

곰팡이에서 분리한 *Helicobacter pylori* 항균물질의 분리 및 구조규명

남궁준* · 연승우 · 백남수 · 김태한 · 김영호¹ · 김창진² · 김기원

일동제약(주) 중앙연구소, ¹충남대학교 약학대학, ²한국과학기술연구원 생명공학연구소

Isolation and Structural Determination of Anti-*Helicobacter pylori* Compound from Fungus 60686. Namgoong, June*, Seung-Woo Yeon, Nam-Soo Paek, Tae-Han Kim, Young-Ho Kim¹, Chang-Jin Kim² and Kee-Won Kim. Research Laboratories, Ildong Pharmaceutical Co., ¹College of Pharmacy, Chungnam National University, ²Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, KIST-*Helicobacter pylori* is a Gram-negative bacterium which causes chronic gastritis and is associated with gastric ulcer, duodenal ulcer and gastric carcinoma. In the process of screening of antibacterial activities against *H. pylori* from soil microorganisms, fungus No. 60686 was isolated. After fermentation of No.60686, the antibacterial compound was isolated, purified and followed by extraction of mycelium with organic solvents, acetone and ethyl acetate, through silica gel chromatography, LH-20 gel chromatography and HPLC. As a result of the structural analyses of the compound by IR, ¹H- and ¹³C-NMR, FAB/Mass spectrophotomer, the compound having the antimicrobial activity was identified as chaetoglobosin A (C₃₂H₃₆N₂O₅), a cytochalasan derivative. The antimicrobial activity of chaetoglobosin A was tested against Gram-positive and negative bacteria by paper disk method. Among the test strains of 9 Gram-positive bacteria and 18 Gram-negative bacteria containing 4 *H. pylori* strains, the growth of 4 *H. pylori* strains and 3 *S. aureus* strains (SG 511, 285 and 503) was only inhibited by chaetoglobosin A. Also it was shown that its growth inhibition against *H. pylori* strains was stronger than that against *S. aureus* strains at the treatment of the same concentration. Therefore it was concluded that chaetoglobosin A has a specific growth inhibition against *H. pylori* of the tested bacteria.

Key words: *Helicobacter pylori*, chaetoglobosin A, antimicrobial activity

만성위염, 위궤양, 십이지장궤양, 위염발생과 소화성궤양의 원인균으로 알려진 *H. pylori*는 1982년 Warren과 Marshall에 의해 보고된 이래 균의 생리적 특성과 병원 발생 기작 등을 밝히기 위한 많은 연구가 진행되고 있다 [4, 9, 11, 13, 14, 18, 19]. 주로 위점막에서 서식하고 있는 *H. pylori*는 그람음성 나선균으로, 미호기성균주이고 urease에 의해 urea를 가수분해하여 ammonia를 발생시켜서 균주위를 중화하여 산성조건인 위내환경에서 생존한다[6,10]. *H. pylori*의 병원성 기작은 아직 완전히 밝혀지지 않았지만 위내에 존재하는 *H. pylori*가 urease를 이용해 위내 urea를 분해하여 생기는 ammonia가 위 표피세포를 손상시키며, Vac A와 같은 세포독성물질을 생성하여 위 표피세포를 피사시키고, *H. pylori*의 lipopolysaccharide가 위점막의 glycosylation과 sulfation을 저해하여 mucin의 구조변화를 일으켜 위 표피세포가 위산에 쉽게 노출되도록 하는 작용을 나타내는 것으로 알려졌다[8, 12]. 최근에는 *H. pylori*감염에 의해 일어나는 염증반응과 대식세포작용에 의해 생성되는 반응성이 높은 유리산소에 의해 표피세포의 DNA를 손상시키는 결과를

보여 위암 발생의 원인이 될 수 있음을 보여주고 있다[2].

