

表 題 ビタミン D₃ 分解産物中に見出された
抗ピロリ菌物質の同定およびその特性

論文の区分 博士課程

著 者 名 細田 浩一

担当指導教員
氏 名 感染免疫学講座 細菌学部門 教授 平井義一

所 属 自治医科大学大学院医学研究科
人間生物学系 専攻
生体防御医学 分野
微生物・免疫学

2015年1月9日申請の学位論文

目次

1. 要約	p.3
2. 序論	p.3
3. 材料及び方法	p.6
4. 結果	p.15
5. 考察	p.24
6. 謝辞	p.26
7. 引用文献	p.26

1. 要約

本研究において、筆者らは、70°C の蒸留水に分散させたビタミン D₃ から生じる分解産物の中から、ピロリ菌に対して優れた抗菌効果を発揮する物質の抽出・精製およびその物質 (VDP1) の化学構造の決定に成功した。VDP1 の薬理学的特徴として、ピロリ菌細胞膜の最も主要なグリセロリン脂質成分のミリストイル・ホスファチジルエタノールアミンに結合し、その膜構造を不安定化させ、本菌の溶菌を誘導すること、腸内細菌科細菌を含む他の一般的な細菌種に対しては全く殺菌作用を示さないこと、既存の抗生物質に比べ、極めて迅速にピロリ菌を殺菌すること、ヒト細胞に対する毒性が極めて弱いこと、およびヒト細胞に対するビタミン D₃ 様作用を全く示さないことが実証された。これらの結果は、VDP1 或いは VDP1 を基本母核構造とした新規の VDP1 誘導体が、常在細菌叢の生存および他の一般的な病原性細菌の薬剤耐性発現には全く影響せず、人体に対する副作用も極限まで減弱させた、ピロリ菌除菌治療に特化した抗菌薬となり得る可能性を示唆する。

2. 序論

ピロリ菌 (*Helicobacter pylori*) は、グラム陰性の鞭毛を有する螺旋状桿菌で、発育には微好気大気を要求する [1]。世界人口のおよそ半数は、ピロリ菌に感染しているとされているが、開発途上国に限定した場合、その感染率は、80% 以上にも達する。本菌は、ヒトの胃に感染し慢性萎縮性胃炎および消化性潰瘍を惹起する病原性細菌である。さらに、長期間に渡るピロリ菌保菌者では、胃癌および胃 MALT リンパ腫の発症リスクが顕著に高まることが知られている [2, 3]。また最近、ピロリ菌の感染が、慢性特発性血小板減少性紫斑病の発症と密接

に関連していることが指摘されている [4]。従って、これら疾患を予防・治療する上で、ピロリ菌の除菌は重要である。

現在、ピロリ菌除菌治療では、アモキシシリン、クラリスロマイシンおよびメトロニダゾールなどの広域スペクトルの抗菌薬が使用されている。日本におけるピロリ菌の除菌治療では、一次除菌法としてアモキシシリンおよびクラリスロマイシン、二次除菌法としてアモキシシリンおよびメトロニダゾールの使用が指針となっている。また、三次除菌法として、クラリスロマイシン或はメトロニダゾールに代わって、キノロン系抗菌薬 (シタフロキサシンなど) の使用が検討されている。いずれの除菌法においても胃酸分泌を抑制するプロトン・ポンプ阻害薬が併用される。しかしながら、他の細菌感染症同様に、ピロリ菌除菌治療においても薬剤耐性の問題がある。事実、上記した広域スペクトルの抗菌薬に対して耐性化したピロリ菌が、世界各地でかなりの割合で分離されている [5, 6]。特にアフリカで分離されるピロリ菌のほとんどは、アモキシシリンおよびメトロニダゾールに対して耐性化している。アフリカ諸国では、衛生環境整備の遅れから、ピロリ菌以外の他の細菌感染症も蔓延しており、それら細菌感染症の加療・治療においても、アモキシシリンおよびメトロニダゾールが汎用されることが、ピロリ菌の薬剤耐性発現を助長させる要因の一つと考えられている。日本においても、アモキシシリンおよびクラリスロマイシンに対して耐性化したピロリ菌の割合が年々増加傾向にあり、従って、ピロリ菌感染者の除菌成功率は、年々低下の一途を辿っている。加えて、広域スペクトルの抗菌薬は、ピロリ菌だけでなく、常在細菌に対しても抗菌効果を発揮してしまうことから、それら広域スペクトルの抗菌薬を服用するピロリ菌感染者では、常在細菌叢のバランスが崩れ、軟便、下痢および口内炎などの副作用がしばしば誘発される。さらに、広域スペクトルの抗菌薬そのものの直接的な副作用とし

て味覚障害も少なからず惹起される。副作用が重篤な場合、発疹、発熱、腹痛および血便などの症状（偽膜性大腸炎）が現れ、ピロリ菌除菌治療を中止せざるを得ない患者も認められる [7]。これらの問題を解決するには、他の細菌種（特に常在細菌）の生存および他の細菌種の薬剤耐性発現には全く影響せず、副作用を極限まで減弱させた、ピロリ菌除菌治療に特化した抗菌薬の開発が重要である。

以前の研究において、筆者らは、ピロリ菌の主要な細胞膜構成脂質のミリス Toil・ホスファチジルエタノールアミン (MPE) が、他の一般細菌および哺乳類細胞の膜構成脂質中にはほとんど含まれないこと、およびその MPE を介してピロリ菌が様々なステロイド化合物を細胞膜に積極的に取り込むことを明らかにした [8, 9]。このステロイド取り込み機能は、他の一般細菌属では全く認められない、ピロリ菌の特筆すべき生物学的特徴である。さらに、筆者らは、種々あるステロイド化合物の中には、ピロリ菌にとって有用なステロイドと有害なステロイドが存在することも明らかにした [9, 10]。有用なステロイドは、ピロリ菌の膜構成脂質として利用され、本菌の膜脂質バリアの強化に重要な役割を果たす。一方、有害なステロイドは、ピロリ菌細胞膜中の MPE に結合した後、膜傷害を誘導し、本菌を殺菌する。これらの研究成果は、ピロリ菌の MPE に対して強い結合親和性を示し、本菌の膜を傷害するような化学物質は、ピロリ菌に対して選択的且つ効果的な抗菌薬になり得る可能性を示唆する。

そこで、筆者らは、ステロイド化合物を中心に、抗ピロリ菌活性を有する低分子化合物の探索をおこなった。その結果、セコステロイドの一種であるビタミン D₃ およびその誘導体 (25-ヒドロキシビタミン D₃ および 1 α ,25-ジヒドロキシビタミン D₃) に強い抗ピロリ菌活性があることを見出した。しかしながら、これらビタミン D₃ 群は、化学構造的に非常に不安定な物質であり、熱や光によ

って容易に分解される [11] ことから、それらの抗ピロリ菌作用が、ビタミン D₃ 群自身の直接作用であるのか、或はビタミン D₃ 群から生じる何らかの分解産物による間接的な作用であるのかについては不明である。従って、本研究では、物理化学的手法によって非生物学的分解を誘導したビタミン D₃ 群試料における抗ピロリ菌活性について検討をおこない、ビタミン D₃ およびその誘導体のピロリ菌に対する抗菌作用機序の詳細な解明を試みる。

3. 材料及び方法

3.1. 細菌の培養

細菌は、Difco Laboratories 社 (MI) 製の PPLO 液体培地を用いて、37°C の微好気大気 (10% 二酸化炭素、5% 酸素および 85% 窒素) 下で、振盪培養された。

3.2. コロニー・フォーミング・ユニット (CFU) の測定

PPLO 液体培地を用いて 10 倍段階希釈された菌液 (100 μ l) が、5% の非動物ウマ血清 (Gibco, Auckland, NZ) を添加したブレイン・ハート・インフュージョン (Difco Laboratories) 寒天平板培地に塗布され、37°C の微好気大気下で 1 週間放置された。放置後、寒天平板培地上に発育した菌コロニー数が計測され、菌液の希釈倍数を基に、原液 1 ml 中の菌数が、CFU (\log_{10} CFU/ml) として算出された。

3.3. 菌液濁度 (OD_{660 nm}) の測定

リン酸緩衝化生理食塩水 (PBS) を用いて調製された菌液 (200 μ l) の濁度が、波長 660 nm の吸光度によって測定された。

3.4. 菌細胞の顕微鏡観察

PBS を用いて調製された菌液 (10 μ l) が、スライド・ガラス上に塗布され、室温で乾燥した。火炎固定の後、菌細胞が、クーマシー・ブリリアント・ブルー (CBB) 染色液 (0.05% CBB、9.1% 酢酸および 45.5% メタノール) を用いて 10 分間染色された。スライド・ガラスの水洗・乾燥の後、CBB によって染色された菌細胞が、1000 倍率の顕微鏡下で観察された。

3.5. 疎水性物質の解析

疎水性物質を抽出するために、5 倍溶のクロロホルム-メタノール (2:1) 溶媒が、試料溶液に添加され激しく混和された。4°C で一夜放置することにより、その混和液が再び水相と有機溶媒相に分離した (有機溶媒分配)。水相 (上層) を除去した後、回収した有機溶媒相 (下層) の溶媒を減圧下または窒素気流下で揮発させ、疎水性物質が得られた。得られた疎水性物質は、乾燥重量の測定の後、適切な濃度になるように、クロロホルム-メタノール (2:1) 溶媒に可溶化された。可溶化した疎水性物質試料溶液 (40 μ l) が、Merck 社 (Darmstadt, Germany) 製の薄層クロマトグラフィー (TLC) 用シリカゲル・プレートの下端に接種され、その試料に含まれる疎水性物質が、適切な展開溶媒と共に、シリカゲル・プレート表面で分画された。TLC 終了後、60% 硫酸溶液が、シリカゲル・プレート表面に噴霧され、次に、そのプレートを 120°C から 180°C で加熱することにより、プレート表面に画分された疎水性物質が検出された [12]。

3.6. 遊離型コレステロール (FC) の定量

酢酸に可溶化した脂質試料溶液 (600 μ l) が、400 μ l 量の塩化第二鉄-硫酸試薬液 [リン酸：硫酸 (2:25) 溶液に 0.2% 濃度で可溶化した塩化鉄・6 水和物溶液]

に添加され激しく攪拌された後、室温で 15 分間放置された。冷却および発色反応の後、試料溶液 (200 μ l) の吸光度 ($A_{550\text{ nm}}$) が、波長 550 nm で測定された。横軸を FC 量および縦軸を $A_{550\text{ nm}}$ とした標準曲線に基づいて、脂質試料中の FC 量が算出された。

3.7. CBB 包含ホスファチジルエタノールアミン (PE) ベシクル浮遊液の調製

Sigma-Aldrich Inc. 製のジミリストイル PE (DMPE) またはジパルミトイル PE (DPPE) の粉末 (15 mg) が、150 mM 濃度の蔗糖を含む 50 mM 濃度トリス (pH 7.5) 緩衝液 (4 ml) に分散し、冷却したバケット型の超音波発生装置内で 6 時間から 8 時間、超音波処理された。顕微鏡下で PE ベシクルの形成を確認した後、PE ベシクルが、50 mM 濃度トリス (pH 7.5) 緩衝液 (1 ml) によって、3 回 (10000 \times g、5 分) 洗浄された。洗浄の後、PE ベシクルを 0.1% 濃度の CBB を含む同緩衝液 (2 ml) に浮遊させ、その PE ベシクル浮遊液が、さらに 1 時間、超音波処理された後、4°C で一夜振盪放置された。次に、CBB を包含した PE ベシクルは、50 mM 濃度トリス (pH 7.5) 緩衝液 (1 ml) によって、3 回 (10000 \times g、5 分) 洗浄された後、適量と同緩衝液に再び浮遊した。CBB 包含 PE ベシクル浮遊液 (100 μ l) の濁度 ($OD_{660\text{ nm}}$) を 2 の値に調製した後、その PE ベシクル浮遊液は、-20°C で保存された。

3.8. ビタミン D₃ 群および抗生物質

ビタミン D₃ は、和光純薬工業株式会社 (東京) から得られた。25-ヒドロキシビタミン D₃ は、Enzo Life Sciences Inc. (NY) から得られた。1 α ,25-ジヒドロキシビタミン D₃ は、Cayman Chemical Co. (MI) から得られた。これらビタミン D₃ 群

