

소화효소가 *Helicobacter pylori*의 증식과 공포화독소 생성에 미치는 영향

홍대식, 강경희, 장명웅

고신대학교 의학부 미생물학 교실

Effect of Digestive Enzymes on The Growth And Vacuolating Toxin Titer of *Helicobacter pylori*

Dae Sik Hong, Kyung Hee Kang, Myung Woong Chang

Department of Microbiology, Kosin University College of Medicine, Pusan, Korea

Abstract

Background Global high prevalence rate of *Helicobacter pylori* infection is well-known fact. However, a large discrepancies exist between the diagnostic data obtained by the PCR and culture method, because the coccoid form of *H. pylori* which represent the majority form in the biological samples are not viable in the standard BHI broth with 5% horse serum. The component parts of saliva and gastric juice acted as neither stimulator nor inhibitor to the growth of *H. pylori* remain unclear.

Objective The purpose of this study was to evaluate the influence of amylase, pepsin, mucin, and lysozyme on the growth and vacuolating toxin production and titer of *H. pylori* in vitro.

Materials and Methods *H. pylori* 13, 39, 46, 59, 72, 94, 98, and 125 strains were isolated from patients with gastric diseases. The digestive enzymes were inoculated in the 5% horse serum-BHI broth following final concentration of amylase (A: 0.25 µg/ml), pepsin (P; 0.25 µg/ml), mucin (M; 2.5 µg/ml), and lysozyme (L; 1.5 µg/ml). The vacuolating toxin titers of the culture supernatant were evaluated in the monolayer culture of RK-13 cells. **Results** The morphologic conversion from bacillary to horse-shoe to coccoid forms of *H. pylori* was observed in the BHI broth containing 5% horse serum on day 5 culture. Half of *H. pylori* was changed from bacillary to coccoid form on day 7 culture, most population of *H. pylori* was changed to coccoid form on day 10 culture, and almost all *H. pylori* was changed to coccoid form on day 14 culture. The growth of *H. pylori* 72, and 94 strains was increased in BHI broth containing each enzyme such as amylase, pepsin, mucin and mixture of two or three enzymes on day 5 and 7 culture. The growth of *H. pylori* 94 strains was increased in BHI broth containing each enzyme such as amylase, pepsin, mucin, and mixture of two or three enzymes on day 10 and 14 culture. The vacuolating toxin production of *H. pylori* strains was not influenced by the addition of amylase, pepsin, mucin, and lysozyme or mixture of two or three enzymes. The neutralization of vacuolating toxin of *H. pylori* was not affected by the addition of amylase, pepsin, mucin, and lysozyme or mixture of two or three enzymes. **Conclusion** We found that coccoid forms of *H. pylori* were viable in the standard 5% horse serum BHI media in the presence of amylase, pepsin, mucin, and lysozyme. The present study demonstrates that gastric juice of the stomach supports the viability of *H. pylori* and that oral route of infection is a plausible hypothesis. This work also demonstrates that gastric environment may not provide a selective advantage for the toxigenic strains of *H. pylori*.

Key Words: *H. pylori*, Growth, Vacuolating toxin, Digestive enzyme

서론

*Helicobacter pylori*는 사람의 위점막 상피세포나 위

점막내에 서식하는 세균으로 위염, 위궤양의 중요한 원인균으로 주목되고 있으며, 최근에는 위암과 관련성이 있는 균으로 보고되고 있다.¹⁻⁵⁾ 장명웅 등⁶⁾이나 이광호 등⁷⁾의 보고에 의하면 우리나라의 건강인이나 위 십이지장 질환환자에서 이균의 분리율이 높으며, 분리된 균주 중에는 치료제인 metronidazole, clarithromycin,