지금까지 많은 항생제들이 *H. pylori*에 대해 우수한 항균 효과가 있는 것으로 알려져 있으나 단일 항생제에 의한 *H. pylori*박멸은 성공하지 못하고 있다. 현재 *H. pylori* 치료법으로는 bismuth제제와 metronidazole과 함께 tetracycline 또는 amoxicillin을 병용 처리하는 일반적인 3중요법과 bismuth제제, omeprazole, tetracycline과 metronidazole을 혼합한 4중요법 등이 *H. pylori*에 우수한 치료효과를 나타낸다고 보고되어 있으나 항생제 투여에 의한 내성균주 출현 및 위내에서의 약물의 침투성과 치료 후에 다시 성장이 억제되어있던 균이 재증식하는 문제가 지적되고 있다[5]. 이런 이유로 *H. pylori*에 특이적인 항균물질을 탐색하려는 수많은 노력이 이루어졌으나 최근에 Koen[3] 등에 의해 *Phanerochaete velutina*에서 분리된 phthalide 화합물 외에는 아직까지 보고가 되고있지 않다.

따라서 특이적이며, 안전한 항균물질이 *H. pylori*의 효과적 치료를 위해서 필요하며 본 연구에서는 *H. pylori*에 특이적인 항균물질을 탐색하기 위해 국내토양에서 분리한 곰팡이와 방선균배양액을 대상으로 검색하여 *H. pylori*에 특이적인 항균활성을 나타내는 곰팡이주를 선별하였다. 선별된 곰팡이주를 발효 배양하여 얻은 균체를 대상으로 항균물질을 분리 정제한 후 구조규명을 수행하였으

*Corresponding author
Tel. 82-334-73-1701, Fax. 82-334-73-4860
E-mail: ilreslab@soback.kornet.nm.kr

며, 항균활성을 살펴보았다.

재료 및 방법

사용균주의 배양 및 검정

*H. pylori*는 경상대학교 의과대학에서 분양 받은 임상 균주를 사용하였으며, 균주의 확인을 위해 현미경관찰, 그람염색, catalase와 urease test를 행하였다[1, 7]. *H. pylori*배양을 위한 고체배지로는 bovine calf serum(Hyclone Co.)이 10% 첨가된 Mueller Hinton agar(Difco Co.)를 사용하였고 액체배지로는 bovine calf serum이 10% 첨가된 Mueller Hinton broth(Difco Co.)를 이용하였다. *H. pylori*배양은 37°C, 10% CO₂ 배양기에서 과습한 상태를 유지하면서 배양했으며, 보존은 peptone 1%, glycerol 30%가 첨가된 Mueller Hinton broth에 균을 현탁해 액체질소에 보관하였다.

항균활성을 알아보기 위해 사용한 그람양성 9주와 그람음성 14주는 고체배지로 Mueller Hinton agar plate를 사용하였고 액체배지로는 Mueller Hinton broth를 이용하여 37°C에서 배양을 하였다.

*H. pylori*에 특이적인 항균물질생성균주의 검색

검색시료로는 생명공학연구소 Bio신소재연구부에서 분양받은 토양에서 분리한 방선균액과 곰팡이배양 추출액을 이용하였다. 항균물질을 생성하는 균주의 항균력을 측정하기 위해 bovine calf serum이 10% 첨가된 Mueller Hinton broth에서 2일간 배양한 *H. pylori*를 bovine calf serum이 10% 첨가된 0.7% Mueller Hinton agar 4 ml에 균수가 2.5×10^5 /ml가 되도록 현탁한 후 bovine calf serum이 10%첨가된 Mueller Hinton agar plate에 도말하였다. *Bacillus subtilis*와 *Escherichia coli*는 Mueller Hinton broth에서 16시간 배양한 후 0.7% Mueller Hinton agar 4 ml에 균수가 2.5×10^4 /ml가 되도록 현탁 후 Mueller Hinton agar plate에 도말하였다. Plate위에 도말한 배지가 굳으면 시험하고자하는 배양액 또는 배양 추출액이 흡수된 paper disk(Φ 8 mm, Advantec Co.)를 얹어 각 균의 배양조건에 따라 24시간 배양한 후 나타나는 투명환 크기를 측정하는 paper disk법을 이용하여 각 균에 대한 항균력을 알아보았다. 특이적인 항균물질생성 균주의 선별기준은 그람양성인 *B. subtilis*와 그람음성인 *E. coli*와 *H. pylori*를 대상으로 항균력을 측정하여 *H. pylori*에만 항균활성을 나타내는 균주를 선별하였다.