は、5 mM 濃度になるようにエタノールに可溶化され、-80℃で保存された。本研究に使用した 0.2% 濃度のエタノールは、細菌および細胞の生存および増殖には全く影響しなかった。抗生物質の硫酸カナマイシンおよびアモキシシリンは、EMD Biosciences Inc. (CA) および Sigma-Aldrich Inc. からそれぞれ得られた。これら抗生物質は、1 mg/ml 濃度になるように蒸留水に可溶化され、-80℃で保存された。

3.9. 細菌の増殖試験

様々な細菌種が、30 μ M 濃度の遊離型コレステロール (FC) 添加或は無添加の PPLO 液体培地 (1.5 ml) 中で、種々の濃度の抗菌性物質の存在或は非存在下で、37℃の微好気条件下で、様々な時間まで振盪放置された後、CFU が測定された。本研究に使用したピロリ菌株は、NCTC 11638 株、ATCC 43504 株、26695 株、臨床分離株の A-13 株および A-19 株の 5 菌株であった。FC 不在ピロリ菌は、FC 無添加の PPLO 液体培地を用いて培養された。FC 保持ピロリ菌は、30 μ M 濃度の FC (和光純薬工業株式会社) を添加した PPLO 液体培地を用いて培養された。その他の細菌種として、大腸菌 (*Escherichia coli*)、サルモネラ (*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium)、肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、プロテウス (*Proteus mirabilis*)、セラチア (*Serratia marcescens*)、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) および黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) が、本研究に使用された。これらの細菌種は、当研究室で長年維持・管理された標準的な菌株であった。

3.10. ビタミン D₃ 群の非生物学的分解

蒸留水 (1.5 ml) に分散させたビタミン D₃ 群 (150 nmol) が、70℃で 24 時間か

ら 48 時間攪拌され、有機溶媒分配法によって、再び回収された (材料および方法 2.5 参照)。ビタミン D₃ 群の非生物学的分解を確認するために、回収したビタミン D₃ 群の各試料 (全量) が、クロロホルム : アセトン : メタノール (9:1:1) 展開溶媒系の TLC によって解析された。さらに、これとは別に、回収したビタミン D₃ 群の各試料 (全量) を分散させた PPLO 液体培地 (1.5 ml) 中で、ピロリ菌 (NCTC 11638 株) が、37°C の微好気条件下で 2 時間振盪放置された後、CFU が測定された。

3.11. ビタミン D₃ 分解産物 1 および 2 (VDP1 および VDP2) の精製

ビタミン D₃ 分解産物 (VDP) を得るために、蒸留水 (100 ml) に分散させたビタミン D₃ (100 mg) が、70°C で 1 週間放置された後、有機溶媒分配法により再び回収され、クロロホルム溶媒 (1 ml) に可溶化された。次に、その試料溶液 (1 ml) が、クロロホルム溶媒で活性化した三菱化学イアトロン株式会社 (東京) 製のイアトロビーズ 6RS-8060 カラム (直径 1 cm、高さ 5 cm) 上に重層され、VDP が、クロロホルム溶媒 (10 ml)、クロロホルム : アセトン (9:1) 溶媒 (10 ml)、クロロホルム : アセトン (7:3) 溶媒 (10 ml)、およびクロロホルム : アセトン (4:6) 溶媒 (10 ml) の順で溶出し、4 つの画分に分画された。

次に、減圧下で乾燥させたクロロホルム溶出画分が、再びクロロホルム溶媒 (1 ml) に可溶化され、同イアトロビーズ・カラムに重層された後、ジエチルエーテル : クロロホルム (7:3) 溶出溶媒によって、さらに 9 つの画分 (500 µl/管) に分画された。VDP1 および VDP2 が含まれる画分を確認するために、窒素気流下で乾燥させた各画分が、適量のクロロホルム : メタノール (2:1) 溶媒に可溶化された後、その 200 µg 量が、一次展開溶媒としてヘキサン : ジエチルエーテル (6:4) 溶媒および二次展開溶媒としてヘキサン : 酢酸エチル (10:1) 溶媒を用いた 2 次

元 TLC によって解析された。

次に、VDP1 および VDP2 を含む画分が収集された後、その収集画分が、昭光サイエンティフィック株式会社 (神奈川) 製の Purif Pack SI30 フラッシュ・カラム・クロマトグラフィーに供された。VDP1 および VDP2 のカラムからの溶出は、濃度勾配のある酢酸エチルを含むヘキサン溶媒を用いて、波長 254 nm の吸光度 ($A_{254\text{ nm}}$) を測定しながら流速 15 ml/分でおこなわれた (ケムジェネシス株式会社、東京)。

次に、フラッシュ・カラム・クロマトグラフィーによって粗精製された VDP1 および VDP2 が、ジーエルサイエンス株式会社 (東京) 製の GL Science Inertsil SIL 100A カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) に供され、さらに精製された。VDP1 および VDP2 の溶出は、溶出液の $A_{254\text{ nm}}$ を測定しながら、3% 濃度の酢酸エチルを含むヘキサン溶媒を用いて、流速 20 ml/分でおこなわれた (ケムジェネシス株式会社)。VDP1 および VDP2 の純度を確認するために、精製された VDP1 および VDP2 の 50 μg 量が、ヘキサン : 酢酸エチル (10:1) 展開溶媒系の TLC によって解析された。精製 VDP1 および VDP2 は、適切な濃度になるようにエタノールに可溶化され、 -80°C で保存された。

3.12. VDP1 および VDP2 の PE ベシクルとの相互作用の検討

DMPE または DPPE で調製された CBB 包含 PE ベシクル浮遊液 (50 μl) が、VDP1 或は VDP2 の 15 μg 量を含む 1.45 ml 量の 50 mM 濃度トリス (pH 7.5) 緩衝液に添加され、 37°C で 2 時間振盪放置された (材料および方法 2.7 参照)。放置後、PE ベシクルを遠心分離 (10000 $\times g$ 、5 分) によって除去した後、PE ベシクルから上清 (200 μl) 中に溶出した CBB が、波長 590 nm の吸光度によって測定された。

3.13. VDP1 のピロリ菌に対する抗菌作用機序の解析

FC 保持ピロリ菌細胞を得るために、ピロリ菌 (NCTC 11638 株) の菌液 (200 μ l) が、30 μ M 濃度の FC および 10 μ M 濃度の 2,6-ジ-*O*-メチル- β -シクロデキストリン (dM β CD: Sigma-Aldrich Inc.) を添加した PPLO 液体培地 (10 ml) 中で、37°C の微好気条件下で 24 時間振盪培養された。この培養を 3 回繰り返した後、FC 保持ピロリ菌細胞が、遠心分離 (10000 \times g、5 分) によって回収された。次に、FC 保持ピロリ菌細胞が PBS を用いて 3 回洗浄 (10000 \times g、5 分) された後、その FC 保持ピロリ菌 ($10^{8.5}$ から 10^9 CFU) を浮遊させた PBS (5 ml) が、精製 VDP1 (10 μ g/ml) および dM β CD (30 μ M) と共に、アネロパック (三菱ガス化学株式会社、東京) を用いて嫌気大気にした 37°C の密閉容器の中で、48 時間振盪放置された。放置後、CFU 測定、OD_{660 nm} 測定、および菌細胞観察がおこなわれた (材料および方法 3.2、3.3 および 3.4 参照)。また、Whatman 社 (Buckinghamshire, UK) 製の GDXS 25 滅菌フィルターを用いて菌細胞を除去した上清 (4 ml) が、有機溶媒分配に供され、ピロリ菌由来の脂質試料が得られた後、その脂質試料中の FC が、塩化第二鉄-硫酸法によって定量された (材料および方法 3.5 および 3.6 参照)。

3.14. VDP1 の化学構造の解析

VDP1 の化学構造が、日本電子株式会社 (東京) 製の ECA-500 システムを用いた核磁気共鳴 (NMR) 分析によって決定された。 ^1H および ^{13}C の NMR は、500 MHz および 125 MHz で、それぞれ検知された。化学シフトのシグナルは、重水素化クロロホルム (CDCl_3) を 7.26 ppm (parts per million) とし、テトラメチルシランを 0 ppm として検知された。

3.15. VDP1 の化学合成

反応触媒として塩化ルテニウム (触媒量) および酸化剤として過ヨウ素酸ナトリウム (1.22 mmol) を含む酢酸エチル:アセトニトリル:水 (3:3:1) 溶媒 (0°C) に、ビタミン D₃ (0.78 mmol) が添加され、室温で 5 時間攪拌された (図 1)。次に、ヘキサン溶媒の添加によって水相と有機溶媒相に分かれた反応溶液に、水相の最終濃度が 10% になるようにチオ硫酸ナトリウムが添加され、ビタミン D₃ の酸化反応が終了した [13]。回収した水相から目的物質 (合成 VDP1) が、ヘキサン溶媒によって抽出され、飽和食塩水を用いて洗浄された後、減圧下で乾燥した。合成 VDP1 の精製は、ヘキサン:酢酸エチル (4:1) 溶媒を溶出液に用いたシリカゲル・カラム・クロマトグラフィー (Merck) によっておこなわれた。日本電子株式会社製の JMS-Q1000GCMk II システムを用いたガスクロマトグラフ・質量分析 (GC-MS) によって、得られた合成 VDP1 の質量スペクトルが、精製 VDP1 の質量スペクトルと比較された (図 2)。

3.16. VDP1 の細胞毒性試験

ヒト乳癌細胞株 T47D 細胞は、DS ファーマバイオメディカル株式会社 (大阪) から得られた。ヒト胃癌細胞株 MKN45 細胞は、株式会社ジェネティックラボ (札幌) から得られた。これらの細胞は、10% 濃度の非動化胎児ウシ血清 (FCS)、10 mM 濃度の HEPES、2 mM 濃度の L-グルタミン、100 U/ml 濃度のペニシリン、100 µg/ml 濃度のストレプトマイシンおよび 10% 濃度の炭酸水素ナトリウムを含む Sigma-Aldrich Inc. 製の RPMI 1640 液体培地を用いて、5% 濃度の炭酸ガスを充填した湿度飽和の 37°C の孵卵器 (CO₂ 孵卵器) 内で維持・管理された。PBS を用いて 1 回洗浄 (200 ×g、3 分) された細胞が、10% 濃度の代わりに 2.5% 濃度の FCS を含む同 RPMI 1640 液体培地を用いて 10^{5.3} 個/ml に調製された後、そ

の 100 μ l 量が、種々の濃度の VDP1 を含む同液体培地 (100 μ l) に添加され、CO₂ 孵卵器内で 72 時間培養された。培養終了 4 時間前に、PBS を用いて 5 mg/ml 濃度に調製された MTT 試薬 (Sigma-Aldrich Inc.) の 20 μ l 量が、その細胞培養液に添加された。培養終了後、培養液が除去され、生細胞によって産生されたフォルマザン・ブルーの結晶を溶出するために、5% 濃度のギ酸を含むイソプロパノール溶液 (200 μ l) が、その培養細胞に添加された。可溶化されたフォルマザン・ブルー溶液 (150 μ l) の吸光度が、波長 540 nm で測定された。

3.17. カスパーゼによって分断されたサイトケラチン 18 (ccK18) の検出

10% 濃度の FCS を含む RPMI 1640 液体培地 (1 ml) を用いて 10^{5.5} 個/ml に調製された T47D 細胞が、1000 nM 濃度の VDP1 または 1 α ,25-ジヒドロキシビタミン D₃ と共に、CO₂ 孵卵器内で 72 時間培養された後、培養上清中の ccK18 タンパク質が、M30 CytoDeath ELISA キット (Peviva AB, Stockholm, Sweden) を用いて検出された。

3.18. 一過性受容体電位バニロイド 6 型 (TRPV6) タンパク質の検出

材料および方法 3.17 と同様の方法で培養された T47D 細胞が、5% 濃度のグリセロール、0.002% 濃度のブロモ・フェノール・ブルー、2% 濃度のドデシル硫酸ナトリウム (SDS) および 40 mM 濃度のジチオトレイトールを含む 50 mM 濃度トリス (pH 6.8) 緩衝液 (100 μ l) を用いて融解され、その細胞融解液 (5 μ l) が、0.1% SDS-12.5% ポリアクリルアミド・ゲル電気泳動 (SDS-PAGE) に供された。SDS-PAGE 後のタンパク質は、ATTO 株式会社 (東京) 製のブロッキング装置を用いて、トリス-グリシン緩衝液 (100 mM 濃度トリス、192 mM 濃度グリシンおよび 5% 濃度メタノール) で活性化したクリア・ブロット P 膜 (ATTO 株式会社)

