トピックス

NO とウイルスゲノムの進化

赤池 孝章

(熊本大学医学部微生物学教室)

はじめに

酸素ラジカルや一酸化窒素 (NO) などのフリーラジカルは、宿主の感染防御ならびに炎症反応の普遍的なメディエーターである。特に、ウイルス感染症においては、この様なフリーラジカルにより、酸化ストレスがもたらされ、感染病態の増悪の一因となることが明らかにされている^{1)~8)}。

近年、NO の多彩な生理活性が注目されているが^{9)~11)}、NO は、これまで知られている情報伝達物質とは異なり、化学的反応性に富むラジカルであり、ウイルス感染を含めた感染・炎症反応に伴って過剰に産生される^{4)~6)}。一般に、生体内で NO 合成酵素 (NO synthase, NOS) からつくられた NO は、共存する分子状酸素 (O_2) や酸素ラジカル (活性酸素) などと反応し、パーオキシナイトライト ($ONOO^-$) などの反応性窒素酸化物の生成をもたらし、多彩な病態生理活性を発揮する^{12)~15)}。

実際、ウイルス感染病態において過剰に産生される NO や酸素ラジカルの一つであるスーパーオキシド (O_2^-) は、パーオキシナイトライトの生成を介して宿主に酸化ストレスをもたらし^{1)~8)}。一方で、感染炎症における酸化ストレスは、生体内で増殖するウイルスそのものにも加えられることが予想される。ウイルスは、極めて高度な遺伝的多様性を有しており (quasispecies)、様々な環境中のストレスにより淘汰され

ながら分子進化を繰り返している。この様なウイルスの多様性は、これまで主にゲノム複製の不正確さにより説明されてきたが、その分子メカニズムは未だに不明である。そこで本稿においては、我々の知見をもとに、NO によりもたらされる酸化ストレスとウイルスゲノムの進化への関わりについて考察していきたい。

酸化ストレスによる変異原性の発現

感染・炎症反応において、誘導型 NO 合成酵素 (inducible NOS, iNOS) の発現を介して過剰に産生される NO は、炎症のメディエーターとして機能するだけでなく、細胞死 (apoptosis) などの制御さらには変異原性を発現し発癌にも関与していることが示唆されている (図 1)¹⁴⁾¹⁵⁾。NO は、比較的安定な無機ラジカルであり、酸素ラジカルなどとは異なったユニークな化学的反応性を示す。生体内で生成した NO は、種々の酸化反応を介して最終的に比較的安定な NO_2^- や NO_3^- イオンとなるが、その過程で NO は、酸素ラジカル (活性酸素) や遷移金属イオン (Fe, Cu) と反応することにより、より反応性に富む窒素酸化物が生じ、NO そのものには認められない多様な活性が発現される^{12)~16)}。

NO とスーパーオキシドが炎症局所で過剰に産生された場合、スーパーオキシドと NO は 2 次反応速度定数 $6.7 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ という速さですみやかに反応し、パーオキシナイトライトの生成がもたらされる¹²⁾¹³⁾。この反応は、スーパーオキシドの主要な消去酵素であるスーパーオキシドディスムターゼ (SOD) が存在していても、優位に進行するため、NO が十分存在する環境においては、産生されたスーパーオキシドは、そのままパーオキシナイトライトとなり、スーパーオキシドの生物活性は、パーオキシナイトライトの生成を介して発現される。

パーオキシナイトライトは酸素ラジカルと同様、生

NO in viral mutation and evolution

Takaaki Akaike

Department of Microbiology,

Kumamoto University School of Medicine

2-2-1 Honjo, Kumamoto 860-0811, Japan

〒860-0811 熊本市本荘 2-2-1

Tel: 096-373-5100; Fax: 096-362-8362;

e-mail: takakaik@gpo.kumamoto-u.ac.jp

図1 NOの病態生理活性の多様性

NOの多彩な機能は、NOと酸素ラジカルや遷移金属イオン（Fe, Cu）などとの反応を経て産生される各種反応性窒素酸化物の多様な化学的・生物学的反応性にもとづき発現される。