항균물질을 생성하는 균주의 배양

항균물질을 생성하는 곰팡이 균주번호 60686을 28°C에서 F배지(2% glucose, 0.2% yeast extract, 0.5% polypeptone, 0.05% MgSO₄, 0.1% K₂HPO₄, pH 5.8) 50

ml에 접종하여 3일간 진탕배양한 후, 4 l F배지가 들어있는 5 l jar fermentor(BIOFLOIIc, NBS Co.)에 5%되게 접종하여 28°C, 500 rpm, 통기량 1 vvm조건으로 9일간 배양하였다. 배양이 완료된 후 배양액을 10000 rpm에서 5분간 원심분리하여 균체와 배양액을 분리 수거하여 항균물질 분리를 위한 시료로 사용하였다.

항균물질의 구조분석 및 이화학적 특성조사

UV spectrum은 MeOH를 용매로 사용하여 Shimadzu UV260 spectrophotometer로 측정했고, fast atom bombardment-mass(FAB-MS)spectrum은 Jeol HX-100 (FAB-MS)을 사용했으며, infrared(IR) spectrum은 Shimadzu IR-470 infrared spectrophotometer를 사용하여 최종 분리된 항균물질과 KBr를 혼합한 후 측정하였다. 구조분석을 위한 NMR측정은 100% dimethylsulphoxide-*d*6(DMSO-*d*6)를 용매로 이용하여 Varian UNITY-300 spectrophotometer를 사용해 측정하였다.

항균물질의 항균력과 세포독성도 조사

HPLC에 의해 최종 분리된 항균물질의 항균활성을 *H. pylori* 임상균주 4주와 그람양성 9주와 그람음성 14주에 paper disk법을 이용하여 37°C에서 24시간 배양시킨 후 생성된 투명환 크기를 측정하여 파악하였다. 또한 항균물질의 세포독성도를 fetal bovine serum이 10% 첨가된 RPMI 1640(Gibco BRL Co.)배지에서 배양한 인체 유래 암세포인 위암세포주 SNU 1과 대장암세포주 SNU C4 그리고 자궁암세포주인 HeLa 세포주를 대상으로 시료를 처리한 후 생존 세포의 단백질을 정량하여 이를 세포독성의 지표로 하는 sulforhodamine B(SRB)방법으로 측정하였다[17].

결과 및 고찰

H. pylori 항균물질 생성균주의 검색

토양에서 분리된 곰팡이, 방선균 3000주의 배양액으로부터 *H. pylori*에 대한 항균력을 검색한 결과 항균력을 나타내는 균주도 다수 있었으나, 항균력의 선택특이성을 알아보기 위해 사용된 *E. coli*나 *B. subtilis*균주에는 항균력을 보이지 않고 *H. pylori*균에만 항균력을 나타내는 곰팡이 균주번호 60686을 선별하였다.

항균물질의 분리정제

곰팡이균주 60686으로부터 *H. pylori*에 대한 특이적인 항균물질의 추출 및 정제과정은 Fig. 1과 같이 수행하여 단일물질로 정제하였다. Jar fermentor 배양이 완료된 배양액을 10000 rpm에서 원심 분리하여 균체와 배양액을 분리한 후 균체를 100% acetone으로 추출하였다. 이 acetone 추출액에 다시 동량의 ethyl acetate로 재추출

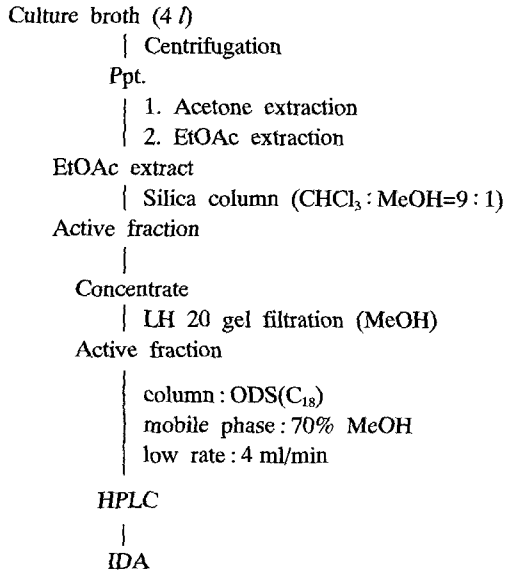


Fig. 1. Isolation procedure of IDA.