교신저자 장명웅
TEL 051-240-6421 • FAX 051-241-5458
E-mail mchang@ns.kosinmed.or.kr

amoxicillin 등에 저항성 균주도 상당수 있다고 보고되고 있다.⁸⁾

이 균의 전파 및 감염경로는 명확히 규명되지 않고 있으나, 대변-입, 입-입으로 감염되는 것으로 추정하고 있다.^{9,10)} 이 균은 전세계적으로 분포되어 있으며, 이 균의 감염은 사회경제적 요인과 관계가 있는 것으로 보고되고 있으며, 저개발 국가에서는 대부분이 소아기에 감염되지만, 선진국에서는 소아기에 감염이 적으며, 연령이 증가하면서 감염율도 증가한다고 보고하였다.¹¹⁾ 이 균은 배양조건이 적당한 경우에는 만곡형의 간균으로 인공배지에서 증식이 가능하지만, 환경이 부적당하게 바뀌면 간균의 형태에서 구형체로 형태가 바뀌어지며, 이 구형체는 인공배지 증식이 불가능하게 된다.¹²⁾ 이 균이 대변으로 배출될 때는 대부분이 구형체임으로 대변에서 이 균을 배양하는 것은 어려운 실정이다.¹³⁾ 따라서 PCR법과 배양법에 의한 균 검출율에 차이가 크다. 감염경로가 대변에서 입이라면, 인공배지에서 증식이 불가능한 구형체의 *H. pylori*가 구강이나 위에서 증식이 가능한 간균의 상태로 바뀌어야 한다. 그러나 타액이나 위액에서 *H. pylori*의 증식에 필요한 그 무엇이 있는지에 관해서는 아직 잘 모르고 있다. 최근 Morii 등¹⁴⁾이 사람의 타액이 *H. pylori*의 증식을 증가시킨다고 보고하였으나, 구체적인 결과는 없는 실정이다. 그러나 타액에는 *H. pylori*의 증식을 촉진시키거나 형태적 변화를 유도할 수 있는 물질이 존재할 수 있다는 것을 암시하여 주는 결과라고 생각된다. 이에 본 연구에서는 타액이나 위액에서 많이 존재하는 amylase, mucin, pepsin, lysozyme 등의 효소가 *H. pylori*의 증식에 미치는 영향을 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 사용 균주

H. pylori 균주는 위 내시경 검사시 채취된 조직으로부터 본 교실에서 분리 동정된 *H. pylori* 13, 39, 46, 59, 72, 94, 98, 125 균주를 사용하였다.

2. 사용 효소

Amylase (A6255, Sigma, USA) 1 mg/ml, mucin (type I-S, M3895, Sigma, USA) 10 mg/ml, pepsin (P7012,

Sigma, USA) 1 mg/ml, lysozyme (Boehringer Mannheim, Germany) 6mg/ml 농도로 희석하여 사용하였다. 이들 효소원액을 희석하여 BHI 액체배지에 각각 첨가한 후에 *H. pylori*의 증식과 공포화독소(vacuolating toxin; VT) 생성 및 중화에 미치는 영향을 관찰하였다.

3. RK-13 세포(토끼 신장유래세포)

일본 교린(杏林)대학 의학부 미생물학교실의 Kamiya로부터 분양 받아 10% fetal calf serum이 함유된 Dulbecco's MEM에 배양하여, 24 well plate에 well당 세포수가 5×10^4 /ml 밀도로 접종하여 VT생성 유무를 확인하는 표적세포로 사용하였다.¹⁵⁾

4. *H. pylori*의 배양

H. pylori 균주를 5% horse serum이 첨가된 5 ml의 BHI 액체배지와 각 효소를 각각의 농도로 첨가한 5% horse serum이 첨가된 5 ml BHI 액체배지에 각각 *H. pylori* 3일 배양균액 0.2 ml를 접종하고, AnaeroPack Campylo (Mitsubishi Gas Chem Co. Japan) jar에 넣어 37°C에서 배양하면서 0, 3, 6, 8, 24, 48, 72, 96시간 후에 각각의 균수를 산정하였다. 각 시간 별로 각 배양균액을 0.1 ml씩 취하여 BHI 액체배지에 10^{-1} - 10^{-6} 까지 계단희석하고, 그 각각을 0.01 ml씩 취하여 5% horse serum이 첨가된 BHI 혈액 한천배지에 접종하고, AnaeroPack Campylo jar에 넣어 37°C에서 5일간 배양하여 집락수를 산정하였다.¹⁶⁾