体に酸化ストレスをもたらすオキシダントであるが、酸化反応のみならず各種生体分子に対して強力なニトロ化剤として作用する¹²⁾¹³⁾。特に、タンパク質中のチロシン残基¹³⁾¹⁷⁾、また、核酸塩基、特にグアニンは、比較的効率良く酸化あるいはニトロ化され¹⁸⁾、そのニトロ化反応は生体内に豊富に存在する（1.2mM）二酸化炭素（CO₂）によりさらに促進されることがわかっている¹⁹⁾。さらに興味あることに、Woganらのグループは、plasmidをパーオキシナイトライトで処理することによりもたらされる変異原性を大腸菌やヒトの腎細胞を用いた発現系で解析し、パーオキシナイトライトが、G:C→T:A transversionなどの点変異とともに大きな遺伝子欠損や挿入を誘発することを報告している²⁰⁾²¹⁾。一方、フランスの大島らのグループは、NOやパーオキシナイトライトが、p53（がん抑制蛋白）を化学的に修飾（酸化・ニトロ化）し、その機能を損なうことを見出している。これらの知見は、パーオキシナイトライトが生体内で強力な変異原性を発揮していることを示唆している²²⁾。

ウイルス感染におけるNOと パーオキシナイトライトの過剰生成

炎症反応に伴い、マクロファージ、血管平滑筋およ

び内皮細胞、腸および気管支上皮細胞などにおいて、細菌の内毒素や各種炎症性サイトカインの刺激によりiNOSが発現される¹⁴⁾¹⁵⁾。iNOSの発現は炎症局所におけるNO過剰生成をもたらすが、このようなiNOSの発現誘導は、マウスインフルエンザウイルス肺炎、センダイウイルス肺炎、各種ウイルス性脳炎において確認されている^{3)~6)23)}。また、iNOSはヒトの鼻腔粘膜や気管支上皮細胞においては恒常的に発現しており、炎症反応に伴ってさらに誘導されることが認められている²⁴⁾²⁵⁾。さらに最近、ヒト免疫不全ウイルス1型（human immunodeficiency virus type-1, HIV-1）のエンベロープ蛋白であるgp41が神経細胞やastrocyteにiNOSの発現をもたらすことや、HIV脳症の脳組織にiNOSが発現していることも報告されている²⁶⁾²⁷⁾。

生体内のパーオキシナイトライト生成を確認する間接的アプローチとして、組織中のニトロチロシンの検出・定量が広く行われている¹⁷⁾。実際我々は、インフルエンザウイルス肺炎モデルのウイルス感染病巣にニトロチロシンが多量に生成することを、免疫組織学的解析や高速液体クロマトグラフィーと電気化学検出法をカップルさせた方法により確認している。さらに、本モデルにNOS阻害剤やパーオキシナイトライト消去剤を投与することにより生体内ニトロチロシン生成

が抑制され、アポトーシス発現を指標にした組織障害レベルが著明に軽減し、同時に有意な生存率の改善がもたらされることを確認している（一部未発表）³¹⁻⁶⁾。

一方、宿主の感染防御反応の一環として産生された NO は、多くのウイルス感染モデルにおいて効果的抗ウイルス作用を発揮しないこともわかってきている³¹⁻⁷⁾。このことは、インフルエンザウイルス・センダイウイルス肺炎や単純ヘルペス脳炎モデルにおける NOS 阻害剤を用いた解析^{21,23)}、さらに、iNOS ノックアウトマウス (KO) マウスを用いた同様の感染モデルにおいても証明されている^{71,28)}。すなわち、NO やパーオキシナイトライトは、ウイルスに対して選択毒性を発揮することなく、非選択的に宿主組織の障害をもたらしたり、酸化ストレスを増強することによりウイルス感染病態を悪化させているといえる^{1)-6),14),15)}。

ウイルス感染における NO 依存的ウイルス遺伝子変異

以上の知見は、NO やパーオキシナイトライトによる酸化ストレスが、宿主はもちろんのこと、局所で増殖を繰り返すウイルス側にも加えられ、ウイルスに変異原性をもたらすことを予測させる。興味あることに、以前より変異原性物質として知られる亜硝酸 (HNO_2) は、タバコモザイクウイルス、ポリオウイルス、インフルエンザウイルスなどの RNA ウイルスの変異を促進することが報告されている²⁹⁾⁻³³⁾。亜硝酸は、NO 由来の反応性窒素酸化物のひとつとあるが、実際はこれが生体内でつくられても、生体の強力な緩衝作用により、生物学的に有意な化学反応は起きないものと考えられている。亜硝酸などの chemical mutagen (化学的変異誘発物質) を用いたウイルスの変異誘発実験は、1970~1980代にかけて盛んに行なわれたが、1990に Holland らにより、変異誘発物質による RNA ウイルスの変異率は spontaneous mutation (自然突然変異) に比較して軽度しか上昇しないという報告がなされ³⁴⁾、ウイルスの変異誘発に関する研究には、その後あまり大きな展開がなかった。

