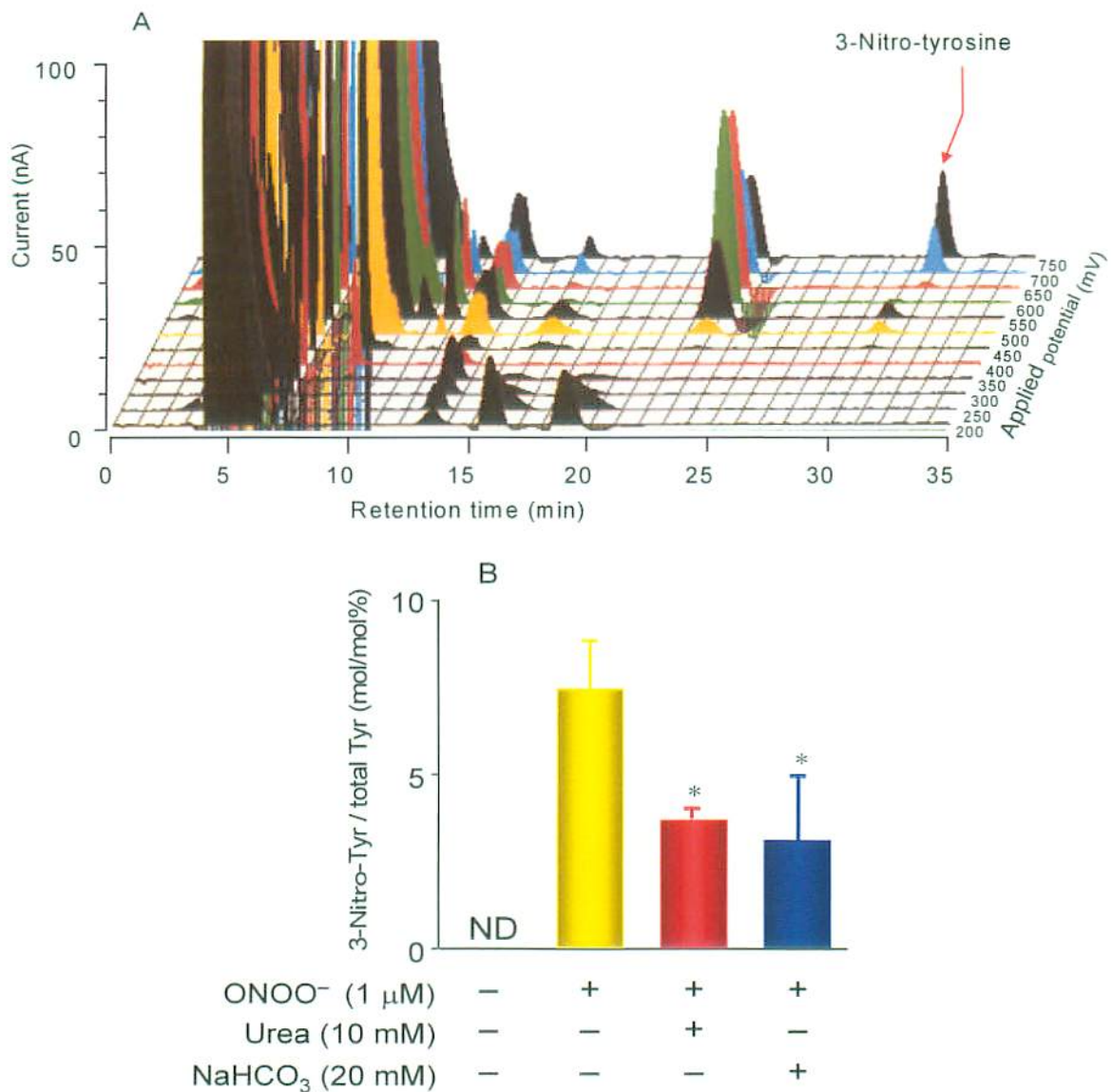


図3-11. 尿素およびNaHCO<sub>3</sub>存在におけるONOO<sup>-</sup>処理による*H. pylori*チロシンのニトロ化

3-ニトロチロシンはHPLC-多電極EC法によって検出した。ONOO<sup>-</sup>未処理*H. pylori*菌体(a)、1.0 μM ONOO<sup>-</sup>で3分間処理(b)、10 mM 尿素存在下で1.0 μM ONOO<sup>-</sup>で3分間処理(c)、20 mM NaHCO<sub>3</sub>存在下で1.0 μM ONOO<sup>-</sup>で3分間処理(d)。

A. 尿素あるいはNaHCO<sub>3</sub>なしで1.0 μM ONOO<sup>-</sup>3分間処理後の*H. pylori*の溶出プロファイル。

B. *H. pylori*の3-ニトロチロシンの量は、細菌から回収した総チロシンに対する3-ニトロチロシンの割合として表している。NDは3-ニトロチロシン未検出(<0.1 pM/10<sup>8</sup> CFU)。

(means±SD, n=3, \*, P<0.05 vs b)

### 3.13 ONO<sup>2-</sup>処理によるクラリスロマイシン(CLR)耐性菌の検出頻度

*H. pylori* と 1.0 μM ONO<sup>2-</sup>またはコントロール (ONO<sup>2-</sup>なし, 0.5 M リン酸緩衝食塩液, pH 7.6)を持続的に反応させ、0.2 μg/ml CLR 入り平板培地に発育したコロニー (CLR 耐性コロニー)の検出結果を表 3-1 に示した。ONO<sup>2-</sup>濃度は、それを 10 分間暴露することにより細菌数が約半分死滅する 1.0 μM を使用した。ONO<sup>2-</sup>処理前の反応液は pH 7.57、処理後は pH 7.75 であった。このことから、アルカリ化による殺菌および変異促進はないと考えられた。36 回の実施において、0.2 μg/ml CLR 加平板培地(360 枚ずつ)に発育したコロニーはコントロールで 4 個、ONO<sup>2-</sup>処理で 14 個であった。これらのすべてのコロニーが *H. pylori* であることを、グラム染色性、運動性およびウレアーゼ活性により確認した。また、これらのコロニーには(A)から(R)までの記号をつけた。コントロール群では  $8.815 \times 10^9$  に 1 回、ONO<sup>2-</sup>処理群では  $1.328 \times 10^9$  に 1 回の割合で CLR 耐性菌が出現したことになる。この場合の CLR 耐性菌出現相対頻度は、コントロール群に比べて ONO<sup>2-</sup>処理群では 6.64 倍高い。

表 3-1. ONOO<sup>-</sup>あるいはPBS 処理後の CLR 耐性コロニーの出現頻度<sup>a</sup>

Experiment number	Control		ONOO <sup>-</sup> exposure	
	CFU/ml ×10 <sup>7</sup>	No. of mutant colonies	CFU/ml ×10 <sup>7</sup>	No. of mutant colonies
1	112		69	
2	98		62	1 (A)
3	63		37	
4	137	1 (B)	77	1 (C)
5	98		42	
6	108		68	1 (D)
7	125		60	
8	75		43	
9	42		16	
10	59	1 (E)	21	
11	120		59	
12	94		47	1 (F)
13	40		40	
14	105		48	1 (G)
15	93		66	
16	66		22	
17	93		58	1 (H)
18	54		31	1 (I)
19	174	1 (J)	89	
20	87		31	
21	197		93	2 (K,L)
22	88		57	
23	138		54	
24	97		38	
25	112		55	
26	152		77	1 (M)
27	108		67	
28	42		18	1 (N)
29	120		59	
30	87		37	1 (O)
31	133		79	
32	65		39	
33	68		38	1 (P)
34	105	1 (Q)	62	
35	122		75	1 (R)
36	49		25	
Total	3526	4	1859	14
Average	97.94		51.64	
Mutation frequency	1/881.5		1/132.8	
Relative mutation frequency	1		6.64	

<sup>a</sup>  $1 \times 10^9$  CFU/ml に調整した菌液 0.9 ml を PBS(control) 又は 1.0  $\mu$ M ONOO<sup>-</sup> で処理し、その処理液を 0.2  $\mu$ g/ml CLR 加平板培地にそれぞれ 10 枚ずつ塗抹した。この操作を 36 回実施した。変異コロニーの欄は、検出された CLR 耐性コロニーの数とそれぞれのコロニーに付けられた記号を表している。

### 3.14 CLR 耐性菌の MIC 値

0.2 µg/ml CLR 加平板培地に発育したコロニー (A~R) に対する CLR の MIC を測定し、その結果を表 3-2 に示した。 *H. pylori* TACC 43504 (親株) の MIC は 0.05 µg/ml であったのに対して、1.0 µM ONOO<sup>-</sup>あるいは 0.5 M リン酸緩衝食塩液, pH 7.6 処理由来の A~R 株は 25.6 µg/ml あるいはそれ以上であった。これらの菌株はいずれも親株の MIC に対して、500 倍以上、上昇した。

表 3-2. CLR 耐性菌の MIC 値<sup>a</sup>

Sample	MIC (µg/ml)	Sample	MIC (µg/ml)
A	25.6	J	25.6
B	≥51.2	K	≥51.2
C	≥51.2	L	25.6
D	≥51.2	M	≥51.2
E	≥51.2	N	25.6
F	25.6	O	≥51.2
G	≥51.2	P	≥51.2
H	25.6	Q	≥51.2
I	≥51.2	R	≥51.2
Hp ATCC <sup>b</sup>	0.05	Wild-type strains	0.035 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> CLR 耐性変異株の MIC 値は親株のそのの 500 倍以上上昇した。

<sup>b</sup> *H. pylori* ATCC 43504 株 (標準株); <sup>c</sup> 臨床分離 5 株の平均

### 3.15 CLR 耐性菌の遺伝子解析

#### 3.15.1 PCR-RFLP 法による CLR 耐性菌の解析

PCR 法で得られた増幅産物を restriction fragment length polymorphism (RFLP) 法で解析した。 *Bsa*I (A2143G を認識) および *Mbo*II (A2142G を認識) 処理後のバンドのパターンを図 3-12 に示した。 CLR 耐性 (A~R) 18 菌株の中、 *Bsa*I で切断され、700 bp、400 bp および 300 bp 付近にバンドが認められたもの (Lane 3 および Lane 5) が 6 菌株であった。一方、 *Mbo*II で切断され、700 bp 付近にバンドが認められたもの (Lane 4) が 9 菌株であった。残りの 3 菌株は *Bsa*I および *Mbo*II のいずれでも切断されなかった。