5. 배양 일수에 따른 *H. pylori*의 증식에 미치는 효소의 영향

BHI 액체배지에서 *H. pylori*는 배양 5일, 7일 10일, 14일 후에 각 *H. pylori* 배양액을 새로운 BHI 액체배지에 접종하고 amylase (0.25 μ g/ml), pepsin (0.25 μ g/ml), mucin (2.5 μ g/ml), lysozyme (1.5 μ g/ml)을 각각 단독으로 투여한 경우, 두 가지 효소를 동시에 투여한 경우, 세 가지 효소를 동시에 투여한 후에 세 가지의 *H. pylori*를 대상으로 증식양상을 관찰 비교하였다.^{17,18)}

6. *H. pylori*의 VT 생성능 검사

환자로부터 분리 동정된 *H. pylori* 균주를 각각 5% Horse serum이 첨가된 BHI 액체배지에 접종하여

AnaeroPack Campylo jar에서 4-7일간 배양하였다. 배양 후 4일과 7일에 각 균주의 배양액 5 ml를 취하여 10,000 rpm에서 2분간 원심한 상층액을 membrane filter (Millipore, 0.22 μ m, USA)로 여과멸균한 다음 Brain heart infusion 배지로 1/2x, 1/4x, 1/8x, 1/16x, 1/32x, 1/64x, 1/128x 희석하여 실험에 사용하였다. VT의 역가는 Kamiya 등¹⁹⁾의 방법에 의하여 검사하였다. 약술하면, 토끼의 신장유래 세포인 RK-13세포를 10% fetal calf serum Dulbecco's MEM (Life Technoloie, USA)에 배양한 후 96 well plate의 각 well당 세포수가 5×10^4 /ml 밀도가 되게 조정 한 세포부유액 100 μ l씩을 분주한 후 37°C에 5% CO₂ 부란기에 18시간 배양하였다. 다음날 준비된 *H. pylori* 배양 상층액을 각 농도별로 각 well에 100 μ l씩 접종하여 배양한 24시간 후에 VT에 의해 형성된 세포내 공포의 유무를 도립현미경 (Nikon, Japan)하에서 관찰하였다. VT 생성능의 비교는 희석된 *H. pylori* 배양 상층액이 첨가된 각 well의 세포중 10% 이상의 세포에서 공포가 관찰되면 VT 생성 양성으로 판정하였다. VT 역가는 VT 생성 양성으로 판정된 *H. pylori* 배양액의 최대희석배수를 VT 역

가로 하였다.²⁰⁾

7. 효소가 *H. pylori*의 vacuolating toxin 생성능에 미치는 영향

Amylase (0.25 μ g/ml), pepsin (0.25 μ g/ml), mucin (2.5 μ g/ml), lysozyme (1.5 μ g/ml)의 희석액을 BHI 액체배지에 각각 상기의 농도로 투여한 후에 5×10^4 /ml 밀도의 *H. pylori*를 접종한 4일과 7일 후에 흡광도 (560nm)와 생균수계산에 의한 균수계산으로 *H. pylori*의 증식 정도를 대조군과 비교함과 동시에 배양 상층액을 분리하여 VT 역가도 함께 비교하였다.²⁰⁾

8. 효소가 *H. pylori*의 VT역가에 미치는 영향

*H. pylori*를 4일간 배양한 배양 상층액 100 μ l에 amylase (0.25 μ g/ml), pepsin (0.25 μ g/ml), mucin (2.5 μ g/ml), lysozyme (1.5 μ g/ml)의 희석액을 각각 상기 농도로 혼합하여 RK-13 세포가 5×10^4 /ml 밀도로 배양된 96 well plate에 넣고 24시간 후에 VT 역가를 효소가 첨가되지 않은 대조군과 비교하였다.^{20,21)}