하여 ethyl acetate층을 회수하여 감압농축하였다. 농축물을 methanol에 용해시켜 silica column gel 60(Merck Co, mesh 230~400)에 흡착시킨 후 CHCl₃-methanol(9:1)용매로 전개하여 항균활성 분획을 분리하였다. 활성분획을 농축하여 methanol에 용해시켜 Sephadex LH-20 column(Pharmacia LKB)에 충전시키고 methanol로 전개시켜 활성분획을 얻었다. 농축된 활성분획을 methanol에 용해시켜 reversed phase HPLC (Spectraphysics, YMC ODS column C₁₈, mobile phase: 70% methanol, flow rate: 1 ml/min, detection: 280 nm)를 이용하여 retention time이 15.99 min인 항균활성물질 IDA(II Dong Antibiotic)를 분리 정제하였다. 분리 정제 과정에서 항균활성물질의 확인은 *H. pylori* 임상균주 4주를 대상으로 paper disk법으로 확인하였다.

항균물질의 이화학적 특성 및 구조분석

HPLC에 의해 최종 분리된 항균물질 IDA를 농축하였을 때 pale yellow powder상을 나타냈다. 항균물질 IDA의 이화학적특성을 알아보기 위해 용해도, UV 흡광도 및

Table 1. Physio-chemical properties of IDA

Appearance	Pale yellow powder
FAB-MS m/z	Positive: 530 (M+H) ⁺
Molecular weight	528.647
Molecular formular	C ₃₂ H ₃₆ N ₂ O ₅
UV λ _{max} (in MeOH)	220, 280 nm
IR ν (KBr)cm ⁻¹	3000, 2300, 1680, 1500, 1420, 1400, 1320
Solubility	Soluble in MeOH, acetone, DMSO, CHCl ₃ , EtOAc

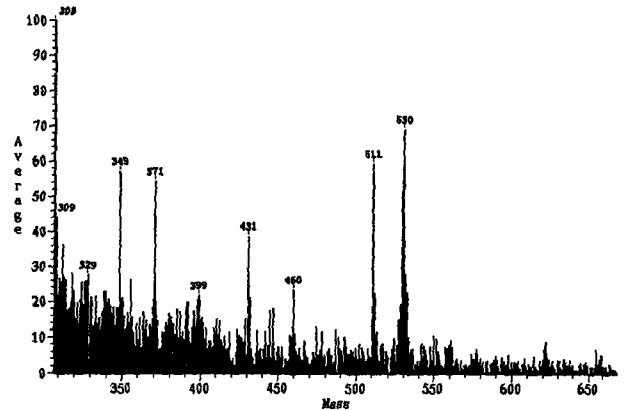


Fig. 2. FAB/Mass spectrum of IDA.

IR spectrum을 조사하였고 그 결과는 Table 1에 나타내었다. 그리고 화학구조분석을 위해 FAB-MS(Fig. 2)와 ¹H-NMR과 ¹³C-NMR을 이용하여 분석하였다. 항균물질