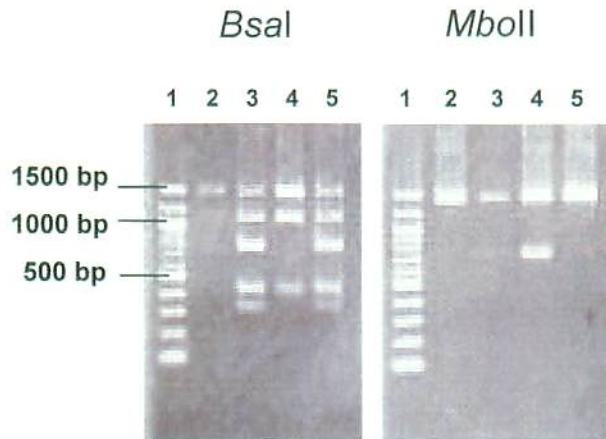


図 3 - 1 2. CLR 耐性菌株の RFLP 解析

Lane 1: 標準 DNA マーカー, Lane 2: *H. pylori* ATCC 43504, Lane 3: PBS 処理(コントロール)自然発生 CLR-耐性(A2143G), Lane 4: ONOO<sup>-</sup>処理 CLR-耐性(A2142G), Lane 5: CLR 誘導耐性(A2143G)。Lane 5 の CLR 誘導耐性菌株は次の手順で得た。*H. pylori* ATCC 43504 を 0.025 µg/ml の割(1/2 MIC)に CLR を加えた寒天培地で培養した。発育した細菌を次は 0.05 µg/ml 入りの CLR 寒天培地で培養した。添加する CLR の濃度を徐々に増やしなが、塗抹と培養を 30 回繰り返した。このようにして、高度の CLR 耐性菌株を人為的に作り出した。

### 3. 15. 2 シークエンスによる CLR 耐性菌の解析

DNA 塩基配列の解析を CLR 耐性 18 菌種の変異場所の同定のために実施した。14 菌株のシークエンス解析の結果は上述の RFLP 解析の結果と一致した。1 菌株だけは *MboII* 制限酵素によって切断され、A2142G 変異に加えて 2604 部位に G の挿入がみられた。3 菌株は *BsaI* でも *MboII* でも切断されず、その 1 つは A2142T 変異であり、他の 2 つは C2695G 変異であった。表 3 - 3 に示すように、PBS 単独で処理した *H. pylori* は、A2142G と A2143G 変異の 2 種類だけが見られた。しかしながら、ONOO<sup>-</sup>で処理した場合は、A2142G および A2143G は顕著であるが、さらに A2142T、C2695G、および A2142G 変異に加えて 2604 部位に G の挿入が認められた。

表 3-3. DNA 塩基配列解析による CLR 耐性菌 18 株の変異部位の特定

処理	変異場所と数	変異菌株の数
コントロール(PBS) <sup>a</sup>	A 2 1 4 2 G 2	4
	A 2 1 4 3 G 2	
1.0 μM ONOO <sup>-</sup> (constant flux) <sup>b</sup>	A 2 1 4 2 G 7 <sup>c</sup>	14
	A 2 1 4 3 G 4	
	A 2 1 4 2 T 1	
	C 2 6 9 5 G 2	

<sup>a</sup> 0.5 M リン酸緩衝食塩液, pH 7.6

<sup>b</sup> コントロールと同じ緩衝液を使用

<sup>c</sup> 7 菌種のうち 1 菌種のみ 2604 に G の挿入が見られた。

### 3.16 Ames テスト用菌株の検定

Ames テストで使用する菌株は、物質の変異原性の検出を高めるために、DNA 損傷修復酵素の欠損による突然変異頻度の増加、細胞壁リポ多糖類合成能の欠損による化学物質の細胞内への透過性の増大、プラスミドの導入による突然変異生成過程での生物増幅などの工夫がなされている。そのため、テストに使用する菌株は非常に変異を起こしやすく、その保存も難しい。そのため変異原性テスト実施にあたっては、その都度下記のような菌株の検定が必要である。

#### 3.16.1 アンピシリン (ABPC) 耐性試験

分与直後の *Salmonella typhimurium* TA 100 (TA 100) は、アンピシリン (ABPC) 耐性プラスミドの脱落はほとんど認められなかった。しかし、*Salmonella typhimurium* TA 98 (TA 98) 株および *Salmonella typhimurium* TA 102 (TA 102) 株は、ABPC を含まない寒天平板培地に比較して ABPC 入りの寒天平板培地においては、コロニー数の減少が見られ、ABPC 耐性プラスミドの脱落が認められた。そこで ABPC 入り培地で耐性菌の培養を 3 回試み、再度試験を実施した。その結果、3 菌株とも ABPC の有無に関係なく平板培地におけるコロニー数にほとんど差は認められなくなった。このことから 3 菌株は ABPC



耐性プラスミドの欠損のないことを確認できた。なお、TA 102 株については ABPC とテトラサイクリン (TC) の両者を含むプレートも使用した。

### 3.16.2 *rfa* の検定

*rfa* の検定は、細菌入りのソフトアガーを重層した普通寒天平板培地に、クリスタルバイオレットを染み込ませた円形ろ紙を置き、37°C で 24 時間培養後の発育阻止円の形成が 14 mm 以上となっている。TA 98 株で 16 mm, TA 100 株で 17 mm および TA 102 株で 14 mm の発育阻止円がそれぞれ認められた。このことから、3 菌株とも細胞壁のリポ多糖体の合成ができず、化学物質の透過性が高く、分子量が比較的大きい物質でも細胞内に入りやすくなった変異株であることを確認できた。

### 3.16.3 標準変異原性物質による検出感度チェック

任意の化学物質の変異原性の基準は、被検物質の復帰コロニー数がコントロール (精製水あるいは DMSO, dimethylsulfoxide) の 2 倍以上を示した場合、陽性とされている (Maron et al., 1983)。変異原性検出感度チェックは、コントロールの復帰コロニー数、標準変異原性物質の指定濃度における復帰コロニー数の明らかな増加および再現性を指標とした。復帰コロニーはコロニーアナライザー model CA-11 (System Science 社) を用いてカウントした。TA 98 株の標準変異原性物質として 2-nitrofluorene、TA 100 株は、*N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (nitrosoguanidine) を、TA 102 株は mitomycin C をそれぞれ使用し、3 回実験した結果を図 3-13 に示した。コントロールにおける自然復帰コロニー数の目安は、TA 98 株で 30~40 個、TA 100 株で 100~150 個、TA 102 株で 300~450 個とされ、菌株と標準変異原性物質の組合せで陽性を示す濃度は、TA 98 株および TA 100 株で 2 µg/plate、TA102 株で 0.2 µg/plate とされている。実験したところ自然復帰コロニー数は 3 菌株とも指定範囲内であった。また、TA 98 株および TA 100 株では、標準変異原性物質 nitrofluorene および nitrosoguanidine を 2 µg/plate、また TA102 株では mitomycin C を 0.2 µg/plate で反応させることにより、明らかに復帰コロニー数の増加が見られた。

アンピシリン耐性試験、*rfa* の検定および標準変異原性物質による検出感度チェックの結果から、3 菌株とも Ames テストに使用可能であることを確認した。

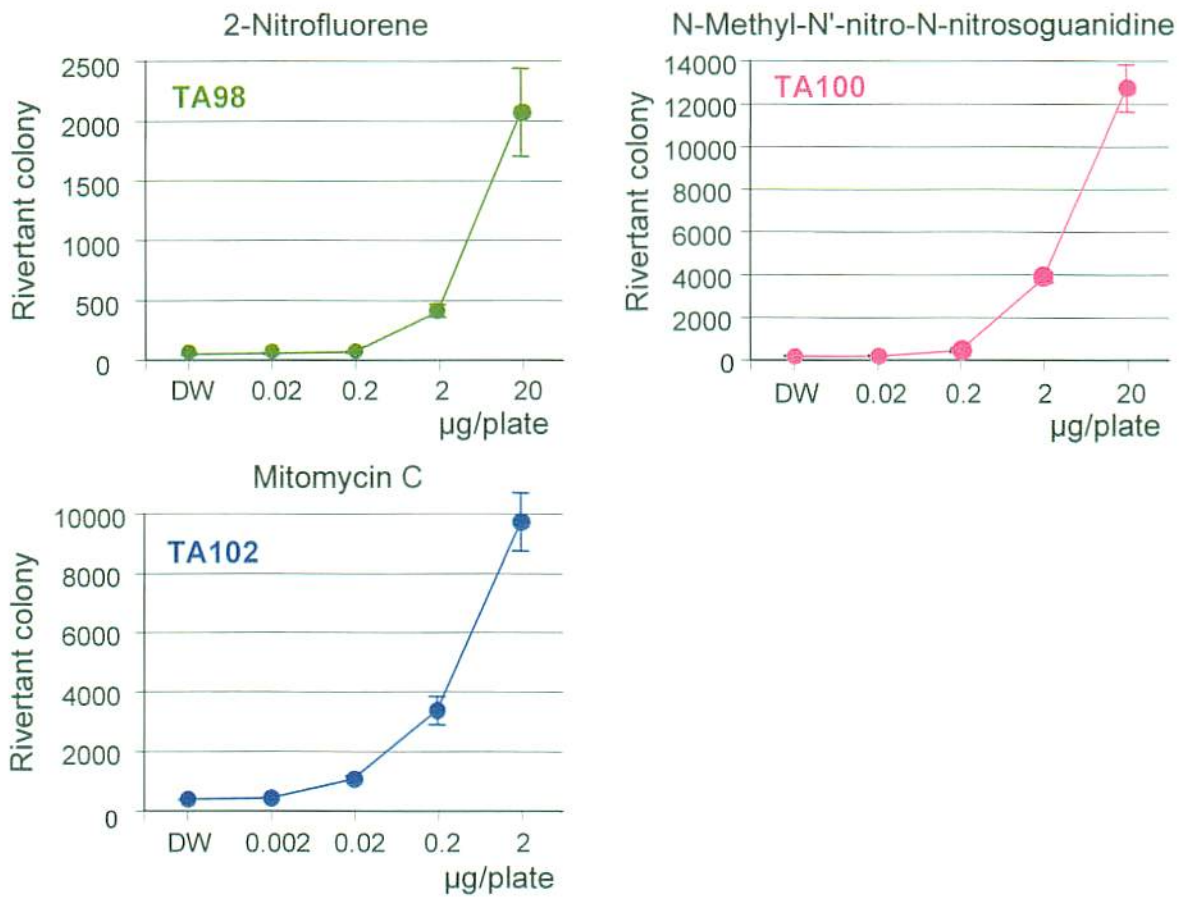


図3-13. 標準変異原性物質処理による復帰コロニー出現頻度  
 詳細は本文参照。(means ± SD, n=3)