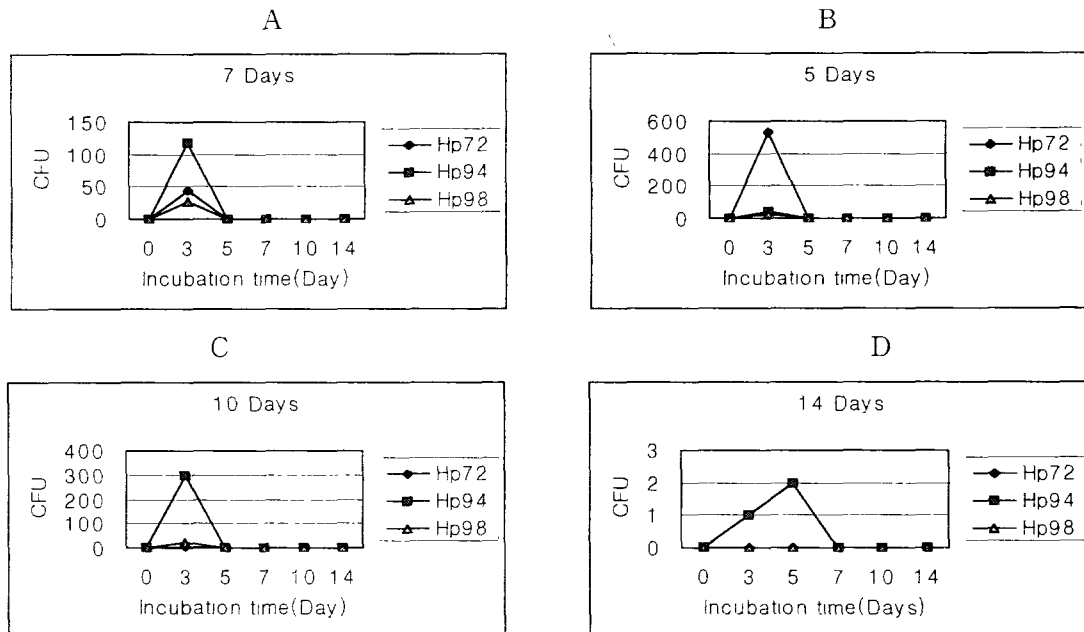


Fig 1. Effect of incubation time on the growth of *Helicobacter pylori* in the 5% serum BHI broth. Colony forming unit (CFU) of *H. pylori* was calculated by the 10^4 /ml.

A: The bacterial colony was calculated 5 days after culture in BHI broth.

B: The bacterial colony was calculated 7 days after culture in BHI broth.

C: The bacterial colony was calculated 10 days after culture in BHI broth.

D: The bacterial colony was calculated 14 days after culture in BHI broth.