一方で、前述したように、最近になって NO 由来の反応性窒素酸化物であるパーオキシナイトライトが、生体内で変異原性を発揮している可能性が指摘されるようになってきた^{18),20)-22)}。さらに、Beck らは、コクサッキーウイルスの心筋炎モデルを用いて、酸化ストレスがコクサッキーウイルス弱毒株の遺伝子にいくつかの点変異を誘発し、ウイルスが強毒株に変化することによりウイルスの病原性が増強し、致死的な心筋炎がもたらされることを明らかにした^{35),36)}。また、ウイ

ルス以外では、以前よりマクロファージから産生される活性酸素が、通性細胞内寄生菌である *Salmonella typhimurium* に対して変異原性を発現することが知られている³⁷⁾。これらの知見は、酸化ストレスがウイルスの遺伝子変異と分子進化に関与することを示唆するものである。

そこで我々は、酸化ストレスとウイルスの分子進化の関わりについて、特に NO やパーオキシナイトライトによるウイルスの変異促進作用に焦点をあて解析を試みた。一般に RNA ウイルスは、その遺伝子複製の不正確さにより、一回の複製でヌクレオチド残基あたり $10^{-5} \sim 10^{-3}$ という頻度で変異し、極めて高度な遺伝的多様性を有しており、様々な環境中のストレスにより淘汰されながら分子進化を繰り返していると考えられている^{38),39)}。これまで、ウイルスの変異を評価する方法として、温度感受性変異、プラークの形態や宿主領域さらには病原性の変化などを指標に解析が行なわれてきた。この様なウイルス遺伝子の表現型の変化は、しばしば複数の遺伝子の多数の塩基置換によりもたらされるため、ウイルス遺伝子変異を定量的に解析することは困難である⁴⁰⁾。このため現在は、単クローン中和抗体からのエスケープ変異株の発生頻度を計測することにより、点変異が評価されている。例えば、この様なエスケープ変異株の発生頻度は、センダイウイルス、水疱性口内炎ウイルス、ニューカッスル病ウイルス、A 型インフルエンザウイルスなどの RNA ウイルスの場合、 $\sim 10^{-4.5}$ 程度であると報告されている^{41),42)}。

しかしながら、エスケープ変異株の発生頻度が用いる抗体や培養条件により大きく変動すること、さらに、この方法は、in vivo の系でのウイルス変異の解析に適さない、などの欠点があった。そこで我々は、東大医科研の永井教授 (現感染研・エイズセンター長)、加藤博士らが、最近確立された reverse genetics により作製された遺伝子組み替えセンダイウイルス (SeV) を用いて^{43),44)}、永井先生らと協同して、ウイルス感染病態において産生する NO やパーオキシナイトライトの有するウイルス遺伝子変異原性について解析を行なった⁷⁾。具体的には、green fluorescent protein (GFP) 遺伝子を組み込んだ組み替えセンダイウイルス (GFP-SeV) を、in vitro の系でパーオキシナイトライトにより処理したり、iNOS ノックアウト (KO) マウスに感染させることで、GFP-SeV の GFP 遺伝子の変異率を解析した。その結果、パーオキシナイトライトがウイルス遺伝子に対して強い変異原性を発揮すること、また、NO の過剰生成がもたらされない

図2 ウイルス肺炎における NO 依存的ウイルス変異促進

iNOS KO マウス (iNOS^{-/-}) および野生型マウス (wild type) に GFP-SeV を経鼻噴霧感染させ、肺内で増殖したウイルスの変異率を経時的に測定した。

図3 iNOS 強制発現細胞における GFP-SeV 変異の上昇

iNOS 強制発現細胞 (SW480 細胞) に GFP-SeV を感染させ、NOS 阻害剤 (*N*^ω-monomethyl-L-arginine, L-NMMA) 存在下、非存在下で培養後、上清に回収された GFP-SeV の変異率を求めた。

図4 NO・酸化ストレスのウイルスゲノム変異と進化への関与

iNOS KO マウスの肺炎病巣においては、野生型マウスに比較して GFP-SeV の変異率が有意に低いことがわかった (図2)。さらに、この様な過剰な NO 産生に依存したウイルス変異率の上昇は、iNOS 遺伝子をトランスフェクトし、iNOS を強制的に発現した細胞の感染系においても確認された (図3)。