### 3.17 S9-mix を使用しない Ames テストの変法による変異原性の評価

#### 3.17.1 ワンショットバッチ法

多くの変異原物質は動物の体内で代謝され活性化体となり、DNA に作用する。ところが細菌ではこれらの代謝経路を欠くものが多く、哺乳類の肝ホモジネートを加えることによって、マイクロゾーム酵素により、多くの変異原物質は突然変異誘起作用が認められるようになる。そこで、本来の Ames テストでは、変異原候補物質をラット肝ホモジネートを加え、代謝を活性化する必要がある。ところが、ON00 にはそれ自身反応性が高く、肝ホモジネートのマイクロゾーム酵素による代謝を活性化する必要がない。

S9-mix を使用しない Ames テストの変法で ON00 の変異原性を検討し、その結果を図3-14に示した。ON00 を含まない対照のコントロールとして、20mM NaOH のみの群では、3 菌株ともそれぞれ上記における精製水の復帰コロニー出現数とほぼ同数の復帰

コロニーが認められた。ONOO<sup>-</sup>による復帰コロニー数は、3菌株ともONOO<sup>-</sup>の濃度に依存することなくほぼ一定であった。ONOO<sup>-</sup>濃度が高くなると復帰コロニーがわずかに減少しているのは、ONOO<sup>-</sup>の殺菌作用によるものと考えられた。

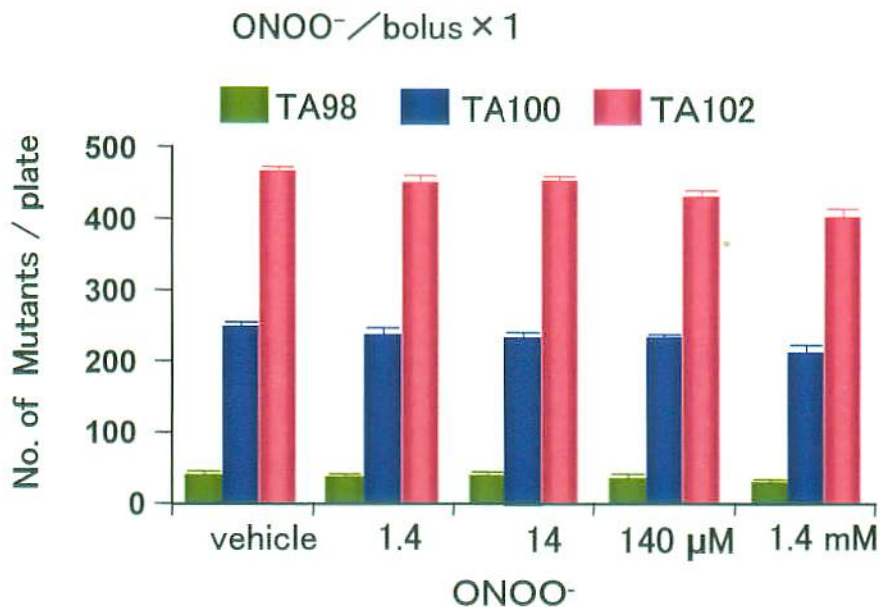


図3-14. ONOO<sup>-</sup>バッチ法添加1回時の変異原性の評価

*S. typhimurium*の各々の懸濁液( $1.5 \times 10^8$ /ml) 0.7mlにONOO<sup>-</sup>を100 μlを1度に添加し、攪拌した。(means ± SD, n=3)

### 3.17.2 ツーショットバッチ法

ONOO<sup>-</sup>の分解が極めて早いので、同反応系にONOO<sup>-</sup>を2回に分けて添加したところ、図3-15に示すように、TA 98株およびTA 100株では復帰コロニー数の増加は認められなかった。しかし、TA102株では1.4 mM以上で復帰コロニー数の著明な増加が見られ、塩基対置換型の変異を起こすことが証明された。この結果から、以下の実験にはTA 102株を使用することにした。なお、TA 102は、通常オキシラジカルへの感受性が高い株とされている。

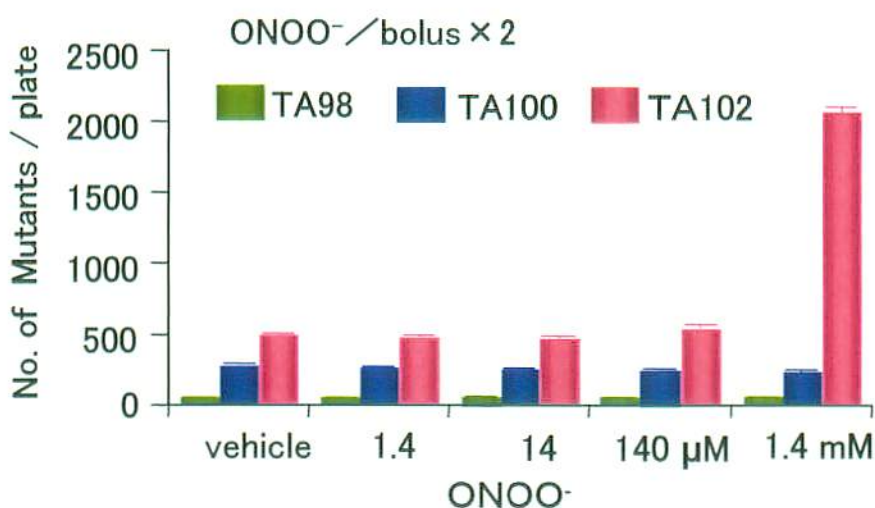


図3-15. ONOO<sup>-</sup>の2回添加時の変異原性

図3-14と同じ反応系で細菌にONOO<sup>-</sup>を50 μlずつ10分間隔で2回に分けて添加した。

(means ± SD, n=3)

### 3.18 ONOO<sup>-</sup>の一定濃度存在 (Constant flux) 下で引き起こされる復帰コロニー数と変異頻度 (洗浄菌と非洗浄菌との比較)

TA102株を一定濃度のONOO<sup>-</sup>で処理し、復帰コロニー数と変異頻度を求め、その結果を図3-16に示した。ONOO<sup>-</sup>による復帰コロニー数は棒グラフで表した。菌体を洗浄して、培地成分のないPBS系では、ONOO<sup>-</sup>の変異原性ははるかに高い値を示した(図3-16B)。これは、培養液中のアミノ酸や蛋白質等がONOO<sup>-</sup>と作用して、その変異原性を減少させたことが考えられるので、洗浄および非洗浄菌を用いて比較検討した。洗浄菌では4 μM ONOO<sup>-</sup>で復帰コロニーが著明に増加し、それ以上ではONOO<sup>-</sup>濃度が高くなるにつれて減少した。この減少はONOO<sup>-</sup>の殺菌作用によることが、後述の総コロニー数から確認できた。非洗浄菌では6 μM ONOO<sup>-</sup>で復帰コロニー数の増加がみられた(図3-16A)。

ONOO<sup>-</sup>の処理濃度ごとに復帰コロニー数と同時に総コロニー数を求めた。総コロニー数に対する復帰コロニー数から変異頻度を算出し、その結果は折れ線グラフで表した。洗浄菌では4 μM ONOO<sup>-</sup>濃度で変異頻度の上昇が見られ、8 μM ONOO<sup>-</sup>濃度では総コロニー数の21%が変異菌となっていた。非洗浄菌においても8 μM ONOO<sup>-</sup>濃度で変異頻度は3.8%であった。従って、洗浄菌と非洗浄菌の変異頻度の差は、培養菌液中に存在する