に転写された。或は、SDS-PAGE 後のゲルが、CBB 染色液 (材料および方法 2.4 参照) 中で、2 時間室温で振盪放置することにより染色され、ゲル中のタンパク質を検出するために、脱色液 (45.5% 濃度メタノールおよび 9.1% 濃度酢酸) によって脱色された。タンパク質を転写したクリア・ブロット P 膜は、1% 濃度のスキムミルクを含む 20 mM 濃度トリス (pH 7.6) 緩衝化生理食塩水 (TBS) 中で、25°C で一夜振盪放置された後、抗ヒト TRPV6 ウサギ IgG ポリクローナル抗体 (Santa Cruze Biotechnology Inc., CA) を添加した反応用緩衝液 (0.1% 濃度のスキムミルクおよび 0.1% 濃度のツウィーン 20 を含む TBS) 中で、25°C で 2 時間振盪放置された。洗浄液 (0.1% 濃度のツウィーン 20 を含む TBS) で 3 回 (10 分/回) 洗浄されたクリア・ブロット P 膜は、次に、西洋ワサビ・ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG ポリクローナル抗体 (Cell Signaling Technology Inc., MA) を添加した反応用緩衝液中で、25°C で 2 時間振盪放置された後、洗浄液で 3 回 (10 分/回)、TBS で 2 回 (5 分/回) および蒸留水で 1 回 (10 分/回) 順次洗浄された。洗浄されたクリア・ブロット P 膜は、0.027% DAB (3,3'-ジアミノベンチジン四塩酸・二水和物) および 0.04% 過酸化水素水を含む 100 mM 濃度トリス (pH 7.5) 緩衝液中で、適当な時間振盪放置され、蒸留水で洗浄された。

4. 結果

4.1. ビタミン D₃ およびその誘導体の抗ピロリ菌活性

まず、筆者らは、ビタミン D₃ およびその誘導体のピロリ菌に対する抗菌性について検討した。遊離型コレステロール (FC) 不在ピロリ菌が、1 μ M から 10 μ M の濃度域のビタミン D₃、25-ヒドロキシビタミン D₃ または 1 α ,25-ジヒドロキシビタミン D₃ 存在下で、24 時間振盪放置された時、これらビタミン D₃ 群は、FC 不在ピロリ菌に対して明らかな抗菌作用を示し、本菌の CFU は、5 μ M 濃度のビ

タミン D₃ およびその誘導体存在下で、放置開始直後の 10^{6.5} CFU/ml から検出限界以下 (10 CFU/ml 以下) にまで減少した (図 3b)。

4.2. 非生物学的分解処理によるビタミン D₃ およびその誘導体の抗ピロリ菌活性の変化

ビタミン D₃ およびその誘導体は、化学構造的に非常に不安定な物質であり、熱や光によって容易に分解することが知られている [11]。そこで次に、筆者らは、ビタミン D₃ およびその誘導体の非生物学的分解を迅速に誘導するために、150 nmol 量のビタミン D₃、25-ヒドロキシビタミン D₃ および 1 α ,25-ジヒドロキシビタミン D₃ を 70°C の蒸留水 (1.5 ml) に分散させ、24 時間から 48 時間放置した。放置後、有機溶媒分配法により回収したビタミン D₃、25-ヒドロキシビタミン D₃ および 1 α ,25-ジヒドロキシビタミン D₃ の各試料が、薄層クロマトグラフィー (TLC) によって解析された。70°C の蒸留水に分散させ、24 時間後に回収した試料におけるビタミン D₃、25-ヒドロキシビタミン D₃ および 1 α ,25-ジヒドロキシビタミン D₃ の TLC 解析による検出レベルは、48 時間後に回収した試料同様に、著しく低下した (図 4a)。これらの結果は、ビタミン D₃ およびその誘導体が、70°C の蒸留水中で分解したことを示す。そこで、70°C の蒸留水に分散させ、48 時間後に回収したビタミン D₃、25-ヒドロキシビタミン D₃ および 1 α ,25-ジヒドロキシビタミン D₃ の各試料 (150 nmol) 存在下で 2 時間振盪放置されたピロリ菌液 (1.5 ml) 中の CFU が測定された。25-ヒドロキシビタミン D₃ および 1 α ,25-ジヒドロキシビタミン D₃ の FC 不在ピロリ菌に対する抗菌作用は、分解処理によって著しく減弱した (図 4b)。従って、CFU レベルの低下は、分解処理後のそれらビタミン D₃ 誘導体存在下で放置したピロリ菌においてよりも、分解未処理のそれらビタミン D₃ 誘導体存在下で放置したピロリ菌において顕著であっ

た。一方、ビタミン D₃ の FC 不在ピロリ菌に対する抗菌作用は、分解処理によって著しく増強した。従って、CFU レベルの低下は、分解未処理のビタミン D₃ 存在下で放置したピロリ菌においてよりも、分解処理後のビタミン D₃ 存在下で放置したピロリ菌において顕著であった。同様の結果が、37°C の蒸留水に分散させ、48 時間後に回収したビタミン D₃ およびその誘導体においても認められた (未発表)。これらの結果から、図 3b に示した 25-ヒドロキシビタミン D₃ および 1 α ,25-ジヒドロキシビタミン D₃ の FC 不在ピロリ菌に対する抗菌作用は、それらビタミン D₃ 誘導体自身の直接作用であることが示された。一方、ビタミン D₃ の FC 不在ピロリ菌に対する抗菌作用は、ビタミン D₃ 自身の直接作用ではなく、蒸留水中で生じる何らかの分解産物に由来する作用であることが示された。

4.3. ビタミン D₃ 分解産物の抗ピロリ菌活性

次に、筆者らは、抗ピロリ菌活性を有するビタミン D₃ 分解産物の抽出・精製に着手するために、70°C の蒸留水 (100 ml) にビタミン D₃ (100 mg) を 1 週間分散させた後、有機溶媒分配法により回収したビタミン D₃ 分解産物をカラム・クロマトグラフィー法により 4 画分に分画した。分画された各画分試料 (0.5 μ g/ml) が、10⁶ CFU/ml の FC 不在ピロリ菌液 (1 ml) に添加され、24 時間後の本菌の CFU が測定された。その結果、画分 1 において、最も強い抗ピロリ菌活性が検出された (未発表)。そこで次に、筆者らは、カラム・クロマトグラフィー法により画分 1 をさらに 9 画分に細かく分画し、得られた各画分試料 (0.5 μ g/ml) 存在下で、FC 不在ピロリ菌液 (1 ml) を 24 時間放置した後、CFU を測定した。その結果、画分 1-5 および画分 1-6 において、最も強い抗ピロリ菌活性が検出された (図 5a)。収集した画分 1-5 および画分 1-6 の 2 次元 TLC 解析において、3 種のビタミン D₃ 分解産物 (VDP1、VDP2 および VDP3) が強く検出された (図 5b)。

そこで、これら VDP の精製が、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法によっておこなわれた。その結果、VDP1 および VDP2 が首尾よく精製された (図 5c)。VDP3 は、精製過程で消失したことから、揮発性の高い物質或は化学構造的に非常に不安定な物質であることが推測された。

4.4. VDP1 および VDP2 の抗ピロリ菌活性

次に、筆者らは、精製した VDP1 および VDP2 のピロリ菌に対する抗菌性について検討をおこなった。0.5 $\mu\text{g/ml}$ から 2 $\mu\text{g/ml}$ の濃度域の VDP1 または VDP2 存在下で、FC 不在ピロリ菌液 (1.5 ml) が 24 時間放置された後、CFU が測定された。VDP1 は、FC 不在ピロリ菌に対して強い抗菌作用を示し、1 $\mu\text{g/ml}$ 濃度の VDP1 存在下で放置したピロリ菌の CFU は、放置開始直後の $10^{6.5}$ CFU/ml から検出限界以下 (10 CFU/ml 以下) にまで減少した (図 6a)。一方、VDP2 の FC 不在ピロリ菌に対する抗菌作用は、VDP1 の作用に比べ著しく弱く、検討した最も高い濃度 (2 $\mu\text{g/ml}$) の VDP2 存在下でさえ、ピロリ菌の CFU は、放置開始直後の $10^{6.5}$ CFU/ml をほぼ維持し、従って、VDP2 はピロリ菌に対して静菌的に作用することが推測された。

筆者らの研究を含む以前の研究は、外因性の FC を細胞膜に吸収・保持したピロリ菌が、ホスファチジルコリン、抗生物質および胆汁酸などの抗菌作用に対して耐性を獲得することを示した [14, 15, 16]。そこで、FC を保持したピロリ菌に対する VDP1 および VDP2 の抗菌性が、上述した FC 不在ピロリ菌を用いておこなわれた実験と同じ方法によって検討された。FC 保持ピロリ菌に対する VDP1 の抗菌作用は、FC 不在ピロリ菌に対する作用に比べ、減弱したが、本表現型のピロリ菌の CFU は、2 $\mu\text{g/ml}$ 濃度の VDP1 存在下で、放置開始直後の $10^{6.5}$ CFU/ml から検出限界以下 (10 CFU/ml 以下) にまで減少した (図 6a)。即ち、

VDP1 は、FC 保持ピロリ菌に対しても抗菌効果を発揮することが示された。一方、VDP2 は、FC 保持ピロリ菌に対して全く抗菌作用を示さず、本表現型のピロリ菌の CFU は、2 $\mu\text{g/ml}$ 濃度の VDP2 存在下でさえ、VDP2 非存在下で放置したピロリ菌の CFU 同様に、放置開始直後の $10^{6.5}$ CFU/ml から $10^{8.5}$ CFU/ml にまで増加した。即ち、ピロリ菌は、FC を細胞膜に保持することにより、VDP2 の静菌作用に対して耐性化することが示された。

4.5. VDP1 および VDP2 の PE ベシクルに対する結合親和性

筆者らの以前の研究は、プロゲステロン誘導体が、ピロリ菌細胞膜の最も主要なグリセロリン脂質成分のホスファチジルエタノールアミン (PE) を介して、ピロリ菌と相互作用し、その膜構造を不安定化させ、ついには本菌を溶菌させることを示した [8, 9]。そこで、ピロリ菌の最も主要な PE 分子種の一つのジミリストイル PE (DMPE) に対する VDP1 および VDP2 の結合親和性について検討した。DMPE またはジパルミトイル PE (DPPE) を用いて調製されたクーマシー・ブリリアント・ブルー (CBB) 包含 PE ベシクルが、VDP1 または VDP2 存在下で 2 時間放置された後、PE ベシクルから上清中に溶出した CBB レベルが測定された。その結果、VDP1 は、DPPE ベシクルからよりも DMPE ベシクルからの CBB 溶出を強く誘導した (図 6b)。即ち、このことは、VDP1 が、DMPE に対して結合親和性を示し、そのベシクル構造を崩壊させるということを示す。一方、VDP2 は、VDP1 において認められたような、DMPE ベシクルからの CBB 溶出をほとんど誘導しなかった。これらの結果から、VDP1 は、ピロリ菌細胞膜の DMPE に少なくとも結合し、本菌に対して何らかの機序により抗菌効果を発揮することが示唆された。そこで、筆者らは、VDP1 に着目し、この化合物の詳細な抗菌作用機序について解析をおこなった。