RNA ウイルスは、ブルーフリーディングや修復機能をほとんど欠いたゲノム複製システムによる変異率

の高さから、多彩な遺伝的多様性をもつ集団, quasispecies として存在し、環境中の淘汰圧により選択されながらダイナミックな進化を続けている³⁸⁾。今回の知見は、ウイルス感染病態のメディエーターとして産生されるパーオキシナイトライトをはじめとする NO 由来の窒素酸化物が、宿主のみならずウイルスに対しても酸化ストレスをもたらし、ウイルスゲノムの変異を促していることを示しており、さらにこのことが、ウ

ウイルスゲノムの多様性を拡大させ、ひいてはウイルスの進化を促進させるドライビングフォースとなるものと思われる(図4)。前述の如く、NO、酸素ラジカルさらにはパーオキシナイトライトなどは、ウイルス感染病態や酸化ストレスの普遍的メディエーターであり、これらはまた、内因性変異原性物質としても作用する^{45)~49)}。従って、NOや酸化ストレスは、ウイルスゲノムの進化を加速させることにより、インフルエンザウイルスやHIV感染において深刻な問題となっている、薬剤耐性化、細胞・組織トロピズム、中和抗体からのエスケープなどの現象にも密接に関わる可能性も示唆される⁵⁰⁾。

おわりに

以上、ウイルス感染病態におけるNOおよびパーオキシナイトライトの過剰生成を介した酸化ストレスの発現とそのウイルスゲノム進化への関与について、最新の知見を紹介した。これまで、微生物のゲノム進化に関わる宿主由来の第三の要因(酸化ストレスなど)を想定した研究は、文献上まれに散見される程度である。一方で、この数年のNOやフリーラジカルの研究成果により、生体内のmutagenesisさらにはcarcinogenesisに、酸化ストレスが深く関与していることが明らかにされつつある^{45)~49)}。今後さらに、多彩な機能を発揮するNOなどのフリーラジカルやそれ由来の反応性窒素酸化物の関与するウイルスの分子病態や分子進化のメカニズムの解明が進展することが期待される。

謝 辞

GFP-SeVの変異解析実験において御援助・御協力・御助言を頂いた熊本大学医学部微生物学教室の澤智裕、宮本洋一博士、前田 浩教授、国立感染症研究所 加藤 篤博士、同・エイズセンター長 永井美之博士、国立がんセンター支所 小倉 勤博士、同・支所長 江角浩安博士、また今回執筆の機会を与えて頂きました京都大学ウイルス研究所 下遠野邦忠教授に深謝いたします。

文 献

- 1) Oda, T., Akaike, T., Hamamoto, T., Suzuki, F., Hirano, T. and Maeda, H. (1989) Oxygen radicals in influenza-induced pathogenesis and treatment with pyran polymer-conjugated SOD. *Science* **244**, 974-976.
- 2) Akaike, T., Ando, M., Oda, T., Doi, T., Ijiri, S., Araki, S. and Maeda, H. (1990) Dependence on O_2^- generation by xanthine oxidase of pathogenesis of influenza virus infection in mice. *J. Clin. Invest.* **85**, 739-745.
- 3) Akaike, T., Noguchi, Y., Ijiri, S., Setoguchi, K., Suga, M., Zheng, Y. M., Dietzschold, B. and Maeda, H. (1996) Pathogenesis of influenza virus-induced pneumonia: involvement of both nitric oxide and oxygen radicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 2448-2453.
- 4) Akaike, T., Suga, M. and Maeda, H. (1998) Free radicals in viral pathogenesis: molecular mechanisms involving superoxide and NO. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **217**, 64-73.
- 5) Akaike, T. and Maeda, H. (1999) Nitric oxide in influenza. In "Nitric Oxide and infection" pp. 397-415. Edited by F. C. Fang, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- 6) 赤池孝章 (1997) ウイルス感染病態とNO. *ウイルス* **47**, 165-176, 1997.
- 7) Akaike, T., Fujii, S., Kato, A., Yoshitake, J., Miyamoto, Y., Sawa, T., Okamoto, S., Suga, M., Asakawa, M., Nagai, Y. and Maeda, H. (2000) Viral mutation accelerated by nitric oxide production during infection in vivo. *FASEB J.* **14**, in press.
- 8) Schwartz, K. B. (1996) Oxidative stress during viral infection: A review. *Free Radic. Biol. Med.* **21**, 641-649.
- 9) Furchgott, R. F. and Vanhoutte, P. M. (1989) Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J.* **3**, 2007-2018.
- 10) Ignarro, L. J. (1991) Signal transduction mechanisms involving nitric oxide. *Biochem. Pharmacol.* **41**, 485-490.
- 11) Moncada, S. and Higgs, A. (1993) The L-arginine-nitric oxide pathway. *N. Eng. J. Med.* **329**, 2002-2012.
- 12) Beckman, J. S., Beckman, T. W., Chen, J., Marshall, P. A. and 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.
- 13) Rubbo, H., Darley-Usmar, V. and Freeman, B. A. (1996) Nitric oxide regulation of tissue free radical injury. *Chem. Res. Toxicol.* **9**, 809-820.
- 14) 赤池孝章. (1999) 炎症とNO-NOおよび反応性窒素酸化物の作用の二面性. 谷口・鈴木編「NOの生理作用と疾患」, 羊土社, pp. 54-63.
- 15) Akaike, T. and Maeda, H. (2000) Pathophysiological effects of high-output production of nitric oxide. In "Nitric Oxide: Biology and Pathobiology",