アミノ酸および蛋白質等が ONOO<sup>-</sup>の変異原性を抑制する消去剤として作用することが考えられた。

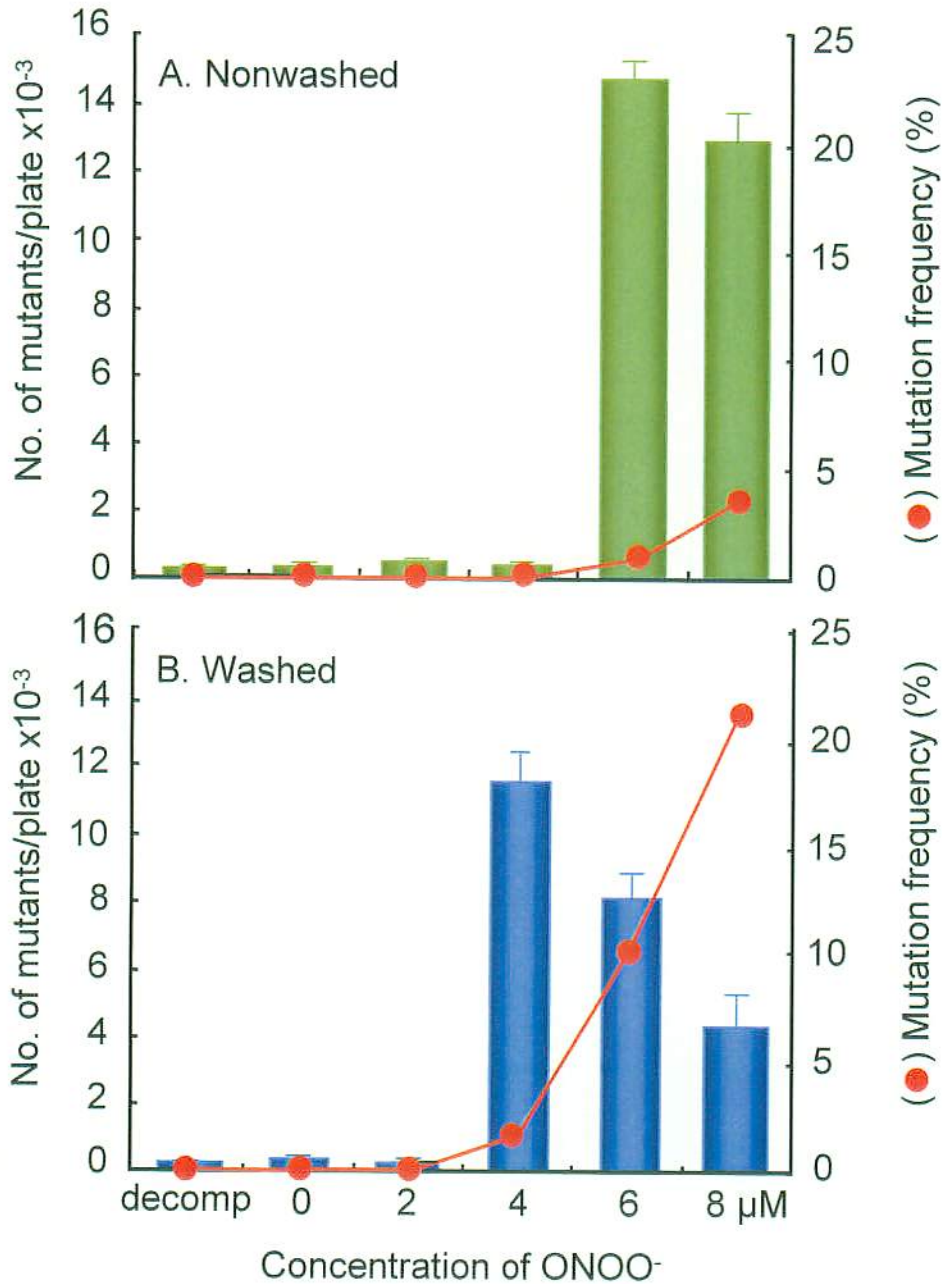


図3-16. Constant flux法でONOO<sup>-</sup>によって引き起こされる復帰コロニー数と変異頻度

実験にはTA102株を培養したままの菌液(A)と生理食塩液で3回洗浄した菌液(B)を用いて行った。復帰コロニー数は棒グラフで、変異頻度は折れ線グラフでそれぞれ表した。変異頻度(%)は総生菌数に対する復帰コロニー数より算出した。(means±SD, n=3)

### 3.19 ONO<sup>2-</sup>を変異原とした変異抑制試験

#### 3.19.1 ONO<sup>2-</sup>の変異原性に対する尿酸とエブセレンの変異抑制効果

上記の実験と関連して、ONO<sup>2-</sup>の典型的なスカベンジャーである尿酸およびエブセレン(Masumoto et al., 1996; Squadrito et al., 2000)について検討した。すなわち、同反応系における 4  $\mu$ M ONO<sup>2-</sup>濃度の条件下で、尿酸およびエブセレンを添加し、その結果を図3-17に示した。この場合では、細菌は洗浄したものを使用した。尿酸およびエブセレンともに濃度に依存してONO<sup>2-</sup>の変異原性を抑制し、特にエブセレンにおいてその傾向は著明であった。このことから、両物質がONO<sup>2-</sup>の消去剤として作用することを確認すると同時に、Ames テストの変法による変異原性は、ONO<sup>2-</sup>自体の反応によるものであることが証明された。

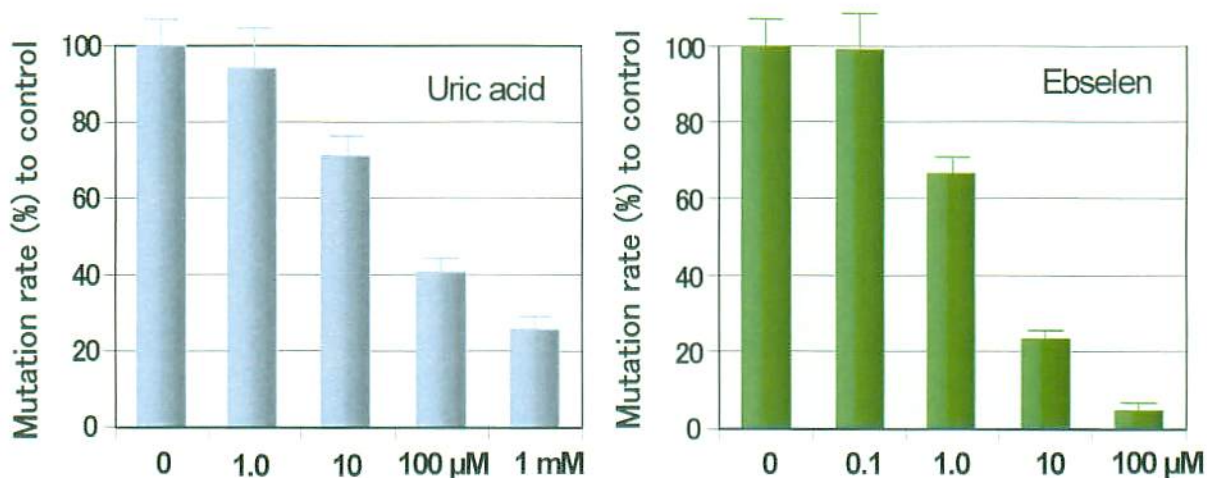


図3-17. 尿酸およびエブセレンの変異抑制効果

(means  $\pm$  SD, n=3)

### 3. 19. 2 ONOO<sup>-</sup>の変異原性に対する各種アミノ酸の変異抑制効果

培地自体がもつ ONOO<sup>-</sup>の変異原性抑制作用は、その中に存在するアミノ酸の作用に帰せられるので、各種アミノ酸あるいは栄養成分の抑制作用について検討した。その結果を図3-18に示した。L-メチオニン、L-システイン、タウリンは、コントロールの復帰コロニー(100%)に対して、100 μMの濃度で50%、1 mMの濃度で16%に抑制した。L-トリプトファンは、100 μMで76%、1 mMで17%に抑制したが、L-アスパラギン酸とL-アラニンは1 mMで、それぞれ92%、98%でほとんどその効果はなかった。このことから、これらの含硫アミノ酸および芳香族アミノ酸には、ONOO<sup>-</sup>の変異原性を中和する作用があるといえる。

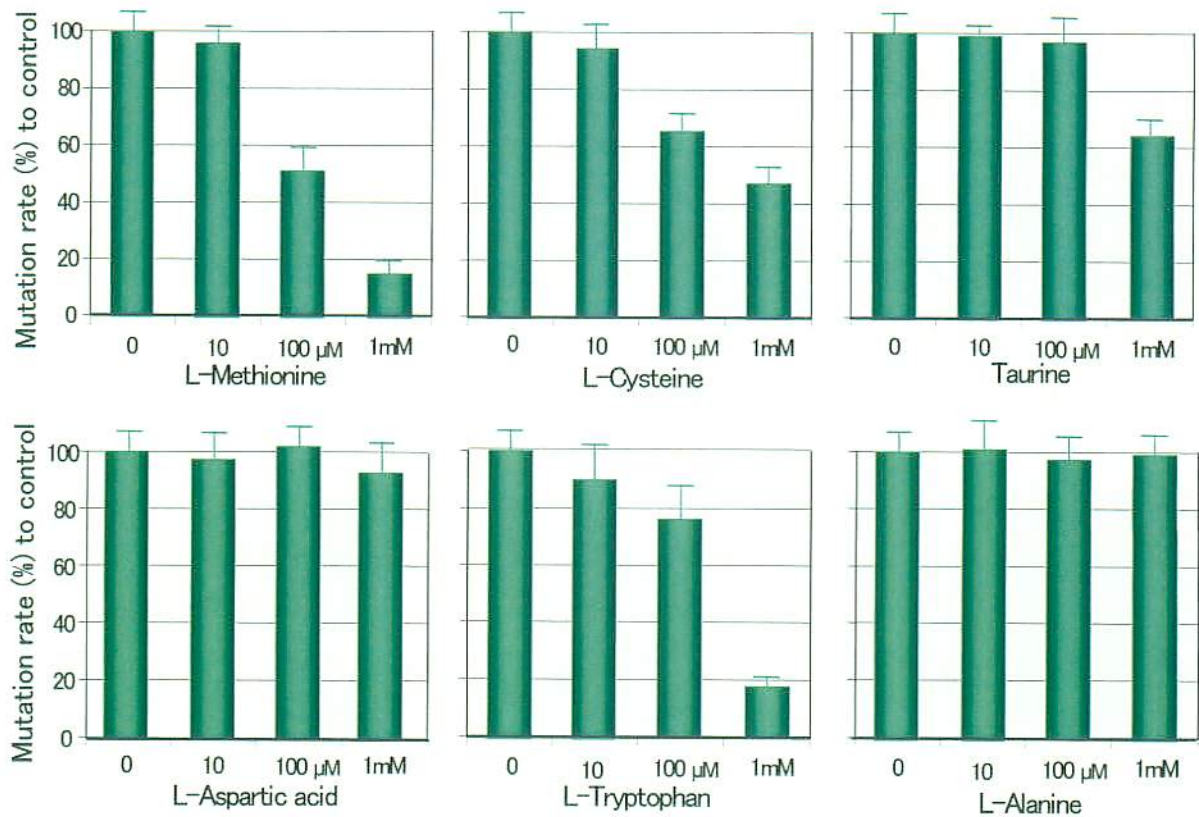


図3-18. 各種アミノ酸の変異抑制効果

(means ± SD, n=3)

### 3. 19. 3 ON00<sup>-</sup>の変異原性に対する各種ポリフェノール類およびビタミン類の抑制効果

同様に各種ポリフェノール類およびビタミン類の抗変異原活性を図3-19に表した。ポリフェノール類のルチンは10 μMで44%、100 μMで10%に、カフェインは100 μMで48%、プロトカテキン酸は1 mMで47%に変異原性を抑制した。ポリフェノール・フラボノイド類の抗変異原性は、ルチンが最も強く、次いでカフェイン、カテキン酸の順であった。抗酸化ビタミン類のα-トコフェロールは、100 μMで52%、1 mMで6%、アスコルビン酸は、1 mMで65%、β-カロテンは1 mMで55%にそれぞれ復帰コロニーを抑制した。ビタミン類の抗変異原性では、α-トコフェロールが最も強く、次いでβ-カロテン、アスコルビン酸の順であった。抗酸化作用があるポリフェノール類およびビタミン類は抗変異原活性も示した。