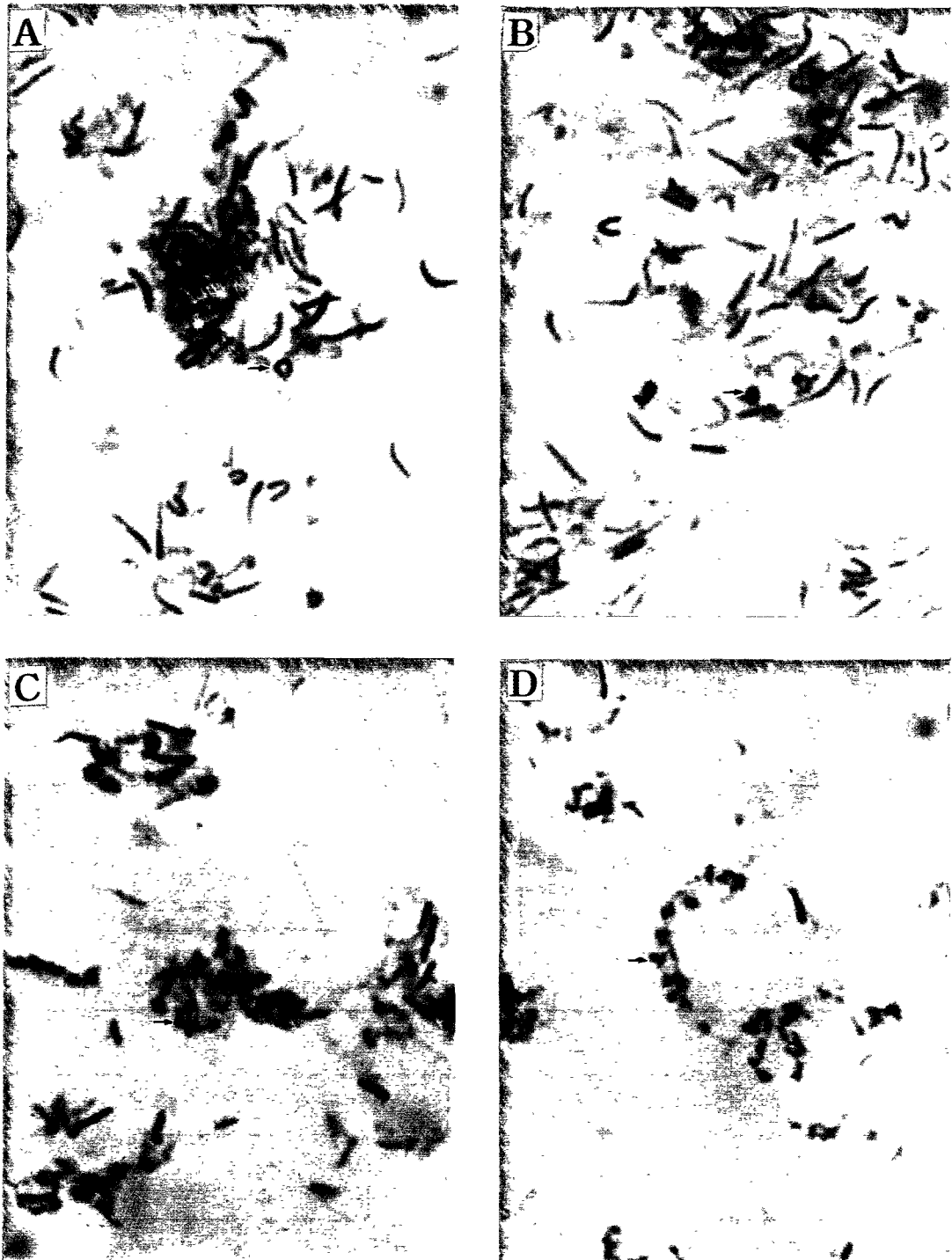


Fig. 2. Light micrograph fields showing (A) active bacillus forms of *H. pylori* on day 5, (B) most of bacillus form of *H. pylori* on day 7, (C) coccoid form of the *H. pylori* are predominantly day 10, and (D) almost all of coccoid form on day 14.