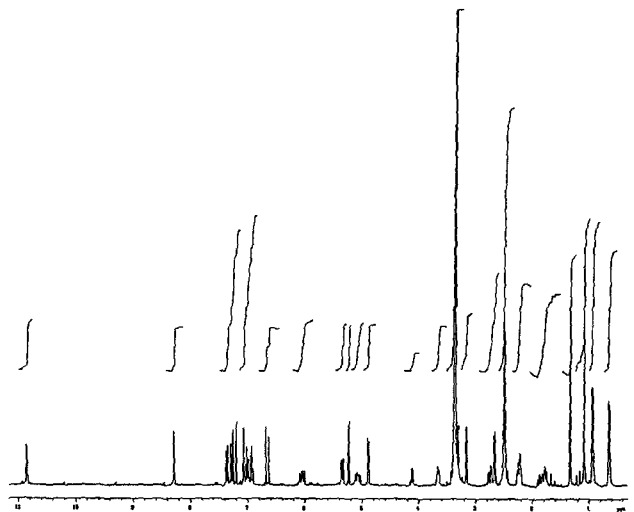


Fig. 3. ¹H-NMR spectrum of IDA.

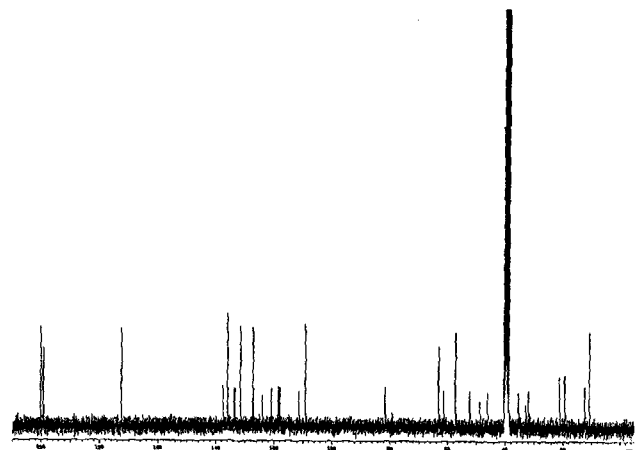


Fig. 4. ¹³C-NMR spectrum of IDA.

Table 2. ^1H and ^{13}C NMR data for IDA

No	^1H			^{13}C	
	δ (ppm)	Coupling pattern	J(Hz)	δ (ppm)	Multiplicity
1'(NH)	10.86	d	1.9	-	-
2'	7.08	d	1.9	120.9	CH
3'	-			109.2	C
3'a	-			127.4	C
4'	6.91-7.38			118.0	CH
5'	6.91-7.38			124.1	CH
6'	6.91-7.38			118.5	CH
7'	6.91-7.38			111.4	CH
1'a	-			136.1	C
10	2.46, 2.75	m, dd	14.1, 4.8	32.7	CH ₂
2(NH)	8.30	s		-	-
3	3.66	m		52.2	CH
4	*			45.9	CH
11	0.64	d	7.2	12.2	CH ₃
5	1.72	m		35.3	CH
12	1.09	s		19.2	CH ₃
6	-			57.1	C
7	2.66	d	5.4	61.3	CH
8	2.21	m		46.1	CH
13	6.05	dd	15.9, 9.6	127.1	CH
14	5.08	m		133.5	CH
15	1.80-2.30	m		40.2	CH ₂
16	#			31.8	CH
16-CH ₃	0.94	d	6.3	21.0	CH ₃
17	5.35	d	9.6	137.6	CH
18	-			131.6	C
18-CH ₃	1.34	s		10.6	CH ₃
19	4.89	d	4.5	81.6	CH
19a	*			-	-
20(C=O)	-			200.4	C
21	7.33	d	16.9	135.9	CH
22	6.65	d	16.9	133.8	CH
23(C=O)	-			199.4	C
9(C=O)	-			63.0	C
1(C=O)	-			172.7	C

*overlapping with H₂O signal, #overlapping with solvent

IDA는 MeOH, CHCl₃, acetone, DMSO와 EtOAc 용매에 용해되었다. 항균물질 IDA를 200 nm에서 500 nm까지의 흡수 spectrum을 조사한 결과 220, 280 nm에서 최대 흡광도를 나타냈다. IR spectrum분석결과 3400 cm⁻¹ peak로써 -OH기가, 3050 cm⁻¹ peak로써 aromatic -CH기가, 2900 cm⁻¹ peak로써 aliphatic -CH기가, 1680 cm⁻¹ peak로써 α , β -unsaturated -C=O기가 존재함을 알 수 있었다. FAB mass spectrum결과 항균물질 IDA의 분자량은 530에서 [M+H]⁺peak를 보였다. ^1H -NMR과 ^{13}C -NMR의 spectrum은 각각 Fig. 3과 4와 같다. 여