- in press. Edited by L. J. Ignarro, Academic Press, San Diego.
- 16) Akaike, T. (2000) Mechanisms of biological S-nitrosation and its measurement. *Free Rad. Res.* in press.
 - 17) Ischiropoulos, H. (1998) Biological tyrosine nitration : a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. *Arch. Biochem. Biophys.* **356**, 1–11.
 - 18) Yermilov, V., Rubio, J. and Ohshima, H. (1995) Formation of 8-nitroguanine in DNA treated with peroxynitrite in vitro and its rapid removal from DNA by depurination. *FEBS Lett.* **376**, 207–210.
 - 19) Lyman, S. V. and Hurst, J. K. (1998) CO₂-catalyzed one-electron oxidations by peroxynitrite : properties of the reactive intermediates. *Inorg. Chem.* **37**, 294–301.
 - 20) Jude, M. J. and Wogan, G. N. (1996) Peroxynitrite-induced mutation spectra of pSP 189 following replication in bacteria and in human cells. *Mutat. Res.* **349**, 51–61.
 - 21) Tretyakova, N. Y., Burney, S., Pamir, B., Wishnok, J. S., Dedon, P. C., Wogan, G. N. and Tannenbaum, S. R. (2000) Peroxynitrite-induced DNA damage in the supF gene : correlation with the mutational spectrum. *Mutat. Res.* **447**, 287–303.
 - 22) Szabó, C. and Ohshima, H. (1997) DNA damage induced by peroxynitrite : subsequent biological effects. *Nitric Oxide* **1**, 373–385.
 - 23) Fujii, S., Akaike, T. and Maeda, H. (1999) Role of nitric oxide in pathogenesis of herpes simplex virus encephalitis in rats. *Virology* **256**, 203–212.
 - 24) Guo, F. H., De Raeve, H. R., Rice, T. W., Stuehr, D. J., Thunnissen, F. B. and Erzurum, S. C. (1995) Continuous nitric oxide synthesis by inducible nitric oxide synthase in normal human airway epithelium in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 7809–7813.
 - 25) Saleh, D., Barnes, P. J. and Gaid, A. (1997) Increased production of the potent oxidant peroxynitrite in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* **155**, 1763–1769.
 - 26) Adamson, D. C., Kopnisky, K. L., Dawson, T. M. and Dawson, V. L. (1999) Mechanisms and structural determinants of HIV-1 coat protein, gp41-induced neurotoxicity. *J. Neurosci.* **19**, 64–71.
 - 27) Bukrinsky, M. I., Nottet, H. S., Schmidtmyerova, H., Dubrovsky, L., Flanagan, C. R., Mullins, M. E., Lipton, S. A. and Gendelman, H. E. (1995) Regulation of nitric oxide synthase activity in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected monocytes : implications for HIV-associated neurological disease. *J. Exp. Med.* **181**, 735–745.
 - 28) Karupiah, G., Chen, J. H., Mahalingam, S., Nathan, C. F. and MacMicking, J. D. (1998) Rapid interferon γ -dependent clearance of influenza A virus and protection from consolidating pneumonitis in nitric oxide synthase 2-deficient mice. *J. Exp. Med.* **188**, 1541–1546.
 - 29) Tsugita, A. and Fraenkel-Conrat, H. (1962) The composition of proteins of chemically evoked mutants of TMV RNA. *J. Mol. Biol.* **4**, 73–82.
 - 30) Singer, B. and Fraenkel-Conrat, H. (1969) Mutagenicity of alkyl and nitroso-alkyl compounds acting on tobacco mosaic virus and its RNA. *Virology* **39**, 395–399.
 - 31) Carp, R. I. and Koprowski, H. (1962) Mutation of type 3 poliovirus with nitrous acid. *Virology* **17**, 99–109.
 - 32) Granoff, A. (1961) Induction of Newcastle disease virus mutants with nitrous acid. *Virology* **13**, 402–408.
 - 33) Scheid, A., and Choppin, P. W. (1976) Protease activation mutants of Sendai virus. Activation of biological properties by specific proteases. *Virology* **69**, 265–277.
 - 34) Holland, J. J., Domingo, E., de la Torre, J. C. and Steinhauer, D. A. (1990) Mutation frequencies of defined single codon sites in vesicular stomatitis virus and poliovirus can be increased only slightly by chemical mutagenesis. *J. Virol.* **64**, 3960–3962.
 - 35) Beck, M. A., Esworthy, R. S., Ho, Y.-S. and Chu, F.-F. (1998) Glutathione peroxidase protects mice from viral-induced myocarditis. *FASEB J.* **12**, 1143–1149.
 - 36) Beck, M. A., Shi, Q., Morris, V. G. and Levander, O. A. (1995) Rapid genomic evolution of a non-virulent coxsackievirus B3 in selenium-deficient mice results in selection of identical virulent isolates. *Nat. Med.* **1**, 433–436.
 - 37) Weitzman, S. A. and Stossel, T. P. (1981) Mutation caused by human phagocytes. *Science* **212**, 546–547.
 - 38) Domingo, E., Menendez-Arias, L. and Holland, J. J. (1997) RNA virus fitness. *Rev. Med. Virol.* **7**, 87–96.
 - 39) 中島捷久, 中島節子 (1992) ウイルスの変異. 蛋白質核酸酵素 **37**, 2884–2894.
 - 40) Smith, D. B. and Inglis, S. C. (1987) The mutation rate and variability of eukaryotic viruses : an analytical review. *J. Gen. Virol.* **68**, 2729–2740.
 - 41) Portner, A., Webster, R. G. and Bean, W. J. (1980) Similar frequencies of antigenic variants in Sen-