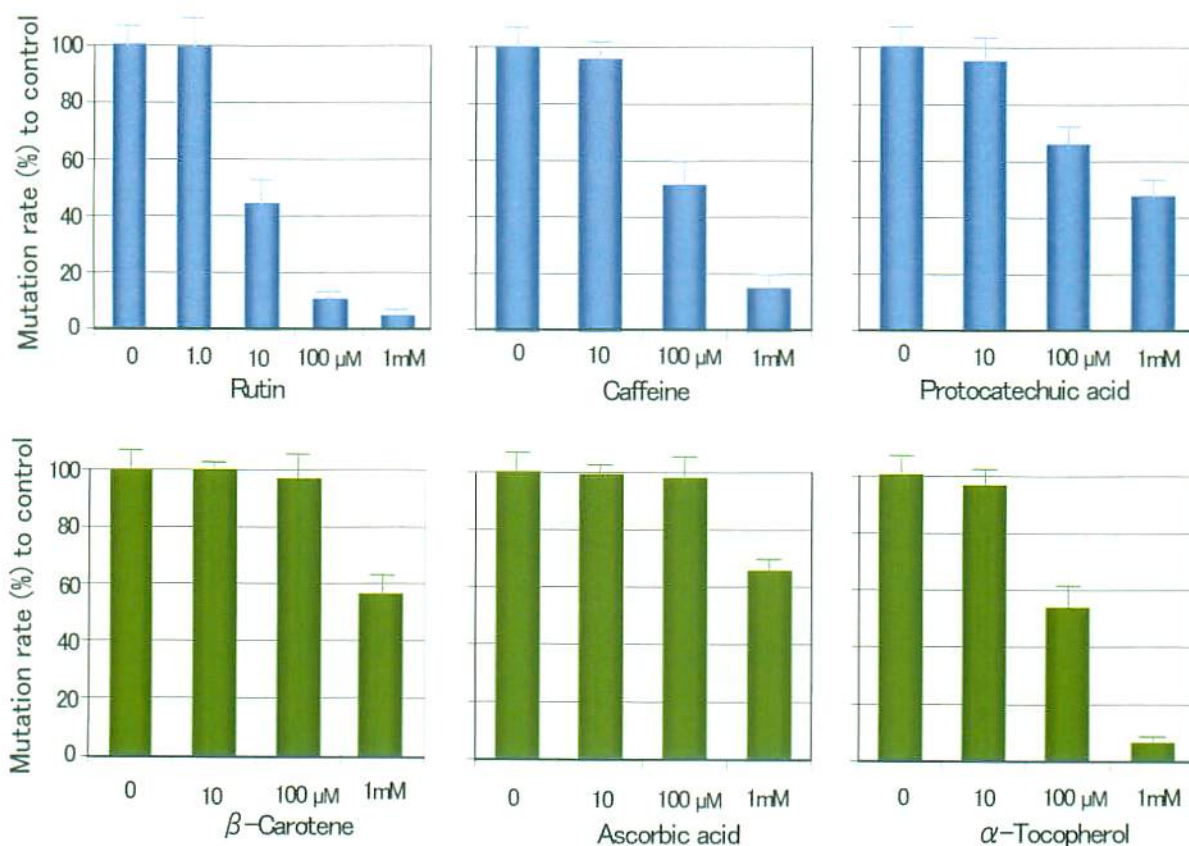


図3-19. 抗酸化作用を持つポリフェノール・フラボノイド類および抗酸化ビタミン類の変異抑制効果

(means ± SD, n=3)



### 3. 19. 4 ONOO<sup>-</sup>の変異原性に対するキャノロールおよびその他の物質の抑制効果

若松ら(1998)は、ナタネ油から強い抗ラジカル物質を見出している。その物質の化学構造は 4-vinyl-2, 6-dimethoxyphenol (図 2-7) と決定され、キャノロールと命名された。キャノロールおよびその他の物質の抗変異原活性を図 3-20 に示した。キャノロールは 0.8  $\mu\text{M}$  で 76%、8  $\mu\text{M}$  で 18% に復帰コロニー形成を抑制した。キャノロールと類似の化学構造をもつシナピン酸は 10  $\mu\text{M}$  で 43%、100  $\mu\text{M}$  で 18% まで抑制した。NaHCO<sub>3</sub> は 100  $\mu\text{M}$  で 83%、1 mM で 34% に復帰コロニー形成を減じた。このことから、これら一連の化合物のうち、キャノロールは抗変異原活性が最も強く、その能力は  $\alpha$ -トコフェロールの 10 倍以上であった。

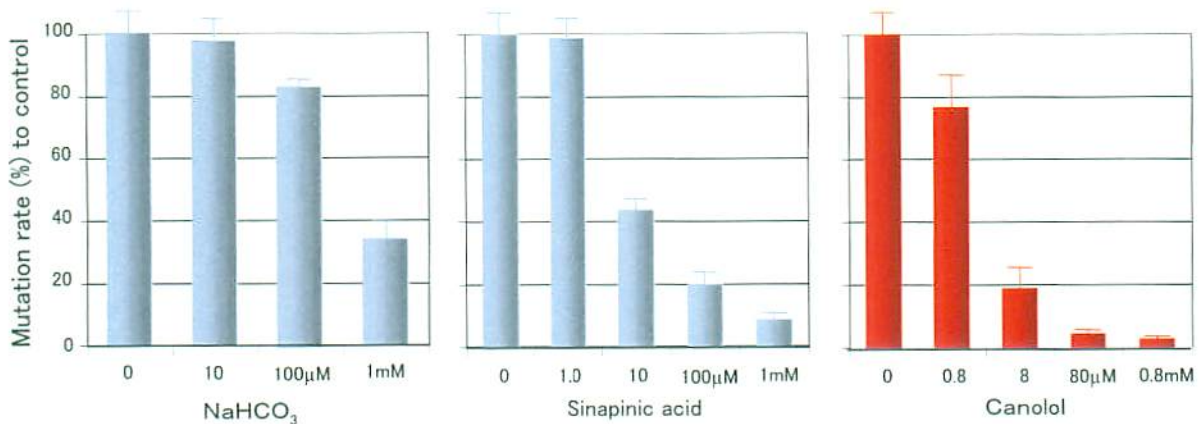


図 3-20. キャノロールおよびその他の物質の変異抑制効果  
(means  $\pm$  SD, n=3)

## 第4章 考察

生体内で生成される反応性窒素分子種の中で細胞障害として最も重要視されているのは、一酸化窒素(NO)とスーパーオキシド( $O_2^{\cdot-}$ )が反応して生成されるパーオキシナイトライト( $ONOO^-$ )である。NOと $O_2^{\cdot-}$ は非常に速く反応するため、生体内ではほぼ拡散律速で生成する(Beckman et al., 1996; Rubbo, 1996)。この反応速度はスーパーオキシド・ディスムターゼ(SOD)が $O_2^{\cdot-}$ を $H_2O_2$ へと変換する反応より早い。従って、生体内でNOと $O_2^{\cdot-}$ が同時に生成される場では、 $ONOO^-$ が比較的効率よく生成される。実際、インフルエンザウイルス感染病態においては肺内NO産生が亢進する時期と並行して、肺胞内キサンチンオキシダーゼ活性が著明に高まり、局所で酸素ラジカル( $O_2^{\cdot-}$ )が生成されることが確認されており(Oda et al., 1989; Akaike et al., 1990)、 $ONOO^-$ が産生されやすい環境になっていると考えられている。

$ONOO^-$ は酸素ラジカルと同様、酸化ストレスをもたらすオキシダントであるが、酸化反応以外にも、アミノ酸、特に蛋白質中のチロシン残基やトリプトファン残基のニトロ化をもたらす(Rubbo et al., 1996)。また、 $ONOO^-$ は核酸塩基、特にグアニンの8位のニトロ化や水酸化を起こす(Yermilov et al., 1995)。さらに、 $ONOO^-$ のニトロ化反応は、二酸化炭素により促進されることが明らかにされている(Uppu et al., 1996)。また、 $ONOO^-$ は中性pH域において、OH $^{\cdot}$ よりは安定であるがその寿命は数秒であり、OH $^{\cdot}$ ラジカルよりは、より安定的な生物活性を発揮し、多彩な生理活性を有することがわかっている(Pryor et al., 1995)。

Hibbsら(1988)は、NOの抗菌作用は主として食細胞により貪食された食細胞内の細菌に対して作用するものであると論じている。ところがNO自身にはそのような殺菌作用はほとんどなく、むしろ $ONOO^-$ が強力な殺菌作用を有していることが、これまでおよび今回の一連の実験から確認できた(Miyamoto et al., 2000; Kuwahara et al., 2000)。従って、NOに由来する殺菌作用の本体は、図3-5および図3-6Aに示したようにNOの酸化生成産物である $ONOO^-$ であると言える。

*Helicobacter pylori*はヒトの胃の中で持続的に感染することができ、そこでは好中球や単球のような食細胞の浸潤を伴った慢性の活動性炎症を引き起こす。*H. pylori*は食細胞の抗菌作用に対する防御システムを持っているかも知れない。そこでわれわれは*H. pylori*のコロニー形成に必須要因として知られている尿素からの $CO_2$ および $NH_3$

を産生する *H. pylori* ウレアーゼの役割に焦点を絞り、NO 由来の代謝産物 ONOO<sup>-</sup> に対する *H. pylori* の防御機構について研究した。*H. pylori* の生存は、1.0 μM ONOO<sup>-</sup> を持続的に暴露させると、時間依存的に減少した。例えば尿素が存在しない条件で、5 分間処理することによって生存細菌は約 0.1% まで減少した。*H. pylori* に対する ONOO<sup>-</sup> の殺菌作用は、ウレアーゼの基質である尿素 (10 mM) を加えることによって明らかに減弱された。一方、ウレアーゼ欠損株である *H. pylori* HPT209 株および *H. pylori* と同じ微好気性であるがウレアーゼ活性のない *Campylobacter jejuni* は、尿素を添加しても ONOO<sup>-</sup> による殺菌作用に影響は見られなかった。このことは尿素自身には、ONOO<sup>-</sup> の殺菌作用を減弱する能力がないことを示している。

このような尿素の保護的効果は、外因性ウレアーゼの添加によっても同様であった。さらに、ウレアーゼの特異的インヒビターである 10 mM *N*-(diaminophosphinyl)-4-fluorobenzamide (flurofamide) を添加することにより、ほとんど完全にその保護効果はなくなった。ONOO<sup>-</sup> の殺菌作用は NaHCO<sub>3</sub> (20 mM) の添加によっても抑制されたが、NH<sub>3</sub> (20 mM) にはそのような効果はなかった。従って、広く信じられている pH の中性化による生存率が上がるとする説は否定される。さらにまた、この実験によって生ずる NH<sub>3</sub> の量では、pH は 0.1~0.2 単位しか変動せず、NH<sub>3</sub> の pH 保持は殺菌防御には寄与しないといえる。