결과

1. 배양시간에 따른 *H. pylori*의 증식상과 형태적 변화

*H. pylori*는 배지내에서 장기간 배양될 때 형태가 간균의 형태에서 구균의 형태로 바뀌면서 사멸한다. 따라서 BHI 액체배지에서 배양일수 별로 *H. pylori*의 증식 양상을 비교한 결과는 Fig. 1에서와 같다. BHI 액체배지에 5일간 배양한 배양액을 새로운 배지에 다시 접종하여 배양하여 보면 3일 후에 *H. pylori* 72 균주의 증식이 가장 왕성하였고, *H. pylori* 94와 98 균주는 약간 증식하였으며, 5일 후부터는 *H. pylori* 72, 94, 98 균주 모두 같이 사멸하였다(Fig. 1-A). BHI 액체배지에 7일간 배양한 배양액을 새로운 배지에 다시 접종하여 배양하여 보면 3일 후에 *H. pylori* 94 균주가 가장 증식이 왕성하였고, 다음이 *H. pylori* 72 균주였으며, *H. pylori* 98 균주의 증식이 가장 적었으며, 5일 후부터는 3 균주 모두 사멸하였다(Fig. 1-B). BHI 액체배지에 10일간 배양한 배양액을 새로운 배지에 다시 접종하여 배양하여 보면 3일 후에 *H. pylori* 94 균주가 가장 증식이 왕성하였고, 다음이 *H. pylori* 98 균주였으며, *H. pylori* 72 균주의 증식이 가장 적었으며, 5일 후부터는 3 균주 모두 사멸하였다(Fig. 1-C). BHI 액체배지에 14일간 배양한 배양액을 새로운 배지에 다시 접종하여 배양하여 보면 3일과 5일 후에 *H. pylori* 94 균주는 증식이 있었으나, *H. pylori* 98와 *H. pylori* 72 균주는 증식이 되지 않았다(Fig. 1-D). BHI 액체배지에 5, 7, 10, 14일간 배양한 *H. pylori*의 형태적 변화는 Fig. 2과 같다. *H. pylori* 균주를 5일간 배양한 후 Gram 염색하여 검경하면 한 시야내의 대부분의 균은 간균의 형태이며, 종종 구형체로의 변화 직전인 반구형체나 ϵ 자형의 균이 보인다(Fig. 2-A). 그러나 7일간 배양한 균액에서는 한 시야내의 약 반수 정도의 균이 구형체로 바뀌었으며(Fig. 2-B), 배양 10일 후에는 한 시야내에 간균 보다 구형체가 더 많아서 대부분의 균체가 구형체로 바뀌었으며(Fig. 2-C), 14일 후에는 한 시야내에 거의 모든 균이 구형체였다(Fig. 2-D)