4.6. VDP1 のピロリ菌に対する抗菌作用機序

ピロリ菌は、嫌気大気に暴露されると、螺旋状の桿菌から球状の菌体へと形態学的に変化することが知られている [17]。球状化したピロリ菌は、その後、微好気大気に復帰させても螺旋状の桿菌には戻らず、また、通常の培養法では分裂・増殖することができない。そこで、筆者らは、嫌気条件下で VDP1 のピロリ菌に対する抗菌作用機序を検討した。VDP1 を含む PBS 中で FC 保持ピロリ菌が、37°C の嫌気条件下で 48 時間放置された後、CFU の測定、OD_{660 nm} の測定、菌形態の観察および上清 FC の定量がおこなわれた。CFU は、VDP1 の存在如何に関わらず、嫌気条件下での放置により、放置開始直前の 10^{8.5} CFU/ml から検出限界以下 (10 CFU/ml 以下) にまで減少した (図 7a)。しかしながら、OD_{660 nm} の減少は、VDP1 非存在下で放置したピロリ菌液においてよりも、VDP1 存在下で放置したピロリ菌液において顕著であった (図 7b)。即ち、菌液濁度の低下が、VDP1 存在下で強く誘導された。この結果から、VDP1 は、ピロリ菌に対して溶菌作用を示すことが示唆された。そこで、ピロリ菌の形態が、顕微鏡下で観察された。嫌気条件下での放置開始直前のピロリ菌の形態は桿菌状であったのに対して、VDP1 非存在下で放置した嫌気大気下のピロリ菌の形態は球状であった (図 7c)。一方、VDP1 存在下で放置した嫌気大気下のピロリ菌液では、球状化した菌体は観察されず、細胞残渣が観察された。次に、ピロリ菌細胞膜由来の FC 量が、上清中で測定された。その結果、VDP1 存在下で放置したピロリ菌液の上清中には、VDP1 非存在下で放置したピロリ菌液の上清中よりも、大量の FC が含まれた (図 7d)。即ち、このことは、VDP1 が、ピロリ菌細胞膜からの FC の漏出を強く誘導することを意味する。図 6b の結果と共に、これらの結果は、VDP1 が、ピロリ菌細胞膜の PE に結合し、本菌の膜構造を不安定化させ、ついには本菌を溶菌させるという抗菌作用機序を明らかにした。

4.7. VDP1 の化学構造

次に、 ^1H および ^{13}C NMR 分析により、VDP1 の化学構造の決定がなされた。その結果、VDP1 の化学構造は、塩化ルテニウムを触媒とし、過ヨウ素酸ナトリウムを酸化剤として用いたビタミン D_3 の酸化反応によって化学的に生成されたグランドマン・ケトンのそれと一致した (図 8a) [18, 19]。即ち、精製 VDP1 の NMR 分析による化学シフトのシグナルは、 ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 2.44 (dd, $J = 11.8, 7$ Hz, 1H), 2.26 (ddd, $J = 14.2, 6.0, 2.0$ Hz, 1H), 2.22 (m, 1H), 2.12 (ddd, $J = 13.1, 9.6, 2.8$ Hz, 1H), 2.00 (m, 1H), 1.90 (m, 2H), 1.72 (m, 1H), 1.52 (m, 3H), 1.42 (m, 2H), 1.34 (m, 2H), 1.30 (m, 1H), 1.14 (m, 3H), 1.04 (m, 1H), 0.95 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H), 0.87 (d, $J = 2.3$ Hz, 3H), 0.87 (d, $J = 2.3$ Hz, 3H), 0.64 (s, 3H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 212.5, 62.2, 56.9, 50.1, 41.2, 39.6, 39.1, 36.2, 35.7, 28.1, 27.7, 24.2, 24.0, 23.0, 22.7, 19.2, 18.9, 12.6 であった。一方、グランドマン・ケトン (合成 VDP1) の NMR 分析による化学シフトのシグナルは、 ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 2.45 (dd, $J = 11.8, 7$ Hz, 1H), 2.27 (ddd, $J = 14.2, 6.0, 2.0$ Hz, 1H), 2.22 (m, 1H), 2.12 (ddd, $J = 13.1, 9.6, 2.8$ Hz, 1H), 2.00 (m, 1H), 1.90 (m, 2H), 1.72 (m, 1H), 1.57 (m, 1H), 1.52 (m, 2H), 1.42 (m, 1H), 1.39 (m, 1H), 1.34 (m, 2H), 1.30 (m, 1H), 1.14 (m, 3H), 1.04 (m, 1H), 0.95 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H), 0.87 (d, $J = 2.3$ Hz, 3H), 0.87 (d, $J = 2.3$ Hz, 3H), 0.64 (s, 3H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 212.4, 62.2, 56.9, 50.1, 41.1, 39.6, 39.1, 36.1, 35.7, 28.1, 27.7, 24.2, 24.0, 23.0, 22.7, 19.2, 18.9, 12.6 であった (図 9 および 10)。

4.8. 合成 VDP1 のピロリ菌および他の一般細菌種に対する抗菌性

次に、筆者らは、VDP1 自身が、抗ピロリ菌活性の本体であることを確証するために、上述の化学的に合成された VDP1 (グランドマン・ケトン) を用いて、その抗ピロリ菌作用について検討した。種々の濃度の合成 VDP1 存在下で、FC

保持ピロリ菌 (5 株) が 24 時間放置された後、本菌を完全に殺滅する VDP1 の濃度 (BC) が決定された。FC 保持ピロリ菌 5 株に対する合成 VDP1 の BC は、1.5 $\mu\text{g/ml}$ から 2.5 $\mu\text{g/ml}$ であった (図 8b)。即ち、図 6a に示した精製 VDP1 の BC (2 $\mu\text{g/ml}$) とほぼ一致した。一方、VDP1 は、ピロリ菌を除く他の 7 菌種 (大腸菌、サルモネラ、肺炎桿菌、プロテウス、セラチア、緑膿菌および黄色ブドウ球菌) に対しては全く殺菌作用を示さず、検討した最も高い濃度 (50 $\mu\text{g/ml}$) の合成 VDP1 存在下でさえ、これらの菌種は、分裂・増殖した。即ち、ピロリ菌は、VDP1 の殺菌作用に対して極めて感受性であることが判明した。上述したように、ピロリ菌 PE の主要な飽和脂肪酸側鎖は、ミリスチン酸である [8]。一方、黄色ブドウ球菌を除く、検討した他のグラム陰性細菌の PE の主要な飽和脂肪酸側鎖は、パルミチン酸である [20, 21, 22, 23, 24, 25]。このことから、VDP1 が、ミリストイル PE に対して結合親和性を示すことが推測された。因みに、グラム陽性細菌の黄色ブドウ球菌は、その細胞膜中に PE をほとんど含有しない [26]。

4.9. VDP1 のピロリ菌に対する殺菌効果

次に、筆者らは、VDP1 のピロリ菌に対する殺菌効果を既存の広域スペクトルの抗生物質のそれと比較した。2 $\mu\text{g/ml}$ 濃度の合成 VDP1、アモキシシリンまたはカナマイシン存在下で、FC 保持ピロリ菌が、種々の時間まで放置され、経時的な CFU レベルの変化が検討された。その結果、VDP1 は、アモキシシリンおよびカナマイシンよりも極めて迅速にピロリ菌を殺菌した。従って、VDP1 と共に放置されたピロリ菌の CFU は、放置開始から 1.5 時間後には、 10^7 CFU/ml から検出限界以下 (10 CFU/ml 以下) に減少した (図 8c)。一方、アモキシシリンまたはカナマイシンと共に放置されたピロリ菌の CFU の減少は、放置開始から 2 時間後でさえ、ほとんど認められなかった。アモキシシリンおよびカナマイシ

ンは、細菌の代謝を攪乱することにより殺菌効果を発揮する抗生物質であり、その効果の発現には時間を要する。一方、VDP1 のピロリ菌に対する殺菌効果は、極めて即効性であった。このことから、VDP1 が、細菌の代謝を攪乱するのではなく、ピロリ菌細胞膜を直接傷害し、迅速に本菌を溶菌させることが強く示された。

4.10. VDP1 のヒト細胞に対する毒性

次に、ヒト胃癌細胞株 MKN45 細胞およびヒト乳癌細胞株 T47D 細胞に対する VDP1 の毒性が検討された。MKN45 細胞または T47D 細胞が、種々の濃度の合成 VDP1 存在下で、72 時間培養された後、MTT 分析によって生細胞が検出された。その結果、VDP1 は、ヒト細胞に対して全く毒性を示さず、ピロリ菌を完全に殺滅する濃度 (10 μ M) の VDP1 存在下で培養された両細胞株とも、VDP1 非存在下で培養されたそれら細胞株同様に増殖した (図 11a)。

4.11. VDP1 のビタミン D₃ 様活性の欠如

1 α ,25-ジヒドロキシビタミン D₃ (活性型ビタミン D₃) は、哺乳類細胞の核内に存在するビタミン D 受容体 (VDR) と結合し、VDR とレチノイド X 受容体 (RXR) のヘテロ二量体形成を誘導する。活性型ビタミン D₃ を結合した VDR-RXR ヘテロ二量体は、染色体 DNA 上の VDR 反応性エレメント (VDRE) 配列に結合し、VDRE の下流に存在するカスパーゼや一過性電位受容体バニロイド 6 型 (TRPV6) などの標的遺伝子の発現を活性化する [27, 28, 29, 30, 31, 32]。即ち、活性型ビタミン D₃ 結合 VDR-RXR は、転写因子として機能する。カスパーゼは、サイトケラチン 18 を加水分解し、その分解産物の ccK18 の産生を誘導する [33, 34]。TRPV6 は、カルシウムイオン・チャネルを構成するタンパク質

で、その発現量の増大は、カルシウム・イオンの細胞内取り込みを促進する [35, 36]。そこで次に、筆者らは、ビタミン D₃ の分解産物である VDP1 が、活性型ビタミン D₃ のように、ヒト細胞を活性化するのかを検討した。1000 nM 濃度の合成 VDP1 または活性型ビタミン D₃ 存在下で T47D 細胞が、72 時間培養された後、その培養上清中の ccK18 が、ELISA によって測定された。活性型ビタミン D₃ によって刺激された T47D 細胞では、ccK18 の産生が強く誘導されたのに対して、VDP1 によって刺激された同細胞では、ccK18 の産生は全く誘導されなかった (図 7b)。次に、T47D 細胞内の TRPV6 タンパク質が、ウェスタン・ブロット法によって検出された。活性型ビタミン D₃ によって刺激された T47D 細胞では、TRPV6 タンパク質が強く検出されたのに対して、VDP1 によって刺激された同細胞での TRPV6 タンパク質の検出レベルは、未刺激の T47D 細胞でのその検出レベルと同等であった (図 11c)。これらの結果から、VDP1 は、ヒト細胞に対するビタミン D₃ 様活性を欠如することが示された。また、図 11a の結果と共に、これらの結果から、VDP1 は、人体に対する副作用が極めて弱いことが示唆された。

5. 考察

他の研究者グループによる以前の研究は、新規のビタミン D₃ 誘導体を経口投与された初老女性では、そのビタミン D₃ 誘導体を投与されなかった初老女性よりも、ピロリ菌感染陽性率が低かったということを報告した [37]。しかしながら、その新規ビタミン D₃ 誘導体が、ピロリ菌に対して直接殺菌作用を示したかは明らかにされなかった。本研究において、筆者らは、25-ヒドロキシビタミン D₃ (循環型ビタミン D₃) および 1 α ,25-ジヒドロキシビタミン D₃ (活性型ビタミン D₃) が、ピロリ菌に対して直接殺菌作用を示すことを明らかにした。即ち、筆者

らは、これまで知られているビタミン D₃ のホルモン作用 [38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46] とは異なる循環型ビタミン D₃ および活性型ビタミン D₃ の新たな生物活性を見出した。ピロリ菌のヒトへの感染は、腸管免疫の未熟な乳幼児において成立し、腸管免疫が充実した成人では、本菌の自然感染は成立しないとされている [47, 48]。これとは別に、小児におけるビタミン D₃ (循環型ビタミン D₃) の血中濃度は、調査された小児集団で数値は様々であるが、その血中濃度が、極端に低い小児も少なからず認められる [49, 50]。このことは、循環型ビタミン D₃ および活性型ビタミン D₃ が、乳幼児におけるピロリ菌の感染防御に何らかの役割を果たす可能性を示唆するかも知れない。今後、循環型ビタミン D₃ および活性型ビタミン D₃ のピロリ菌に対す抗菌作用機序の詳細な解析と共に、小児におけるピロリ菌感染陽性率と血中ビタミン D₃ 濃度に関する疫学調査をおこなう必要がある。