さらに、ONOO<sup>-</sup> で処理された後の *H. pylori* のニトロチロシンの定量は、電気化学的検出器を連結した HPLC (high performance liquid chromatography) によって検討した。その結果、ONOO<sup>-</sup> は *H. pylori* 菌体のチロシンをニトロ化したが、同反応系に尿素あるいは NaHCO<sub>3</sub> を添加することにより、チロシンのニトロ化は明らかに減少した。これらの結果は、*H. pylori* ウレアーゼが ONOO<sup>-</sup> の殺菌作用を減弱することによって細菌の保護システムとして機能しており、ウレアーゼによって産生された CO<sub>2</sub>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> が、胃粘膜で細菌が感染し続けることを助長していることを示唆している。*H. pylori* は ONOO<sup>-</sup> の作用を弱めることができるウレアーゼのようなシステムを保有することにより、*H. pylori* の感染した胃の中で容易には殺菌されずに持続的にコロニーを形成し、かつ増殖を促進していると考えられる。

チロシンを含む化合物の ONOO<sup>-</sup> 依存的ニトロ化は CO<sub>2</sub> の存在で高まるとの報告があるが (Lemercier et al., 1997; Watanabe et al., 1998)、*H. pylori* ニトロチロシンの形成は尿素や NaHCO<sub>3</sub> の添加によって抑制された (図 3-11B)。この結果は細菌のウ

レアーゼによって産生された  $\text{CO}_2$  が、細菌の構成成分によって  $\text{ONOO}^-$  の反応性を妨害し、そして細菌細胞の外側でその分解を促進したことを示唆している。このことは非常に重要である。*H. pylori* のウレアーゼは、図 4-1 に示すように、細菌細胞内ばかりでなく細菌の表面にも局在している (Phadnis et al., 1996)。われわれの実験系において、細菌の表面に結合したウレアーゼは、 $\text{ONOO}^-$  の分解にも重要な役割を演じていると思われる (図 3-10)。結論として、*H. pylori* ウレアーゼは  $\text{CO}_2$  の産生を経由して、 $\text{ONOO}^-$ -carbonate complex となり、これが  $\text{ONOO}^-$  の分解と反応性を高め、それによって  $\text{ONOO}^-$  の細胞毒性を減ずる役割を演じており、このことが生体内で持続的な感染に寄与していることが示唆される。

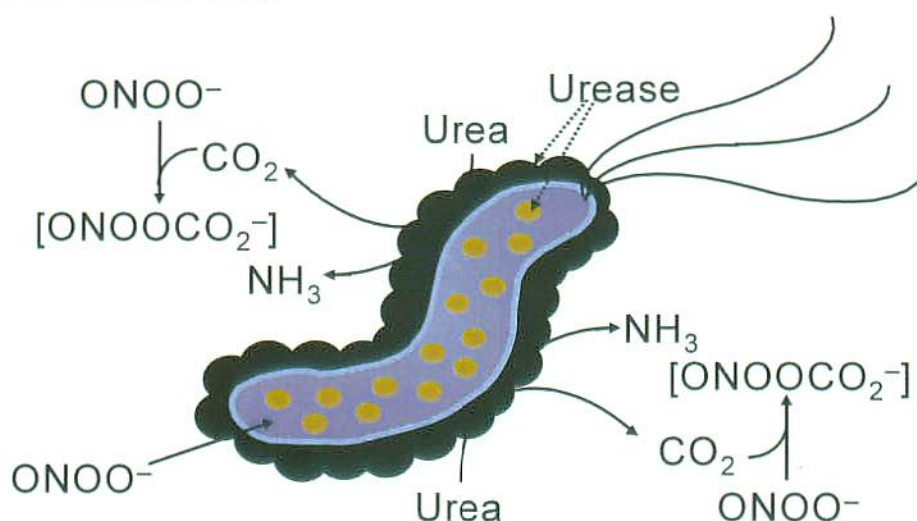


図 4-1.  $\text{ONOO}^-$  に対する防御システムとしての *H. pylori* のウレアーゼ

生理的濃度の  $1.0 \mu\text{M}$   $\text{ONOO}^-$  を *H. pylori* に 10 分間暴露させることにより、*H. pylori* の薬剤耐性変異菌株の出現は、約 7 倍の増加を示した。 $\text{ONOO}^-$  はやや酸性側の生理的 pH 域ではプロトン化され、 $\text{ONOOH}$  (peroxynitrous acid) の生成を経て、最終的には硝酸イオン ( $\text{NO}_3^-$ ) になる。 $\text{ONOO}^-$  の生成以後の反応の過程で、特に  $\text{ONOO}^-$  が  $\text{HNO}_3$  ( $\text{NO}_3^-$ ) へと変換する間に、反応性の高い中間体が生じ、これがチオール化合物などの酸化をもたらすものと考えられている (Beckman et al., 1996)。 $\text{ONOO}^-$  は DNA あるいは RNA のどちらかを切断し、また同時にグアニンの 8 位のニトロ化および水酸化をもたらす。

*H. pylori* の場合、23S rRNA 遺伝子の 2142 番目と 2143 番目は変異が最も起こりやすい場所である。グアニンは  $\text{ONOO}^-$  によって変異を受けやすいのにもかかわらず、今回の実験結果は、多くの CLR 耐性変異株でアデニンのポイントミューテーションが

見られた。すなわち A から G へあるいは A から T への変異である。これらの変異は臨床材料から分離された CLR 耐性 *H. pylori* の報告と一致していた (Versalovic et al., 1997; Taylor, 2000; Van Doorn et al., 2001)。しかしながら、2695 番目の C から G への変異は新しい変異個所で、また、2604 番目でのグアニンの挿入も初めての報告である。当研究室では、ONOO<sup>-</sup> がグアニンのニトロ化を起こすばかりでなく、また、アデニンを脱プリンすること、およびデオキシリボースのリン酸エステル結合を切断することを報告している (Kanazawa et al., 2000; Sawa et al., 2000)。この過程で DNA 修復過程期間中にグアニンの挿入を起こすのかも知れない。

さらに、前田らは NADPH と酸素、その上レドックス触媒酵素の 1 つすなわち、チトクローム NADPH-P450 還元酵素、NO 合成酵素 (誘導型、神経型、内皮型のいずれかのアイソザイム) およびチトクローム NADPH b5 還元酵素によって、8-ニトログアノシンはヘテロサイクリックアミンと同様にスーパーオキシド発生の効率的な触媒となることを見出した (Maeda et al., 1999; Sawa et al., 2000)。すなわち、1 モルの 8-ニトログアノシンは何倍ものスーパーオキシド ( $O_2^{\cdot -}$ ) を生成することができる。その  $O_2^{\cdot -}$  はスーパーオキシド・ディスムターゼによって過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) に変換する。この  $H_2O_2$  は反応性酸素種 (ROS) の中で最も反応性の強い水酸化ラジカルの形成を生成する。この結果は炎症局所がフリーラジカル産生のホットスポットであり、炎症と発癌を考える上で 8-ニトログアノシン生成が重要な意味を有している。

センダイウイルス感染モデルにおける最近の研究で、A→G, G→A, U→C, および C→U へのトランスバージョン、A→U, A→C およびその他のトランジションを示した (Yoshitake et al., 2004)。それゆえ、A→G のトランジションはもちろんのこと A→T あるいは C→G のトランスバージョンの変異は驚くことではない。

炎症反応局所では、感染する微生物の除去のために有効に作用する反応性の強いフリーラジカルを発生する (Maeda et al., 1991; Akaike et al., 1998)。しかしながら、それは、変異細菌の出現頻度を高め、薬剤耐性あるいは生存・適応のための他の機能の獲得のいずれかを引き起こすことになる。

*Salmonella* 菌を用いた Ames テストの変法によって、ONOO<sup>-</sup> の変異原性は TA 98 あるいは TA 100 に比べて TA 102 株が最も感受性が高かった (図 3-15)。それゆえ、Ames テストの変法を用いた実験には TA 102 株を使用した。今回の実験には、S9-mix あるいは肝ホモジネートは用いなかった。ONOO<sup>-</sup> はそれ自身反応性がすでに高く、S9-mix あ

るいは肝ホモジネートのミクロゾーム酵素による活性化を要しない。ONOO<sup>-</sup>由来の変異頻度は、ONOO<sup>-</sup>を1回で加えた場合は変化がなく、2回に分けて添加した場合は濃度依存的にやや増加した。さらに、ONOO<sup>-</sup>の濃度を長時間にわたって一定に維持する Constant flux 系を用いた場合、生体内の病態局所にみられる 4~8 μM の範囲内では、高率の変異原性がみられた。ONOO<sup>-</sup>を20分間 TA 102 に反応させたところ、ONOO<sup>-</sup>の濃度に依存して変異頻度は増加し、8 μM ONOO<sup>-</sup>では総生菌数の 21% が変異菌となっていた(図3-16)。培養液中の菌体を生理食塩水で洗浄した前後の細菌を用いた結果が示すように、ブイオンには変異に対しての保護効果があることから、我々は ONOO<sup>-</sup>と反応しその結果抑制を起こすかもしれない培地中の各種アミノ酸および天然あるいは合成由来の抗酸化化合物について検討した。ONOO<sup>-</sup>の消去剤として知られている尿酸およびエブセレンは、予期されたように変異を抑制した(図3-17)。各種アミノ酸や芳香化合物の中で、チオール化合物(システイン)およびメチルチオール化合物(メチオニン)は ONOO<sup>-</sup>に由来する変異に対する抑制効果が認められた(図3-18)。これは、システインおよびメチオニンが化学構造中の硫黄(SH)の還元作用によるものと考えられた。ポリフェノールの中で、ルチンはもっとも能力が高く、約 10 μM で変異の 50% を抑制した。今回実験に用いた各種物質の中で、キャノロールは最も変異抑制作用が強く、8 μM で変異を 18% まで抑制した。これは ONOO<sup>-</sup>の消去剤であるエブセレンに匹敵あるいはそれ以上の能力を持っていた。また、キャノロールは過酸化脂質とヘミンから発生したアルキルパーオキシドの消去作用およびアルキルパーオキシドが引き起こす細胞死に対する保護作用には非常に効果的であった(Akaike et al., 1996; Kuwahara et al., 2004)。一方、抗酸化作用があるビタミン類も抗変異原活性を示した。ビタミン類のその能力は、α-トコフェロールが最も強く、次いでβ-カロテン、アスコルビン酸の順であった。

今回、ONOO<sup>-</sup>を変異原とした変異抑制試験法によって、食品中の各種抗酸化成分のうち、ナタネ油中のキャノロールおよび植物食品(そば)中に含まれるルチンなどは、ONOO<sup>-</sup>による変異に対して特に強い抗変異原活性を有することを見いだした。