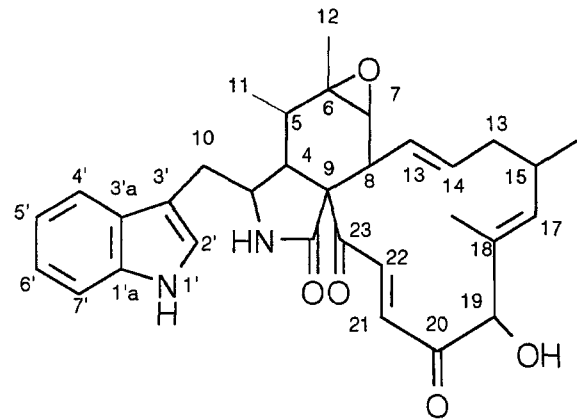


Fig. 5. Structure of IDA.

기서 얻어진 spectral data는 Table 2와 같으며, 이 결과는 Setsuko[15,16] 등에 의해 발표된 *Chaetominum globosum*에서 분리한 chaetoglobosin A의 ^1H -NMR과 ^{13}C -NMR의 spectral data와 일치하여 *H. pylori*에 항균력을 나타내는 항균물질 IDA가 곰팡이의 2차대사산물인 cytochalasan의 전형적 구조를 갖는 chaetoglobosin A (Fig. 5)임을 확인하였다.

항균물질 IDA의 항균력과 세포독성도

항균물질 IDA의 항균력을 알아보기 위해 amoxicillin과 gentamicin을 대조약물로 사용하여 시험균주에 대한 항균력을 알아본 결과는 Table 3과 같다. IDA의 처리농도가 대조약물과 동일한 농도인 5 $\mu\text{g}/\text{disk}$ 로 처리시에는 항균력을 보이지 않았지만, 50 $\mu\text{g}/\text{disk}$ 처리시에는 amoxicillin과 gentamicin이 시험균주 전체에 걸쳐 광범위하게 항균력을 나타내는 것과는 대조적으로 그람양성에서는 *S. aureus* SG 511과 *S. aureus* 503 2주에서만 항균력을 나타냈고 그람음성에서는 *H. pylori* 임상균주 4주에 대해서만 항균활성을 나타내었다. 또한 IDA의 처리농도를 200 $\mu\text{g}/\text{disk}$ 로 높여 처리했을 시에도 그람양성에서는 *S. aureus* SG 511, 285와 503 세주에서만 항균력을 나타냈고 그람음성에서는 *H. pylori* 임상균주 4주에 대해서만 항균활성을 보였다. 항균물질 IDA를 동일농도 처리시 그람양성 균주중 *S. aureus*에 대한 항균력이 그람음성 균주중 *H. pylori*에 대한 항균력보다 전반적으로 약해 *H. pylori*에 대해 선택적 항균력을 보인다고 판단하였다. Chaetoglobosin A가 속해있는 곰팡이의 2차대사산물인 cytochalasan물질은 세포분열, 세포운동, 분비와 식작용을 저해하고 형태변화를 일으키는 물질로 알려져 있으며, 항균물질 IDA의 세포독성도를 인체유래의 위암세포주인 SNU 1, 장암세포주인 SNU C4, 그리고 자궁암세포주인 HeLa를 대상으로 조사한 결과 각각 2.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 3.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 그리고 4.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 세포성장을 50% 저