本研究において、筆者らは、ビタミン D₃ の分解産物 VDP1 に優れた抗ピロリ菌活性があることを明らかにした。即ち、VDP1 は、ピロリ菌細胞の PE に結合し、その膜構造を不安定化させ、本菌を溶菌させること、他の一般的な細菌種には殺菌作用を示さないこと、既存の抗生物質よりも極めて迅速にピロリ菌を殺菌すること、ヒト細胞に対する毒性が極めて弱いこと、およびヒト細胞に対するビタミン D₃ 様作用 (副作用) を示さないことが実証された。今後、ピロリ菌感染動物モデルを構築し、VDP1 の生体内におけるピロリ菌除菌効果について検討し、VDP1 が常在細菌叢には全く影響しないピロリ菌除菌治療に特化した抗菌薬となり得るかの研究を進めていく必要がある。また、VDP1 のピロリ菌以外の他のヘリコバクター属細菌に対する抗菌性についても検討する必要がある。

本研究において、筆者らは、ビタミン D₃ 分解産物の一つである VDP1 に優れた抗ピロリ菌活性があることを明らかにした。しかしながら、ビタミン D₃ 分解

産物中には、VDP1 の他にも抗ピロリ菌活性を有する化学物質が含まれる可能性がある。今後、VDP1 以外の他のビタミン D₃ 分解産物の抽出・精製に着手し、それらビタミン D₃ 分解産物のピロリ菌に対する抗菌性について解析する必要があるかも知れない。

6. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導、ご協力くださった自治医科大学感染・免疫学講座細菌学部門の平井義一教授、下村裕史講師、北里大学医学部微生物学の林俊治教授、横浜薬科大学漢方薬学科天然物化学教室／創薬研究センターの高橋孝志教授、鰐渕清史講師、増井悠講師、その他多数の皆様に、深甚なる謝意を申し上げます。また、本研究の実施にあたっては、「自治医科大学大学院医学研究科研究奨励賞」の補助金を受けて研究を行った。

7. 引用文献

1. Marshall, B. Warren, J.R. Unidentified carved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* **1**: 1273-1274, 1983.
2. Fukase, K. Kato, M. Kikuch, S. Inoue, K. Uemura, N. Okamoto, S. Terao, S. Amagai, K. Hayashi, S. Asaka, M. Effect of eradication of *Helicobacter pylori* on incidence of metachronous gastric carcinoma after endoscopic resection of early gastric cancer: an open-label randomized controlled trial. *Lancet* **372**: 392-397, 2008.
3. Stolte, M. Bayerdörffer, E. Morgner, A. Alpen, B. Wündisch, T. Thiede, C. Neubauer, A. *Helicobacter* and gastric MALT lymphoma. *Gut* **50**: III19-III24, 2002.
4. Fujimura, K. *Helicobacter pylori* infection and idiopathic thrombocytopenic purpura. *Int J Hematol.* : 81(2),113-118, 2005.

5. Kobayashi, I. Murakami, K. Kato, M. Kato, S. Azuma, T. Takahashi, S. Uemura, N. Katsuyama, T. Fukuda, Y. Haruma, K. Nasu, M. Fujioka, T. Changing antimicrobial susceptibility epidemiology of *Helicobacter pylori* strains in Japan between 2002 and 2005. *J. Clin. Microbiol.* **45**: 4006-4010, 2007.
6. Francesco, V. De. Giorgio, F. Hassan, C. Manes, G. Vannella, L. Panella, C. Ierardi, E. Zullo, A. Worldwide *H. pylori* antibiotic resistance: a systematic review. *J. Gastrointestin. Liv. Dis.* **19**: 409-414, 2010.
7. Trifan, A. Girleanu, I. Cojocariu, C. Sfarti, C. Singeap, A. M. Dorobat, C. Grigore, L. Stanciu, C. Pseudomembranous colitis associated with a triple therapy for *Helicobacter pylori* eradication. *World J Gastroenterol.* **19**:7476-7479, 2013.
8. Shimomura, H. Hosoda, K. Hayashi, S. Yokota, K. Hirai, Y. Phosphatidylethanolamine of *Helicobacter pylori* functions as a steroid-binding lipid in the assimilation of free cholesterol and 3 β -hydroxyl steroids into the bacterial cell membrane. *J. Bacteriol.* **194**: 2658-2667, 2012.
9. Amgalanbaatar, A. Shimomura, H. Hosoda, K. Hayashi, S. Yokota, K. Hirai, Y. Antibacterial activity of a novel synthetic progesterone species carrying a linoleic acid molecule against *Helicobacter pylori* and the hormonal effect of its steroid on a murine macrophage-like cell line. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **140**: 17-25, 2014.
10. Hosoda, K. Shimomura, H. Hayashi, S. Yokota, K. Hirai, Y. Steroid hormones as bactericidal agents to *Helicobacter pylori*. *FEMS Microbiol. Lett.* **318**: 68-75, 2011.
11. Grady, L. T. Thakker, K. D. Stability of solid drugs: degradation of ergocalciferol (vitamin D₂) and cholecalciferol (vitamin D₃) at high humidities and elevated temperatures. *J. Pharm. Sci.* **69**: 1099-1102, 1980.
12. 細田浩一. ピロリ菌自身の活殺を左右する本菌のステロイド吸収.

13. Plietker, B. Niggemann, M. $\text{RuCl}_3/\text{CeCl}_3/\text{NaIO}_4$: a new bimetallic oxidation system for the mild and efficient dihydroxylation of unreactive olefins. *J. Org. Chem.* **70**: 2402-2405, 2005.
14. Shimomura, H. Hosoda, K. Hayashi, S. Yokota, K. Oguma, K. Hirai, Y. Steroids mediate resistance to the bactericidal effect of phosphatidylcholines against *Helicobacter pylori*. *FEMS Microbiol. Lett.* **301**: 84-94, 2009.
15. McGee, D. J. George, A. E. Trainor, E. A. Horton, K. E. Hildebrandt, E. Testerman, T. L. Cholesterol enhances *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics and LL37. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**: 2897-2904, 2011.
16. Trainor, E. A. Horton, K. E. Savage, P. E. Testerman, T. L. McGee, D. J. Role of the HefC efflux pump in *Helicobacter pylori* cholesterol-dependent resistance to ceragenins and bile salts. *Infect. Immun.* **79**: 88-97, 2011.
17. Shimomura, H. Hayashi, S. Yokota, K. Oguma, K. Hirai, Y. Alteration in the composition of cholesteryl glucosides and other lipids in *Helicobacter pylori* undergoing morphological change from spiral to coccoid form. *FEMS Microbiol. Lett.* **237**: 407-413, 2004.
18. Windaus, A. Grundmann, W. Über die konstitution des vitamins D_2 . II. *Justus Liebigs Annalen der Chemie.* **524**: 295-299, 1936.
19. Sicinski, R. R. DeLuca, H. F. Ruthenium tetroxide oxidation of Grundmann's ketone derivative from vitamin D_3 . *Bioor. Med. Chem. Lett.* **5**: 159-162, 1995.
20. Shokri, A. Larsson, G. Characterisation of the *Escherichia coli* membrane structure and function during fed batch cultivation. *Microb. Cell Fact.* **3**: 9, 2004.
21. Dunnick, J. K. O'Leary, W. M. Correlation of bacterial lipid composition with antibiotic resistance. *J. Bacteriol.* **101**: 892-900, 1970.

22. Amine, A. Saloua, K. S. Mouadh, M. Alya, E. I. M. Ahmed, M. [The absence of the “GATC-binding protein SeqA” affects DNA replication in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium] *DNA replication and related cellular processes* [Kusic-Tisma, J. (ed.)] 283-300, Rijeka, Croatia, 2011.
23. Gmeiner, J. Martin, H. H. Phospholipid and lipopolysaccharide in *Proteus mirabilis* and its stable protoplast L-form. *Eur. J. Biochem.* **67**: 487-494, 1976.
24. Zalkin, H. Law, J. H. Goldfine, H. Enzymatic synthesis of cyclopropane fatty acids catalyzed by bacterial extracts. *J. Biol. Chem.* **238**: 1242-1248, 1963.
25. Kearns, D. B. Robinson, J. Shimkets, L. J. *Pseudomonas aeruginosa* exhibits directed twitching motility up phosphatidylethanolamine gradients. *J. Bacteriol.* **183**: 763-767, 2001.
26. Beining, P. R. Huff, E. Prescott, B. Theodore, T. S. Characterization of the lipids of mesosomal vesicles and plasma membranes from *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **121**: 137-143, 1975.
27. Mathiasen, I. S. Lademann, U. Jäättelä, M. Apoptosis induced by vitamin D compounds in breast cancer cells is inhibited by Bcl-2 but does not involve known caspases or p53. *Cancer Res.* **59**: 4848-4856, 1999.
28. Baker, A. R. McDonnell, D. P. Hughes, M. Crisp, T. M. Mangelsdorf, D. J. Haussler, M. R. Pike, J. W. Shine, J. O'Malley, B. W. Cloning and expression of full-length cDNA encoding human vitamin D receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 3294-3298, 1988.
29. Haussler, M. R. Haussler, C. A. Jurutka, P. W. Thompson, P. D. Hsieh, J. C. Remus, L. S. Selznick, S. H. Whitfield, G. K. The vitamin D hormone and its nuclear receptor: molecular actions and disease states. *J. Endocrinol.* **154**: 557-573, 1997.
30. Thompson, P. D. Jurutka, P. W. Haussler, C. A. Whitfield, G. K. Haussler, M. R.

Heterodimeric DNA binding by the vitamin D receptor and retinoid X receptors is enhanced by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and inhibited by 9-*cis*-retinoic acid. *J. Biol. Chem.* **273**: 8483-8491, 1998.

31. Carlberg, C. Mechanisms of nuclear signaling by vitamin D₃ interplay with retinoid and thyroid hormone signaling. *Eur. J. Biochem.* **231**: 517-527, 1995.

32. Schröder, M. Nayeri, S. Kahlen, J. P. Müller, K. M. Carlberg, C. Natural vitamin D₃ response elements formed by inverted palindromes: polarity-directed ligand sensitivity of vitamin D₃ receptor-retinoid X receptor heterodimer-mediated transactivation. *Mol. Cell Biol.* **15**: 1154-1161, 1995.

33. Leers, M. P. Kölgen, W. Björklund, V. Bergman, T. Tribbick, G. Persson, B. Björklund, P. Ramaekers, F. C. Björklund, B. Nap, M. Jörnvall, H. Schutte, B. Immunocytochemical detection and mapping of a cytokeratin 18 neo-epitope expressed during early apoptosis. *J. Pathol.* **187**: 567-572, 1999.

34. Schutte, B. Henfling, M. Kölgen, W. Bouman, M. Meex, S. Leers, M. P. Nap, M. Björklund, V. Björklund, P. Björklund, B. Lane, E. B. Omary, M. B. Jörnvall, H. Ramaekers, F. C. Keratin 8/18 breakdown and reorganization during apoptosis. *Exp. Cell Res.* **297**: 11-26, 2004.

35. Bolanz, K. A. Hediger, M. A. Landowski, C. P. The role of TRPV6 in breast carcinogenesis. *Mol. Cancer Ther.* **7**: 271-279, 2008.

36. Bolanz, K. A. Kovacs, G. G. Landowski, C. P. Hediger, M. A. Tamoxifen inhibits TRPV6 activity via estrogen receptor-independent pathways in TRPV6-expressing MCF-7 breast cancer cells. *Mol. Cancer Res.* **7**: 2000-2010, 2009.

37. Kawaura, A. Takeda, E. Tanida, N. Nakagawa, K. Yamamoto, H. Sawada K. Okanoet T. Inhibitory effect of long term 1 α -hydroxyvitamin D₃ administration on

Helicobacter pylori infection. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **38**: 103-106, 2006.

38. Gombart, A. F. Borregaard, N. Koeffler, H. P. Human cathelicidin antimicrobial peptide (CAMP) gene is a direct target of the vitamin D receptor and is strongly up-regulated in myeloid cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *FASEB J. Res. Commun.* **19**: 1067-1077, 2005.

39. Meyer, M. B. Watanuki, M. Kim, S. Shevde, N. K. Pike, J. W. The human transient receptor potential vanilloid type 6 distal promoter contains multiple vitamin D receptor binding sites that mediate activation by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in intestinal cells. *Mol. Endocrinol.* **20**: 1447-1461, 2006.

40. Song, Y. Peng, X. Porta, A. Takanaga, H. Peng, J. B. Hediger, M. A. Fleet, J. C. Christakos, S. Calcium transporter 1 and epithelial calcium channel messenger ribonucleic acid are differentially regulated by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in the intestine and kidney of mice. *Endocrinol.* **144**: 3885-3894, 2003.