## 第5章 結語

本研究では、細菌、特に *H. pylori*, *S. typhimurium* を中心に ONOO<sup>-</sup>の殺菌作用およびその変異原性について検討した。まず、各種細菌に対する ONOO<sup>-</sup>の殺菌作用を Constant flux 法を適用することによって用量と時間依存性を検討することができた。グラム陰性菌の方が陽性菌より、ONOO<sup>-</sup>の殺菌作用に対する感受性が高く、とりわけ、*H. pylori*は ONOO<sup>-</sup>の殺菌作用に高い感受性を示した。

*H. pylori* が慢性胃炎などにおいて、感染が持続するメカニズムを解明するために、*H. pylori* が有するウレアーゼの役割について検討した。ONOO<sup>-</sup>による *H. pylori* の殺菌やニトロチロシンの生成は尿素の添加によって抑制された。すなわち、*H. pylori* のウレアーゼは CO<sub>2</sub> を生成し、その CO<sub>2</sub> は ONOO<sup>-</sup> と複合体を形成し、それが ONOO<sup>-</sup> の細胞毒性に対する防御の役割を演じており、このことが生体内で持続的な感染に寄与していることが示唆された。

*H. pylori* に対して、ONOO<sup>-</sup> が変異を促進するかどうかを Constant flux 法により検討した。変異の指標は、クラリスロマイシン (CLR) に対する薬剤耐性を用いた。CLR を含まないリン酸緩衝食塩液で処理した場合に比べて、生理的濃度 (1.0 μM) の ONOO<sup>-</sup> を *H. pylori* に暴露させると、薬剤耐性変異菌株の出現は約 7 倍の増加を示した。シーケンス解析の結果、CLR なしのリン酸緩衝食塩液で処理した対照群の *H. pylori* は、A2142G (2 菌株) と A2143G (2 菌株) 変異が得られたが、1.0 μM ONOO<sup>-</sup> で処理した場合は A2142G (7 菌株)、A2143G (4 菌株) 以外に A2142T (1 菌株)、C2695G (2 菌株)、A2142G 変異に加えて 2604 部位に G の挿入が認められた。このことは、炎症反応は感染する細菌除去のために有効に作用する反応性の強いフリーラジカルを発生するが、このことが薬剤耐性あるいは生存と適応のための他の機能を備えた細菌を誘導することになるのかもしれない。

最後に、Ames テストの変法を用いて ONOO<sup>-</sup> の変異原性を直接的に検討した。ONOO<sup>-</sup> の濃度を一定に維持する反応系を用いた場合、サルモネラ菌 TA102 は 4~8 μM の範囲内で著明な変異が見られた。ONOO<sup>-</sup> を変異原とした変異抑制試験では、システインおよびメチオニン は ONOO<sup>-</sup> に由来する変異に対して抑制効果が認められた。抗酸化作用のあるフラボノイドおよびビタミン類も抗変異原性を示した。今回実験に用いた物質の中で、ナタネ油由来のキャノロールは最も変異抑制作用が強く、ONOO<sup>-</sup> の消去剤として知られ

ているエブセレンと同等以上の能力を持っていた。今回、食品中の各種抗酸化活性成分のうち、ナタネ油中のキャノロールおよび植物食品中のルチンなどは、ONOO<sup>-</sup>による変異に対して特に強い抗変異原活性を有することを見いだした。これらの食品由来の抗変異原性物質が、細菌の薬剤耐性、細胞の変異あるいは発ガンの抑制に応用されることが期待される。



## 参考文献

- 1) Akaike T, Ando M, Oda T, Doi T, Ijiri S, Araki S, Maeda H. (1990). Dependence on O<sub>2</sub><sup>-</sup> generation by xanthine oxidase of pathogenesis of influenza virus infection in mice. *J Clin Invest.* 85, 739-745.
- 2) Akaike T, Noguchi Y, Ijiri S, Setoguchi K, Suga M, Zheng YM, Dietzschold B, Maeda H. (1996). Pathogenesis of influenza virus-induced pneumonia: involvement of both nitric oxide and oxygen radicals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 2448-53.
- 3) Akaike T, Suga M, Maeda H. (1998). Free radicals in viral pathogenesis: molecular mechanisms involving superoxide and NO. *Proc Soc Exp Biol Med*, 217, 64-73.
- 4) Akaike T, S Fujii, A Kato, J Yoshitake, Y Miyamoto, T Sawa, S Okamoto, M Suga, M Asakawa, Y Nagai, H Maeda. (2000). Viral mutation accelerated by nitric oxide production during infection in vivo. *FASEB J*, 14: 1447-1454.
- 5) Akaike T, Okamoto S, Sawa T, Yoshitake J, Tamura F, Ichimori K, Miyazaki K, Sasamoto K, Maeda H. (2003). 8-Nitroguanosine formation in viral pneumonia and its implication for pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100, 685-690.
- 6) Ames B N, McCann J, Yamasaki E. (1975). Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat Res* 31, 347-364.
- 7) Asaka M, Takeda H, Sugiyama T, Kato M. (1997). What role does *Helicobacter pylori* play in gastric cancer ? *Gastroenterology*, 113, S56-60.

- 8) Beckman J S, Beckman T W, Chen J, Marshall P A, Freeman B A. (1990). Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87, 1620-1624.
- 9) Beckman J S. (1996). Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. *Chem Res Toxicol*, 9, 836-844.
- 10) Beckman J S, Koppenol W H. (1996). Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am J Physiol*, 271, C1424-C1437.
- 11) Beckman J S. (2002). Protein tyrosine nitration and peroxynitrite. *FASEB J*, 16, 1144.
- 12) Blaser J. (1990). *Helicobacter pylori* and the pathogenesis of gastroduodenal inflammation. *J Infect Dis*, 161, 626-633.
- 13) Buettner G R, Jurkiewicz B A. (1996). Catalytic metals, ascorbate and free radicals: combinations to avoid. *Radiat Res*, 145, 532-541.
- 14) Castro L, Alvarez M N, Radi R. (1996). Modulatory role of nitric oxide on superoxide-dependent luminol chemiluminescence. *Arch Biochem Biophys*. 333, 179-188.
- 15) Crow J P. (1997). Dichlorodihydrofluorecein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite in vitro: Implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species. *Nitric Oxide Biol Chem*, 1, 145-157.
- 16) Dixon M F. (1994). Pathophysiology of *Helicobacter pylori* infection. *Scand J Gastroenterol*, 201, 7-10.

- 17) Doi T, Ando M, Akaike T, Suga M, Sato K, Maeda H. (1993 ). Resistance to nitric oxide in *Mycobacterium avium* complex and its implication in pathogenesis. *Infect Immun*, 61, 1980-1989.
- 18) Fang F C. (1997). Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. *J Clin Invest*, 99, 2818-2825.
- 19) Fennell C L, Totten P A, Quinn T C, Patton D L, Holmes K K, Stamm W E. (1984). Characterization of Campylobacter-like organisms isolated from homosexual men. *J Infect Dis*, 149, 58-66.
- 20) Fu S, Ramanujam K S, Wong A, Fantry G T, Drachenberg C B, James S P, Meltzer S J, Wilson K T. (1999). Increased expression and cellular localization of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase 2 in *Helicobacter pylori* gastritis. *Gastroenterology*, 116, 1319-1329.
- 21) Goto T, Haruma K, Kitadai Y, Ito M, Yoshihara M, Sumii K, Hayakawa N, Kajiyama G. (1999). Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in gastric mucosa of gastric cancer patients. *Clin Cancer Res*, 5, 1411-1415.
- 22) Hahm K B, Lee K J, Choi S Y, Kim J H, Cho S W, Yim H, Park S J, Chung M H. (1997). Possibility of chemoprevention by the eradication of *Helicobacter pylori*: oxidative DNA damage and apoptosis in *H. pylori* infection. *Am J Gastroenterol*, 92, 1853-1857.
- 23) Hibbs J B, Taintor R R, Varin Z, Rachlin E M. (1998). Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun*, 157, 87-94.

- 24) Honda S, Fujioka T, Tokieda M, Satoh R, Nishizono A, Nasu M. (1998). Development of *Helicobacter pylori*-induced gastric carcinoma in Mongolian gerbils. *Cancer Res.* 58, 4255-4259.
- 25) Hurst J K, Lymar S V. (1997). Toxicity of peroxyxynitrite and related reactive nitrogen species toward *Escherichia coli*. *Chem Res Toxicol.* 10, 802-810.
- 26) Ischiropoulos H. (1998). Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. *Arch Biochem Biophys.* 356, 1-11.
- 27) Kanazawa A, Sawa T, Akaike T, Maeda H. (2000). Formation of abasic sites in DNA by *t*-butyl peroxy radicals: Implication for potent genotoxicity of lipid peroxy radicals. *Cancer Lett.* 156, 51-55.
- 28) Kaplan S S, Lancaster J R, Basford R E, Simmons R L. (1996). Effect of nitric oxide on staphylococcal killing and interactive effect with superoxide. *Infect Immun.* 64, 69-76.
- 29) Keefer L K, Nims R W, Davies K M, Wink D A. (1996). "NONOates" (1-substituted diazen-1-ium-1,2-diolates) as nitric oxide donors: convenient nitric oxide dosage forms. *Methods Enzymol.* 268, 281-293.
- 30) Koppenol W H, Kissner R, Beckman J S. (1996). Synthesis of peroxyxynitrite: To go with the flow or on solid grounds? *Methods Enzymol.* 269, 296-302.
- 31) Kusters J G, Gerrits M M, Van Strijp J A, Vandenbroucke-Grauls C M. (1997). Coccoid forms of *Helicobacter pylori* are the morphologic manifestation of cell death. *Infect Immun.* 65, 3672-3679.