Table 3. Antimicrobial activities of IDA and antibiotics by paper disk method

Microbial strains	Antimicrobial drugs			
	Amoxicillin (5 µg/disk)	Gentamicin (5 µg/disk)	IDA (50 µg/disk)	IDA (200 µg/disk)
Antimicrobial susceptibility				
Gram positive strains				
1. <i>Streptococcus pyogenes</i> 308A	++	+	-	-
2. <i>Streptococcus pyogenes</i> 77A	++	+	-	-
3. <i>Streptococcus faecium</i> MD 8b	-	-	-	-
4. <i>Staphylococcus aureus</i> SG 511	++	+	+	+
5. <i>Staphylococcus aureus</i> 285	-	++	-	+
6. <i>Staphylococcus aureus</i> 503	-	+	+	+
7. <i>Streptococcus epidermidis</i>	-	++	-	-
8. <i>Micrococcus leuteus</i>	++	+	-	-
9. <i>Bacillus subtilis</i>	+	++	-	-
Gram negative strains				
10. <i>Escherichia coli</i> 078	+	+	-	-
11. <i>Escherichia coli</i> DC 0	-	++	-	-
12. <i>Escherichia coli</i> DC 2	+	+	-	-
13. <i>Escherichia coli</i> TEM	+	+	-	-
14. <i>Escherichia coli</i> 1507 E	-	+	-	-
15. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 9027	-	+	-	-
16. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1592 E	-	+	-	-
17. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1771	-	++	-	-
18. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1771 M	++	++	-	-
19. <i>Salmonella typhimurium</i>	+	+	-	-
20. <i>Klebsiella oxytoca</i> 1082 E	-	+	-	-
21. <i>Klebsiella aerogenes</i> 1522 E	+	+	-	-
22. <i>Enterobacter cloacae</i> P 99	-	++	-	-
23. <i>Enterobacter cloacae</i> 1321 E	+	+	-	-
24. <i>Helicobacter pylori</i> 1	+	+	++	++
25. <i>Helicobacter pylori</i> 2	++	+	+	++
26. <i>Helicobacter pylori</i> 3	+	+	++	++
27. <i>Helicobacter pylori</i> 5	+	+	++	++

Antimicrobial activities were indicated as the degree of clear zone diameter(ϕ). ++; $\phi > 20$ mm, +; $\phi = 10 \sim 20$ mm, -; not detected.

Table 4. Cytotoxicities of IDA against human cell lines

Cell lines	SNU 1	SNU C4	HeLa
IC ₅₀ (µg/ml)	2.1	3.8	4.2

해하는 세포독성도를 보였다(Table 4).

요 약

본 실험에서는 만성위염, 위궤양, 십이지장궤양, 위암발생의 원인균으로 알려진 *H. pylori*를 저해하는 특이항균물질을 생성하는 균주를 토양에서 분리한 방선균액과 곰팡이 추출액을 대상으로 탐색하여 곰팡이 균주번호 60686을 선별하였다. Jar fermentor로 배양하여 얻은 균체를 acetone 및 EtOAc로 추출하였고, 얻어진 추출액을 silica column chromatography와 LH-20 gel chromatography를

수행하여 활성분획을 농축하였고 HPLC를 사용하여 항균 활성을 나타내는 단일물질 IDA를 분리 정제하였다. 항균 활성물질 IDA의 구조를 MS, NMR 분석등을 통해 추정하고 곰팡이의 2차대사산물인 cytochalasan의 전형적 구조를 갖는 분자식 C₃₂H₃₆N₂O₅의 chaetoglobosin A라는 물질로 판명되었다. 항균물질 IDA의 항균력을 paper disk법으로 실험한 결과 그람양성 균주중에서는 *S. aureus* SG 511, 285와 503 3주에서만 항균력을 보였고, 그람음성 균주중에서는 *H. pylori* 4주에서만 항균력을 보였으나 동일농도 처리시 *H. pylori*에 대한 항균력이 *S. aureus*에 비해 우수한 항균효과를 가진다고 판단되었다.