41. Christakos, S. Gabrielides, C. Rhoten, W. B. Vitamin D-dependent calcium binding proteins: chemistry, distribution, functional consideration, and molecular biology. *Endocrine Rev.* **10**: 3-26, 1989.

42. Demay, M. B. Kierman, M. S. DeLuca, H. F. Kronenberg, H. M. Sequences in the human parathyroid hormone gene that bind the 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor and mediate transcriptional repression in response to 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 8097-8101, 1992.

43. Shimada, T. Hasegawa, H. Yamazaki, Y. Muto, T. Hino, R. Takeuchi, Y. Fujita, T. Nakahara, K. Fukumoto, S. Yamashita, T. FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis. *J. Bone Mineral Res.* **19**: 429-435, 2004.

44. Kolek, O. I. Hines, E. R. Jones, M. D. LeSueur, L. K. Lipko, M. A. Kiela, P. R.

Collins, J. F. Haussler, M. R. Ghishan, F. K. $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D3 upregulates FGF23 gene expression in bone: the final link in a renal-gastrointestinal-skeletal axis that controls phosphate transport. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liv. Physiol.* **289**: G1036-G1042, 2005.

45. Yamamoto, R. Minamizaki, T. Yoshiko, Y. Yoshioka, H. Tanne, K. Aubin, J. E. Maeda, N. $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D3 acts predominantly in mature osteoblasts under conditions of high extracellular phosphate to increase fibroblast growth factor 23 production in vitro. *J. Endocrinol.* **206**: 279-286, 2010.

46. Noda, M. Vogel, R. L. Craig, A. M. Prah, J. DeLuca, H. Identification of a DNA sequence responsible for binding of $1,25$ -hydroxyvitamin D3 receptor and $1,25$ -hydroxyvitamin D3 enhancement of mouse secreted phosphoprotein 1 (*Spp-1* or osteopontin) gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 9995-9999, 1990.

47. Asaka, M. Sugiyama, T. Nobuta, A. Kato, M. Takeda, H. Graham, D. Y. Atrophic gastritis and intestinal metaplasia in Japan: results of a large multicenter study. *Helicobacter* **6**: 294-299, 2001.

48. Kobayashi, T. Kikuchi, S. Lin, Y. Yagyu, K. Obata, Y. Ogihara, A. Hasegawa, A. Miki, K. Kaneko, E. Mizukoshi, H. Sakiyama, T. Tenjin, H. Trends in the incidence of gastric cancer in Japan and their associations with *Helicobacter pylori* infection and gastric mucosal atrophy. *Gastric Cancer* **7**: 233-239, 2004.

49. Brehm, J. M. Celedón, J. C. Soto-Quiros, M. E. Avila, L. Hunninghake, G. M. Forno, E. Laskey, D. Sylvia, J. S. Hollis, B. W. Weiss, S. T. Litonjua, A. A. Serum vitamin D levels and markers of severity of childhood asthma in Costa Rica. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **179**: 765-771, 2009.

50. Mansbach, J. M. Ginde, A. A. Camargo, Jr. C. A. Serum 25 -hydroxyvitamin D

levels among US children aged 1 to 11 years: do children need more vitamin D?

Pediatrics **124**: 1404-1410, 2009.

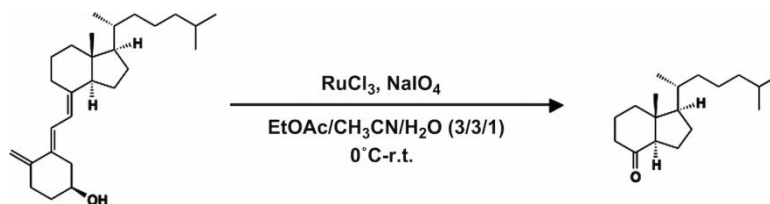


図 1. ビタミン D₃ の触媒的酸化反応による VDP1 の合成
塩化ルテニウム (RuCl₃) を触媒とし、過ヨウ素酸ナトリウム (NaIO₄) を酸化剤として用いたビタミン D₃ の酸化反応によって VDP1 (グランドマン・ケトン) が化学的に合成された。

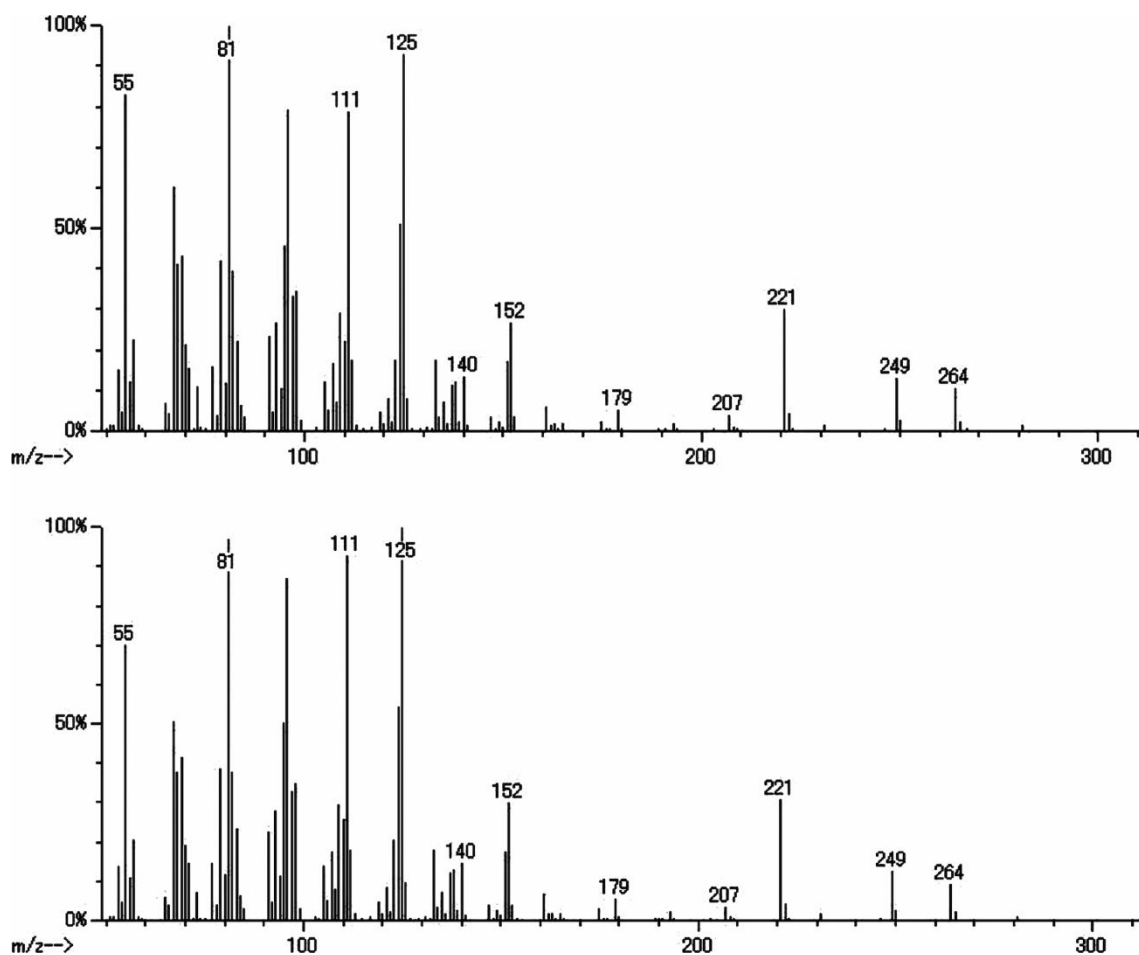


図 2. 精製 VDP1 および合成 VDP1 の質量スペクトルの比較
上図および下図は、精製 VDP1 および合成 VDP1 の GC-MS 分析による質量スペクトルをそれぞれ示す。

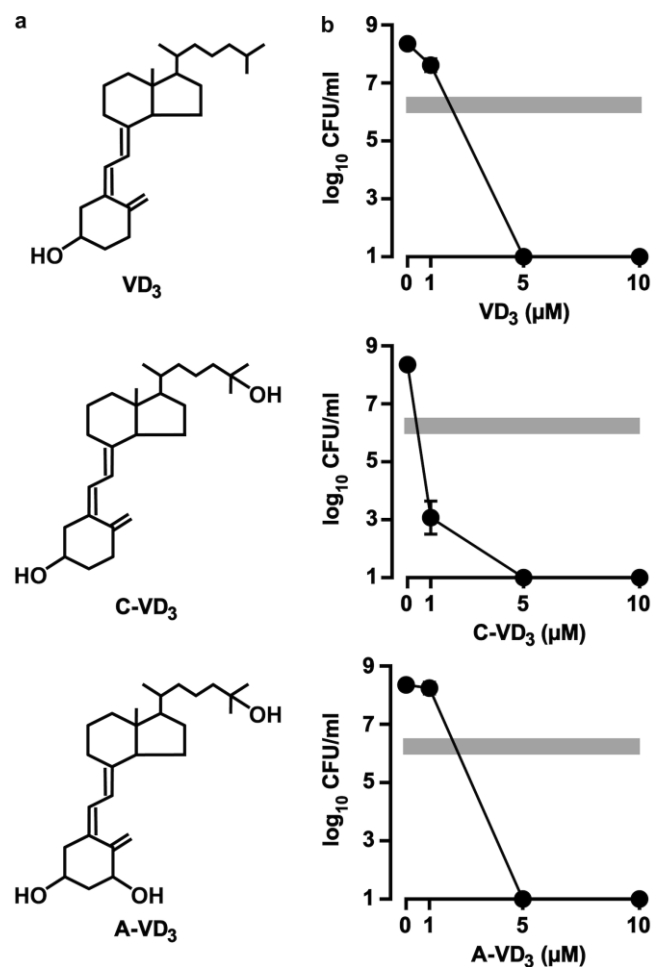


図 3. ビタミン D₃ およびその誘導体の抗ピロリ菌作用

(a) ビタミン D₃ (VD₃)、25-ヒドロキシビタミン D₃ (C-VD₃) および 1 α ,25-ジヒドロキシビタミン D₃ (A-VD₃) の化学構造. (b) 図に示した濃度のビタミン D₃ (VD₃)、25-ヒドロキシビタミン D₃ (C-VD₃) または 1 α ,25-ジヒドロキシビタミン D₃ (A-VD₃) 存在下で FC 不在ピロリ菌液 (1.5 ml) が、37°C の微好気条件下で 24 時間振盪放置された後、その菌液中の CFU が測定された。図は、独立した 3 回の実験から得られた平均 \log_{10} CFU \pm 標準偏差/ml で表される。図中の灰色の帯は、放置開始直後の CFU レベルを示す。実験に使用したピロリ菌株は、NCTC 11638 株であった。

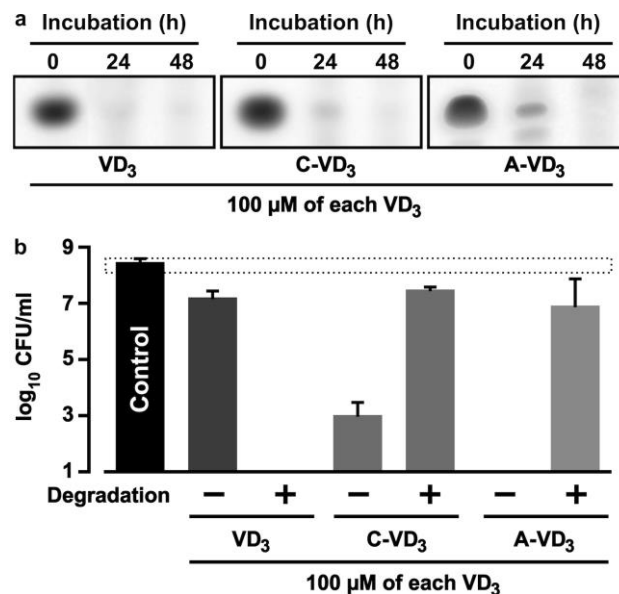


図 4. 非生物学的分解処理によるビタミン D₃ およびその誘導体の抗ピロリ菌活性の変化

(a) 70°C の蒸留水 (1.5 ml) に分散させた 100 μ M 濃度のビタミン D₃ (VD₃)、25-ヒドロキシビタミン D₃ (C-VD₃) または 1 α ,25-ジヒドロキシビタミン D₃ (A-VD₃) が、24 時間から 48 時間放置された後、有機溶媒分配法により回収された。回収された各試料 (全量) が、クロロホルム : アセトン : メタノール (9:1:1) 展開溶媒系の TLC によって解析された。(b) 実験 a と同じ方法で 48 時間後に回収された VD₃、C-VD₃ または A-VD₃ の各試料 (全量) が、FC 不在ピロリ菌液 (1.5 ml) に添加され、37°C の微好気条件下で 2 時間振盪放置された後、その菌液中の CFU が測定された (図中のプラス記号)。図中のマイナス記号は、分解未処理の 100 μ M 濃度の VD₃、C-VD₃ または A-VD₃ と共に 2 時間振盪放置された時の FC 不在ピロリ菌液 (1.5 ml) 中の CFU を示す。図中の Control は、ビタミン D₃ およびその誘導体のいかなる試料も存在しない状態で 2 時間振盪放置された時の FC 不在ピロリ菌液 (1.5 ml) 中の CFU を示す。図は、独立した 3 回の実験から得られた平均 log₁₀ CFU \pm 標準偏差 / ml で表される。図中の破線の帯は、放置開始直後の CFU レベルを示す。実験に使用したピロリ菌株は、NCTC 11638 株であった。