- 32) Kuwahara H, Miyamoto Y, Akaike T, Kubota T, Sawa T, Okamoto S, Maeda H. (2000). *Helicobacter pylori* urease suppresses bactericidal activity of peroxyxynitrite via carbon dioxide production. *Infect Immun*, 68, 4378-4383.
- 33) Kuwahara H, Kanazawa A, Wakamatu D, Morimura S, Kida K, Akaike T, Maeda H. (2004). Antioxidative and antimutagenic activities of 4-vinyl-2,6-dimethoxyphenol (canolol) isolated from canola oil. *J Agric Food Chem*, 52, 4380-4387.
- 34) Lemercier J N, Padmaja S, Cueto R, Squadrito G L, Uppu R M, Pryor W A. (1997). Carbon dioxide modulation of hydroxylation and nitration of phenol by peroxyxynitrite. *Arch Biochem Biophys*. 345, 160-170.
- 35) Levin D E, Holstein M, Christman M F, Schwiens E A, Ames B N. (1982). A new *Salmonella* tester strain (TA102) with A/T base pairs at the site of mutation detects oxidative mutagens. *Proc Natl Acad Sci USA*, 79, 7445-7449.
- 36) Lyman S V, Hurst J K. (1998). CO<sub>2</sub>-catalyzed one-electron oxidations by peroxyxynitrite: properties of the reactive intermediate. *Inorg Chem*, 37, 294-301.
- 37) Maeda H, Akaike T. (1991). Oxygen free radicals as pathogenic molecules in viral diseases. *Proc Soc Exp Biol Med*, 198, 721-7.
- 38) Maeda H, Sawa T, Yubisui T, Akaike T. (1999). Free radical generation from heterocyclic amines by cytochrome b5 reductase in the presence of NADH. *Cancer Lett*, 143, 117-21.
- 39) Masumoto H, Sies H. (1996). The reaction of ebselen with peroxyxynitrite. *Chem Res Toxicol*. 9, 262-267.

- 40) Makristathis A, Rotika E, Labigne A, Willinger B, Rotter M L, Hirschl A M. (1998). Highly significant role of *Helicobacter pylori* urease in phagocytosis and production of oxygen metabolites by human granulocytes. *J Infect Dis.* 177, 803-806.
- 41) Mannick E E, Bravo L E, Zarama G, Realpe J L, Zhang X J, Ruiz B, Fonham E T, Mera R, Miller M J, Correa P. (1996). Inducible nitric oxide synthase, nitrotyrosine, and apoptosis in *Helicobacter pylori* gastritis: effect of antibiotics and antioxidants. *Cancer Res.* 56. 3238-3243.
- 42) Maron D M, Ames B N. (1983). Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res.* 113, 173-215.
- 43) Marshall BJ, Warren JR. (1984). Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet.* 16, 1311-1315.
- 44) Marshall B J, Barret L J, Prakash C, McCallum R W, Guerrant R L. (1990). Urea protects *Helicobacter (Campylobacter) pylori* from the bactericidal effect of acid. *Gastroenterology.* 99, 697-702.
- 45) Miyamoto Y, Akaike T, Alam MS, Inoue K, Hamamoto T, Ikebe N, Yoshitake J, Okamoto T, Maeda H. (2000). Novel functions of human alpha(1)-protease inhibitor after S-nitrosylation: inhibition of cysteine protease and antibacterial activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 267, 918-923.
- 46) Nakamura H, Yoshiyama H, Takeuchi H, Mizote T, Okita K, Nakazawa T. (1998). Urease plays an important role in the chemotactic motility of *Helicobacter pylori* in a viscous environment. *Infect Immun.* 66, 4832-4837.
- 47) Nathan C F. (1997). Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *J. Clin. Invest.* 100, 2417-2423.

- 48) Neithercut W D, Nujumi A M, McColl K E. (1993). Measurement of urea and ammonium concentrations in gastric juice. *J Clin Pathol*, 46, 462-464.
- 49) Nielsen H, Andersen L P. (1992). Activation of human phagocyte oxidative metabolism by *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*, 103, 1747-1753.
- 50) Nomura A, Stemmermann GN, Chyou PH, Kato I, Perez-Perez GI, Blaser MJ. (1991). *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. *N Engl J Med*, 325, 1132-1136.
- 51) Oda T, Akaike T, Hamamoto T, Suzuki F, Hirano T, Maeda H. (1989). Oxygen radicals in influenza-induced pathogenesis and treatment with pyran polymer-conjugated SOD. *Science*, 244, 974-976.
- 52) Okamoto T, Akaike T, Nagano T, Miyajima S, Suga M, Ando M, Ichimori K, Maeda H. (1997). Activation of human neutrophil procollagenase by nitrogen dioxide and peroxynitrite: a novel mechanism for procollagenase activation involving nitric oxide. *Arch Biochem Biophys*. 342, 261-274.
- 53) Osato M S, Reddy R, Reddy S G, Penland R L, Graham D Y. (2001). Comparison of the Etest and the NCCLS-approved agar dilution method to detect metronidazole and clarithromycin resistant *Helicobacter pylori*. *Int J Antimicrob Agents*, 17, 39-44.
- 54) Phadnis S H, Parlow M H, Levy M, Ilver D, Caulkins C M, Connors J B, Dunn B E. (1996). Surface localization of *Helicobacter pylori* urease and a heat shock protein homolog requires bacterial autolysis. *Infect Immun*, 64, 905-912.
- 55) Pignatelli B, Bancel B, Esteve J, Malaveille C, Calmels S, Correa P, Patricot L M, Laval M, Lyandrat N, Ohshima H. (1998). Inducible nitric oxide synthase, anti-oxidant enzymes and *Helicobacter pylori* infection in gastritis and gastric

- precancerous lesions in humans. *Eur J Cancer Prev*, 7, 439-447.
- 56) Pryor W A, Squadrito G L. (1995). The chemistry of peroxynitrite: A product from the reaction of nitric oxide and superoxide. *Am J Physiol*, 268, L699-L722.
- 57) Rubbo H. (1996). Nitric oxide regulation of tissue free radical injury. *Chem Res Toxicol*, 9,809-820.
- 58) Sawa T, Akaike T, Maeda H. (2000). Tyrosine nitration by peroxynitrite formed from nitric oxide and superoxide generated by xanthine oxidase. *J Biol Chem*, 275, 32467-32474.
- 59) Sawa T, Akaike T, Ichimori K, Akuta T, Kaneko K, Nakayama H, Stuehr D J, Maeda H. (2003). Superoxide generation mediated by 8-nitroguanosine, a highly redox-active nucleic acid derivative. *Biochem Biophys Res Commun*, 311, 300-306.
- 60) Squadrito G L, Cueto R, Splenser A E, Valavanidis A, Zhang H, Uppu R M, Pryor W A. (2000). Reaction of uric acid with peroxynitrite and implications for the mechanism of neuroprotection by uric acid. *Arch Biochem Biophys*, 376, 333-337.
- 61) Sugiyama A, Maruta F, Ikeno T, Ishida K, Kawasaki S, Katsuyama T, Shimizu N, Tatematsu M. (1998). *Helicobacter pylori* infection enhances *N*-methyl-*N*-nitrosourea-induced stomach carcinogenesis in the Mongolian gerbil. *Cancer Res*, 58, 2067-2069.
- 62) Suzuki M, Miura S, Suematsu M, Fukumura D, Kurose I, Suzuki H, Kai A, Kudoh Y, Ohashi M, Tsuchiya M. (1992). *Helicobacter pylori*-associated ammonia production enhances neutrophil-dependent gastric mucosal cell injury. *Am J Physiol*. 263, G719-G725.



- 63) Taylor D E. (2000). Pathophysiology of antibiotic resistance: clarithromycin. *Can J Gastroenterol*, 14, 891-894.
- 64) Tsunehiro J, Yasuda F, Wakamatsu D, Nakai C. (2002). Isolation and characterization of lipid-radical scavenging component in crude canola oil. *in Third International Conference and Exhibition on Nutraceuticals and Functional Foods: From Laboratory to the Real World and the Marketplace* Nov. 17-20, San Diego, CA, U.S. A.
- 65) Umezawa K, Akaike T, Fujii S, Suga M, Setoguchi K, Ozawa A, Maeda H. (1997). Induction of nitric oxide synthesis and xanthine oxidase and their roles in the antimicrobial mechanism against *Salmonella typhimurium* infection in mice. *Infect. Immun*, 65, 2932-2940.
- 66) Uppu R M, Squadrito G L, Pryor W A. (1996). Acceleration of peroxynitrite oxidations by carbon dioxide. *Arch. Biochem. Biophys*, 327, 335-343.
- 67) Versalovic J, Osato M S, Spakovsky K, Dore M P, Reddy R, Stone G G, Shortridge D, Flamm R K, Tanaka S K, Graham D Y. (1997). Point mutations in the 23S rRNA gene of *Helicobacter pylori* associated with different levels of clarithromycin resistance. *J Antimicrob Chemother*, 40, 283-286.
- 68) van Doorn L J, Glupczynski Y, Kusters J G, Megraud F, Midolo P, Maggi-Solca N, Queiroz D M, Nouhan N, Stet E, Quint W G. (2001). Accurate prediction of macrolide resistance in *Helicobacter pylori* by a PCR line probe assay for detection of mutations in the 23S rRNA gene: multicenter validation study. *Antimicrob Agents Chemother*, 45, 1500-1504.
- 69) Wakamatsu D. (2001). Isolation and identification of radical scavenging compound, canolol, in canola oil. *MS Thesis, Graduate School of Natural Science, Kumamoto*

University, 1-48.

- 70) Watanabe T, Tada M, Nagai H, Sasaki S, Nakao M. (1998). *Helicobacter pylori* infection induces gastric cancer in Mongolian gerbils. *Gastroenterology*, 115, 642-648.
- 71) Yermilov Y, Yoshie Y, Rubio J, Ohshima H. (1996). Effects of carbon dioxide/bicarbonate on induction of DNA single-strand breaks and formation of 8-nitroguanine, 8-oxoguanine and base-propenal mediated by peroxynitrite. *FEBS Lett*, 399, 67-70.
- 72) Yahiro K, Niidome T, Hatakeyama T, Aoyagi H, Kurazono H, Padilla PI, Wada A, Hirayama T. (1997). *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin binds to the 140-kDa protein in human gastric cancer cell lines, AZ-521 and AGS. *Biochem Biophys Res Commun*, 238, 629-632.
- 73) Yoshida K, Akaike T, Doi T, Sato K, Ijiri S, Suga M, Ando M, Maeda H. (1993). Pronounced enhancement of NO-dependent antimicrobial action by an NO-oxidizing agent, imidazolineoxyl N-oxide. *Infect. Immun*, 61, 3552-3555.
- 74) Yoshitake J, Akaike T, Akuta T, Tamura F, Ogura T, Esumi H, Maeda H. (2004). Nitric oxide as an endogenous mutagen for Sendai virus without antiviral activity. *J Virol*, 78, 8709-8719.
- 75) Zhang H, Squadrito G L, Pryor W A. (1997). The mechanism of the peroxynitrite-carbon dioxide reaction probed using tyrosine. *Nitric Oxide*, 1, 301-307.
- 76) Zhu L, Gunn C, Beckman J S. (1992). Bactericidal activity of peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys*, 298, 452-457.