참고문헌

1. Atlas, R. M., 1993. Urea broth base. p. 968. In L. C. Parks(ed.), *Handbook of Microbiological Media*. CRC press.

2. Baik, S. C., H. S. Youn, M. H. Chung, W. K. Lee, M. J. Cho, G. H. Ko, C. K. Park, H. Kasai, and K. H. Rhee. 1996. Increased oxidative DNA damage in *Helicobacter pylori*-infected human gastric mucosa. *Cancer Res.* **56**: 1279–1282.
3. Dekker, K. A., T. Inagaki, T. D. Gootz, K. Kaneda, E. Nomura, T. Sakakibara, S. Sakemi, Y. Sugie, Y. Yamaguchi, N. Yoshikawa, and N. Kojima. 1997. CJ-12,954 and its congeners, new anti-*Helicobacter pylori* compounds produced by *Phanerochaete velutina*: Fermentation, isolation, structural elucidation and biological activities. *J. Antibiotic.* **50**(10): 833–839.
4. Goodwin, C. S., A. Armstrong, and B. Marshall. 1986. *Campylobacter pyloridis*, gastritis and peptic ulceration. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 353–356.
5. Harris, A. 1997. Treatment of *Helicobacter pylori*. *Drugs of Today.* **33**(1): 59–66.
6. Hazel, S. L., A. Lee, L. Brady, and W. Hennessy. 1986. *Campylobacter pyloridis* and gastritis: Association with intercellular spaces and adaptation to an environment of mucus as important factors in colonization of the gastric epithelium. *J. Infect. Dis.* **153**(4): 658–663.
7. Hazell, S. L., D. J. Evans, Jr, and D. Y. Graham. 1991. *Helicobacter pylori* catalase. *J. Gen. Microbiol.* **137**: 57–61.
8. Labigne, A. and H. de Reuse. 1996. Determinants of *Helicobacter pylori* pathogenicity. *Infect. Agent. Dis.* **5**: 191–202.
9. Lee, A., J. Fox, and S. Hazell. 1993. Pathogenicity of *Helicobacter pylori*: a perspective. *Infect. Immun.* **61**: 1601–1610.
10. Marshall, B. J., L. J. Barrett, C. Prakash, R. W. McCallum, and R. L. Guerrant. 1990. Urea protects *Helicobacter [Campylobacter] pylori* from the bactericidal effect of acid. *Gastroenterology* **99**: 697–702.
11. Martin J Blaser. 1996. The bacteria behind ulcers. *Scientific American.* **274**(2): 92–97.
12. Moran, A. P. 1996. The role of lipopolysaccharide in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **12**(suppl. 1): 39–50.
13. Olbe, L., A. Hamlet, J. Dalenbäck, and L. Fändriks. 1996. A mechanism by which *Helicobacter pylori* infection of the antrum contributes to the development of duodenal ulcer. *Gastroenterology* **110**: 1386–1394.
14. Peterson, W. L. 1991. *Helicobacter pylori* and peptic ulcer disease. *New Eng. J. Med.* **324**: 1043–1048.
15. Setsuko, S., K. Yoshihira, and S. Natori. 1983. Chaetoglobosins, cytotoxic 10-(indol-3-yl)-[13] cytochalasans from *Chaetominum* spp. IV. ¹³C-nuclear magnetic resonance spectra and their application to a biosynthetic study. *Chem. Pharm. Bull.* **31**(2): 490–498.
16. Setsuko, S., K. Yoshihira, S. Natori, S. Udagawa, F. Sakabe, H. Kurata, and M. Umeda. 1982. Chaetoglobosins, cytotoxic 10-(indol-3-yl)-[13] cytochalasans from *Chaetominum* spp. I. production, isolation and some cytological effects of chaetoglobosins A-J. *Chem. Pharm. Bull.* **30**(5): 1609–1617.
17. Skehan, P., R. Stroeng, D. Scudiero, A. Monks, J. McMahon, D. Vistica, J. T. Warren, H. Bokesch, S. Kenny, and M. R. Boyd. 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer. Inst.* **82**(13): 1107–1112.
18. Takeshi, I., Y. Yanagawa, M. Takahashi, A. Kai, M. Ohashi, and G. Hamana. 1987. Isolation of *Campylobacter pyloridis* from human gastric mucosa and characterization of the isolates. *Microbiol. Immunol.* **31**(7): 603–614.
19. Warren, J. R. and B. Marshall. 1983. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* **i**: 1273–1275.

(Received January 5, 1998)