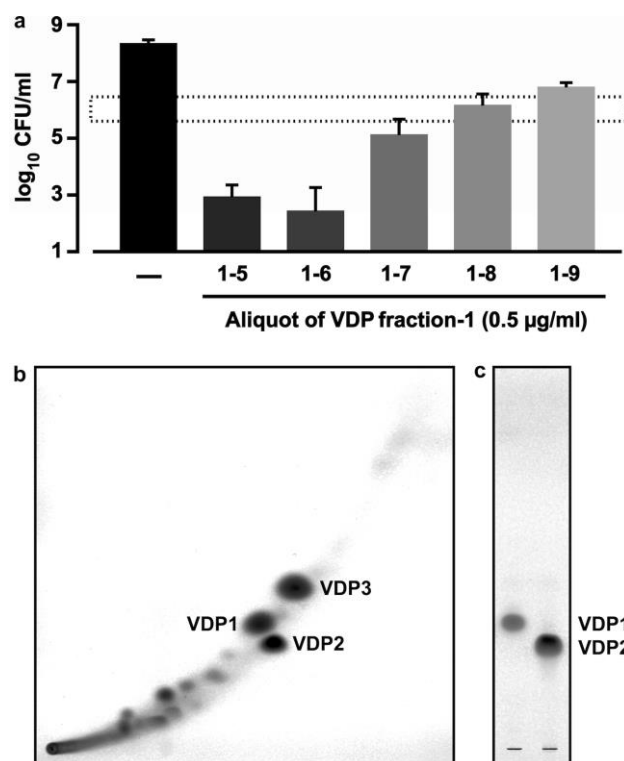


図 5. ビタミン D₃ 分解産物の抗ピロリ菌活性

(a) 70°C の蒸留水に分散させたビタミン D₃ が、1 週間放置された後、有機溶媒分配法により回収され、クロロホルム：アセトン溶媒を液相に用いたシリカゲル・カラム・クロマトグラフィーによって 4 画分に粗分画された。粗分画された中の画分 1 が、ジエチルエーテル：クロロホルム溶媒を液相に用いたシリカゲル・カラム・クロマトグラフィーによって、さらに 9 画分に分画され、得られた各画分試料 (0.5 µg/ml) が、FC 不在ピロリ菌液 (1.5 ml) に添加された。添加後、37°C の微好気条件下で 24 時間盪振放置されたピロリ菌液中の CFU が測定された。図中のマイナス記号は、いかなる画分試料も存在しない状態で放置されたピロリ菌液中の CFU を示す。図は、独立した 3 回の実験から得られた平均 log₁₀ CFU ± 標準偏差/ml で表される。図中の破線の帯は、放置開始直後の CFU レベルを示す。実験に使用したピロリ菌株は、NCTC 11638 株であった。(b) 図 a の画分 1-5 および 1-6 が収集された後、その 200 µg 量が、ヘキサン：ジエチルエーテル (6:4) およびヘキサン：酢酸エチル (10:1) 溶媒を用いた 2 次元 TLC によって解析された。(c) HPLC によって精製された VDP1 および VDP2 の各 50 µg 量が、ヘキサン：酢酸エチル (10:1) 展開溶媒系の TLC によって解析された。

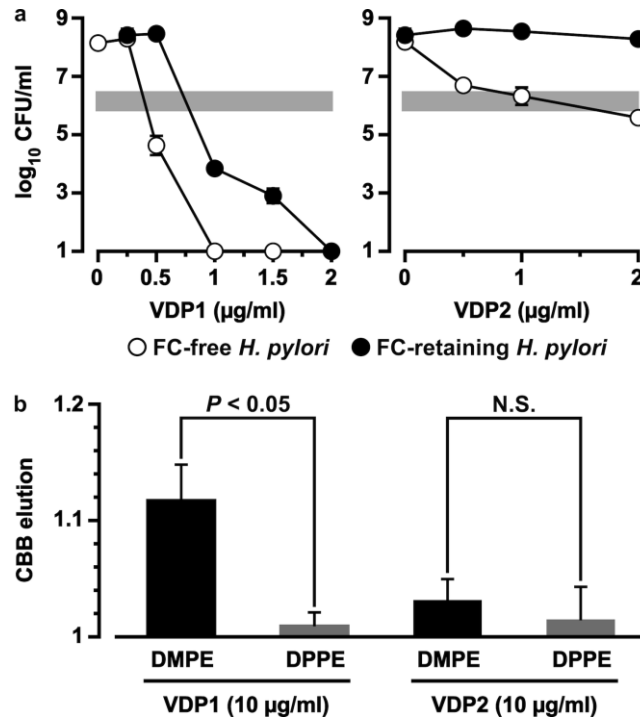


図 6. 精製 VDP1 および VDP2 の抗ピロリ菌活性
および PE ベシクルに対する結合親和性

(a) FC 不在ピロリ菌 (○) または FC 保持ピロリ菌 (●) が、図に示した濃度の精製 VDP1 または VDP2 と共に 37°C の微好気条件下で 24 時間振盪放置された後、CFU が測定された。図は、独立した 3 回の実験から得られた平均 \log_{10} CFU \pm 標準偏差/ml で表される。図中の灰色の帯は、放置開始直後の CFU レベルを示す。実験に使用したピロリ菌株は、NCTC 11638 株であった。(b) DMPE または DPPE で調製された CBB 包含 PE ベシクルが、図に示した濃度の精製 VDP1 または VDP2 と共に 37°C で 2 時間振盪放置された後、PE ベシクルから上清中に溶出した CBB が、波長 590 nm の吸光度 ($A_{590\text{ nm}}$) によって検出された。図は、VDP1 または VDP2 非存在下で放置した PE ベシクル上清の $A_{590\text{ nm}}$ を 1 とした時の相対的な $A_{590\text{ nm}}$ を示めす。DMPE ベシクルおよび DPPE ベシクルからの CBB 溶出レベルの統計学的有意性 ($P < 0.05$) が、独立した 3 回の対実験から得られた数値に基づく t -検定によって算出された。図中の N. S. は、統計学的有意性がないことを表す。

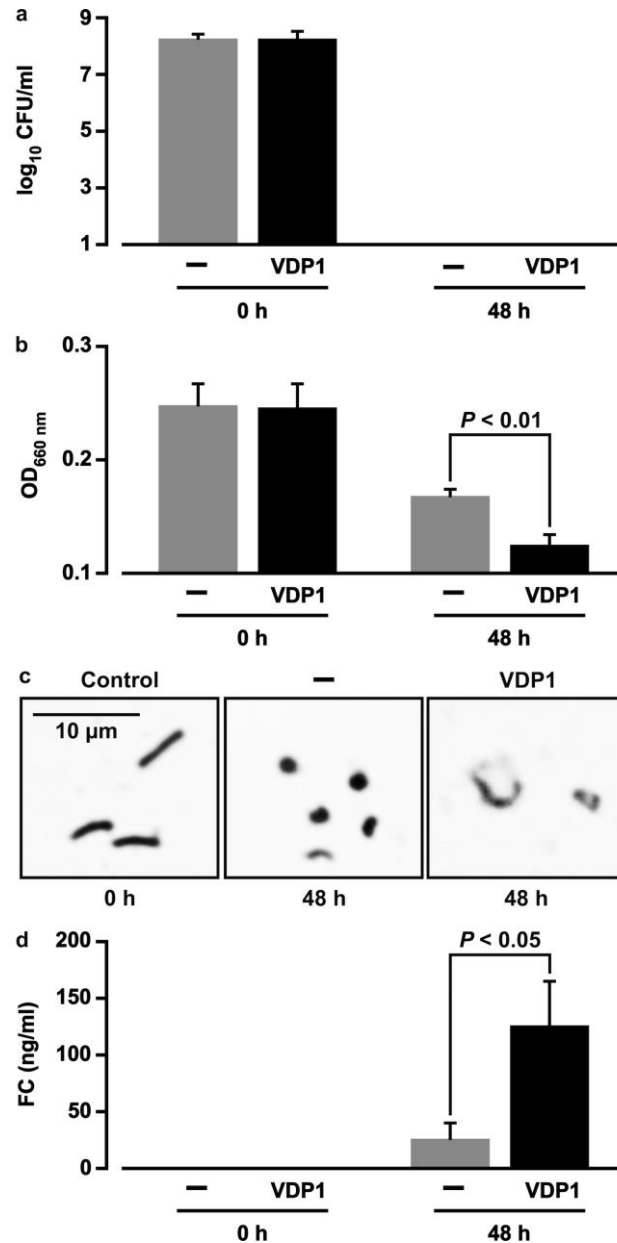


図 7. 精製 VDP1 のピロリ菌に対する抗菌作用機序

(a) PBS を用いて調製された FC 保持ピロリ菌液 (5 ml) が、10 $\mu\text{g/ml}$ 濃度の精製 VDP1 存在または非存在 (マイナス記号) 下で、37°C の嫌気条件下で 48 時間振盪放置された後、その菌液中の CFU が測定された。図は、独立した 3 回の実験から得られた平均 \log_{10} CFU \pm 標準偏差 / ml で表される。図中の 0 h は、放置開始直前の CFU レベルを示す。実験に使用したピロリ菌株は、NCTC 11638 株であった。(b) 実験 a と同じ方法で得られた菌液の $OD_{660\text{ nm}}$ が測定された。VDP1

存在および非存在下における $OD_{660\text{ nm}}$ の統計学的有意性 ($P < 0.01$) が、独立した 3 回の対実験からえられた数値に基づく t -検定によって算出された。図中の 0 h は、放置開始直前の $OD_{660\text{ nm}}$ を示す。(c) 実験 a と同じ方法で得られた菌液中のピロリ菌細胞が、顕微鏡下で観察された。図中の 0 h (control) は、放置開始直前のピロリ菌の形態を示す。(d) 実験 a と同じ方法で得られた菌液の上清中の FC 量が、塩化第二鉄・硫酸法によって定量された。VDP1 存在および非存在下における上清 FC 量の統計学的有意性 ($P < 0.05$) が、独立した 3 回の対実験から得られた数値に基づく t -検定によって算出された。