- dai, vesicular stomatitis, and influenza A viruses. *Virology* **104**, 235-238.
- 42) Nishikawa, K., Isomura, S., Suzuki, S., Watanabe, E., Hamaguchi, M., Yoshida, T. and Nagai, Y. (1983) Monoclonal antibodies of the HN glucoprotein of Newcastle disease virus. Biological characterization and use for strain comparisons. *Virology* **130**, 318-330.
- 43) Kato, A., Sakai, Y., Shinoda, T., Kondo, T., Nakanishi, M. and Nagai, Y. (1996) Initiation of Sendai virus multiplication from transfected cDNA or RNA with negative or positive sense. *Genes Cells* **1**, 569-579.
- 44) Hassan, M. K., Kato, A., Shinoda, T., Sakai, Y., Yu, D. and Nagai, Y. (1997) Creation of an infectious recombinant Sendai virus expressing the firefly luciferase gene from the 3' proximal first locus. *J. Gen. Virol.* **78**, 2813-2820.
- 45) Vuillaume, M. (1987) Reduced oxygen species, mutation, induction and cancer initiation. *Mutat. Res.* **186**, 43-72.
- 46) Harris, C. C. (1991) Chemical and physical carcinogenesis : advances and perspectives for the 1990s. *Cancer Res.* **51**, 5023s-5044s
- 47) Ohshima, H. and Bartsch, H. (1994) Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors : possible role of nitric oxide in carcinogenesis. *Mutat. Res.* **305**, 253-264
- 48) Liu, R. H. and Hotchkiss, H. (1995) Potential genotoxicity of chronically elevated nitric oxide : a review. *Mutat. Res.* **339**, 73-89
- 49) Zhuang, J. C., Lin, C., Lin, D. and Wogan, G. N. (1998) Mutagenesis associated with nitric oxide production in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 8286-8291
- 50) Kimata, J., Kuller, L., Anderson, D. B., Daley, P. and Overbaugh, J. (1999) Emerging cytopathic and antigenic simian immunodeficiency virus variants influence AIDS progression. *Nat. Med.* **5**, 535-541.