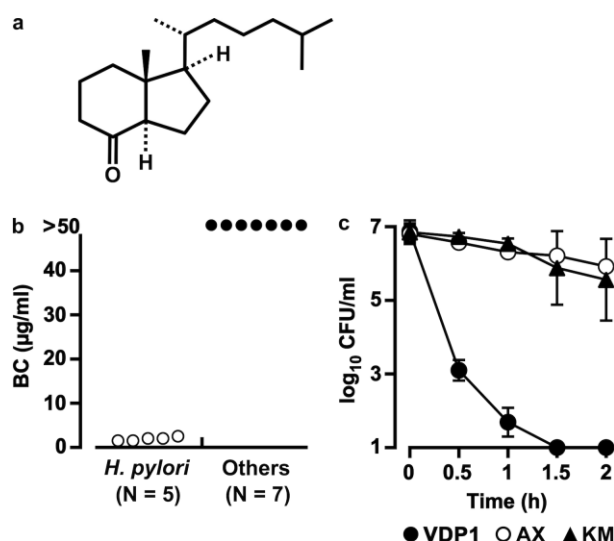


図 8. 合成 VDP1 のピロリ菌および他の細菌種に対する抗菌性

(a) VDP1 の化学構造. (b) 種々の濃度の合成 VDP1 存在下で、FC 保持ピロリ菌または他の細菌種が、 37°C の微好気条件下で 24 時間振盪放置された後、CFU が測定され、菌コロニーが検出されなくなる濃度 (殺菌濃度: BC) が決定された。実験に使用したピロリ菌株は、NCTC 11638 株、ATCC 43504 株、26695 株、臨床分離株の A-13 株および A-19 株の 5 菌株であった。実験に使用した他の 7 菌種は、大腸菌、サルモネラ、肺炎桿菌、プロテウス、セラチア、緑膿菌および黄色ブドウ球菌であった。(c) $2\text{ }\mu\text{g/ml}$ 濃度の合成 VDP1、アモキシシリン (AX) またはカナマイシン (KM) 存在下で、FC 保持ピロリ菌液 (1.5 ml) が、図に示した時間まで 37°C の微好気条件下で振盪放置された後、その菌液中の CFU が測定された。図は、独立した 3 回の実験から得られた平均 \log_{10} CFU \pm 標準偏差 / ml で表される。

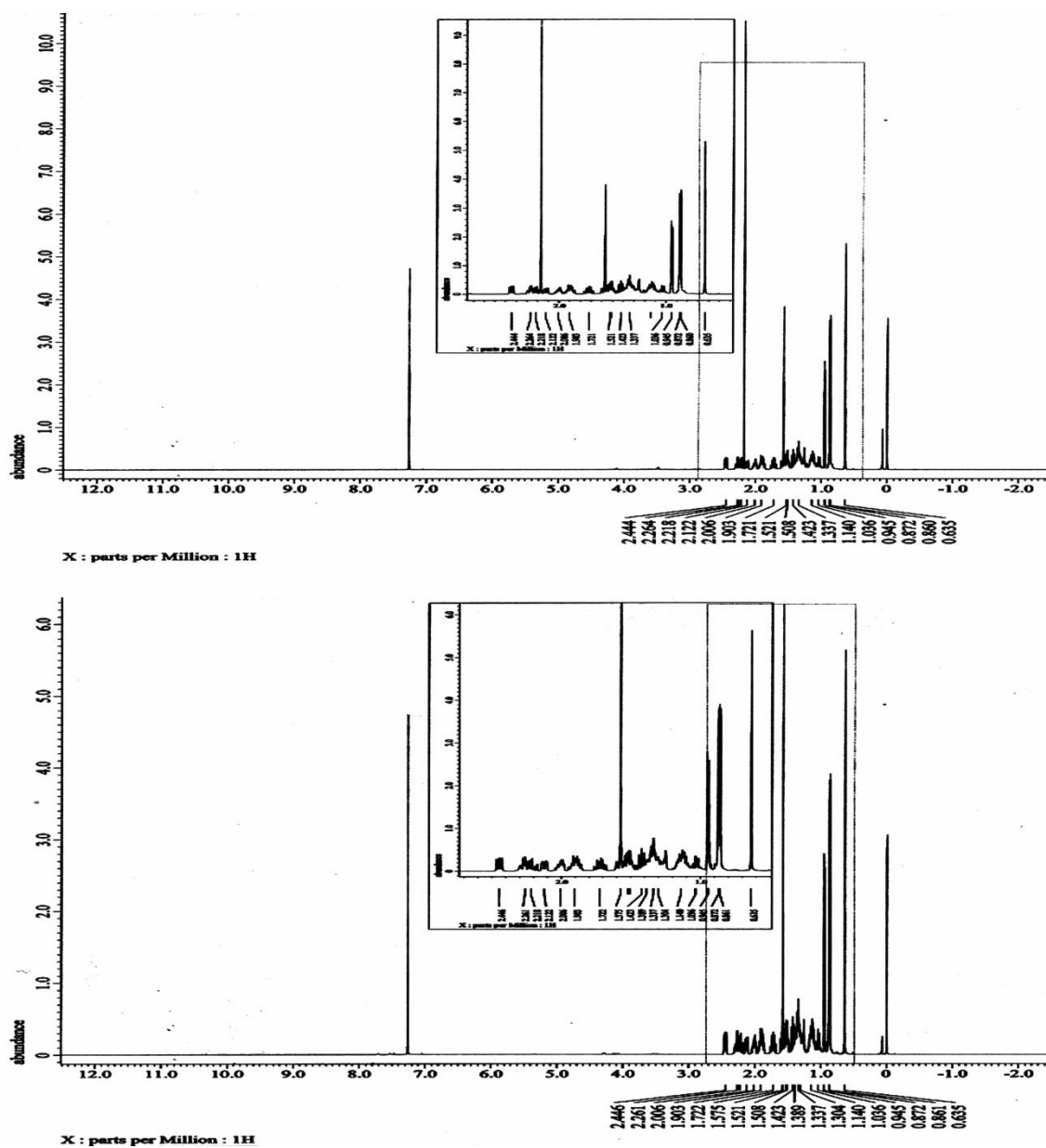


図 9. 精製 VDP1 および合成 VDP1 の ^1H NMR シグナルの比較
 上図および下図は、精製 VDP1 および合成 VDP1 の ^1H NMR 分析による化学シフトのスペクトルをそれぞれ示す。

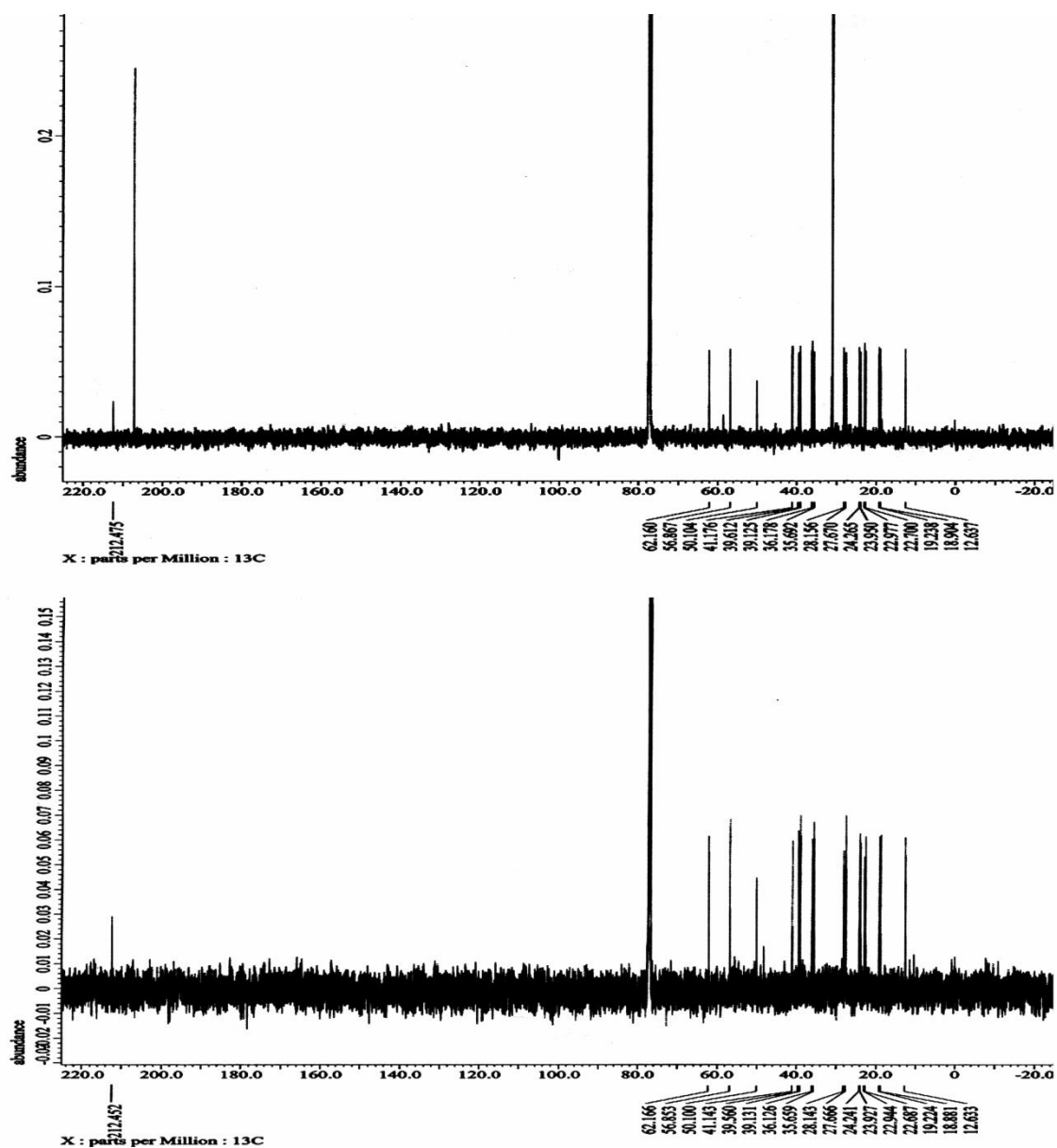


図 10. 精製 VDP1 および合成 VDP1 の ^{13}C NMR シグナルの比較
 上図および下図は、精製 VDP1 および合成 VDP1 の ^{13}C NMR 分析による化学シフトのスペクトルをそれぞれ示す。

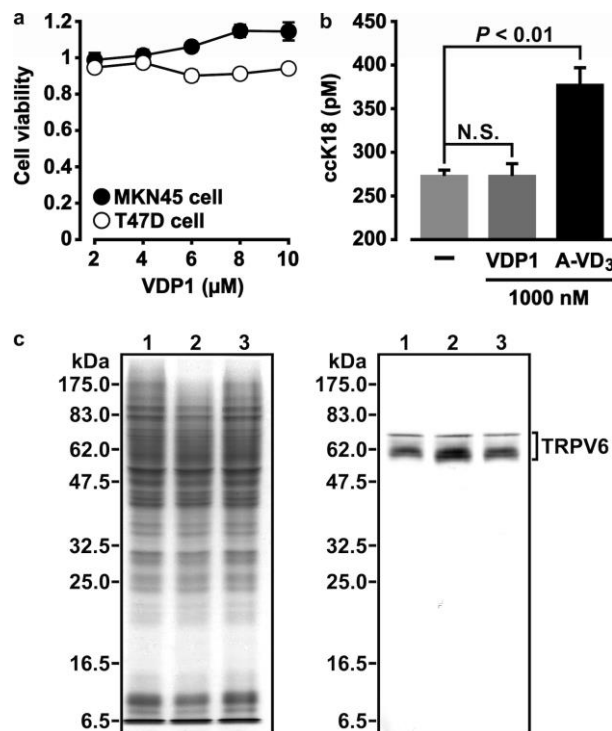


図 11. 合成 VDP1 のヒト細胞に対する毒性およびビタミン D₃ 様活性の欠如
 (a) 図に示した濃度の合成 VDP1 存在下で、MKN45 細胞または T47D 細胞が 72 時間培養され、MTT 試薬を用いて生細胞が検出された。図は、VDP1 非存在下で培養した細胞の生存率を 1 とした時の相対的な細胞の生存率を示し、独立した 3 回の実験から得られた平均細胞生存率 ± 標準偏差で表される。
 (b) 図に示した濃度の合成 VDP1 または 1α,25-ジヒドロキシビタミン D₃ (A-VD₃) 存在下で T47D 細胞が 72 時間培養され、培養上清中の ccK18 が、ELISA によって測定された。A-VD₃ 存在および非存在下における ccK18 量の統計学的有意性 ($P < 0.01$) が、独立した 3 回の対実験から得られた数値に基づく *t*-検定によって算出された。
 (c) 1000 nM 濃度の合成 VDP1 または A-VD₃ 存在下で、T47D 細胞が 72 時間培養された後、その細胞融解液 (5 μl) 中のタンパク質が SDS-PAGE に供され、CBB 染色によって検出された (左図)。或いは、SDS-PAGE 後のウェスタン・ブロット法によって TRPV6 タンパク質が検出された (右図)。レーン 1、2 および 3 は、未刺激 T47D 細胞、A-VD₃ 刺激 T47D 細胞および合成 VDP1 刺激 T47D 細胞の細胞融解液中のタンパク質像をそれぞれ示す。