2. 5일 배양균에서 각 효소처리가 *H. pylori* 72 균주의 증식에 미치는 영향

BHI 액체배지에 5일간 배양한 *H. pylori* 72 균주를

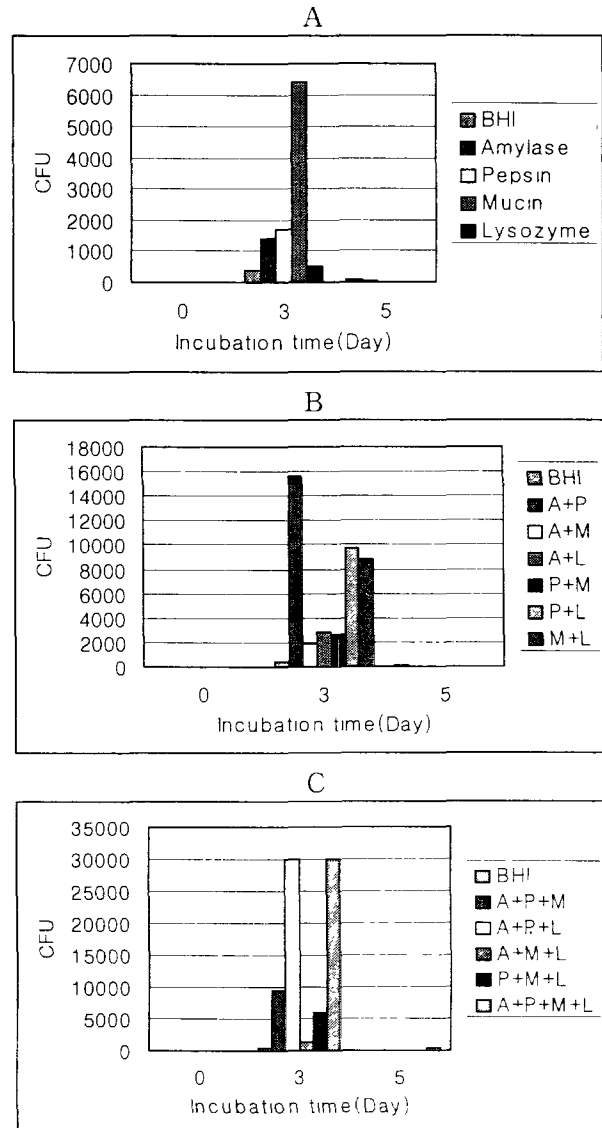


Fig. 3 Growth of *Helicobacter pylori* 72 in the 5% serum BHI broth on day 5

A: Each amylase, pepsin, mucin, and lysozyme was added to the medium.

B: A+P, A+M, A+L, P+M, P+L, and M+L were added to the medium.

C: A+P+M, A+P+L, A+M+L, P+M+L, A+P+M+L were added to the medium.

Colony forming units (CFU) of *H. pylori* were calculated by the 10^4 /ml.

amylase 0.25 μ g/ml, pepsin 0.25 μ g/ml, mucin 2.5%, lysozyme 1.5 μ g/ml이 각각 함유된 BHI 액체배지에 접종하여 배양한 후에 균의 증식을 비교한 성적은 Fig. 3-A와 같다. 균 접종 3일 후에 amylase나 pepsin이 함유

된 배지에서는 대조군(BHI)에서 보다 3배이상 증가하였으며, mucin이 함유된 경우에는 100배 이상 증가하였으나, lysozyme이 함유된 경우에는 대조군과 차이가 없었다.

3. 5일 배양균에서 두 가지 효소의 병합 처리가 *H. pylori* 72 균주의 증식에 미치는 영향

BHI 액체배지에 5일간 배양한 *H. pylori* 72 균주를 A+P, A+M, A+L, P+M, P+L, M+L이 각각 함유된 BHI 액체배지에 접종하여 배양한 후에 균의 증식을 비교한 성적은 Fig. 3-B와 같다. 균 접종 3일 후에 A+P이 함유된 배지에서는 대조군에서 보다 100배이상 증가하였으며, A+M, A+L, P+M이 함유된 경우에는 대조군 보다 10배 이상 증가하였으며, P+L, M+L이 함유된 경우에는 대조군에서 보다 50배 이상 증가되었다.

4. 5일 배양균에서 세 가지 이상 효소의 병합 처리가 *H. pylori* 72 균주의 증식에 미치는 영향

BHI 액체배지에 5일간 배양한 *H. pylori* 72 균주를 A+P+M, A+P+L, A+M+L, P+M+L, A+P+M+L이 각각 함유된 BHI 액체배지에 접종하여 배양한 후에 균의 증식을 비교한 성적은 Fig. 3-C와 같다. 균 접종 3일 후에 A+P+M이 함유된 배지에서는 대조군에서 보다 100 배이상 증가하였으며, A+P+L이 함유된 경우에는 대조군 보다 1000배 이상 증가하였으나, A+M+L이 함유된 경우에는 대조군에서 보다 2배 정도만 증가하였으며, P+M+L이 함유된 경우에는 대조군에서 보다 10배 정도 증가되었으나, A+P+M+L이 각각 함유된 경우에는 대조군에서 보다 1000배 이상 증가하였다.

5. 5일 배양균에서 각 효소처리가 *H. pylori* 94 균주의 증식에 미치는 영향

BHI 액체배지에 5일간 배양한 *H. pylori* 94 균주를 amylase 0.25 μ g/ml, pepsin 0.25 μ g/ml, mucin 2.5%, lysozyme 1.5 μ g/ml이 각각 함유된 BHI 액체배지에 접종하여 배양한 후에 균의 증식을 비교한 성적은 Fig. 4-A와 같다. 균 접종 3일 후에 pepsin이나 amylase가 각각 함유된 배지에서는 대조군(BHI)에서 보다 3배이상 증가하였으며, mucin이 함유된 경우에는 대조군에서

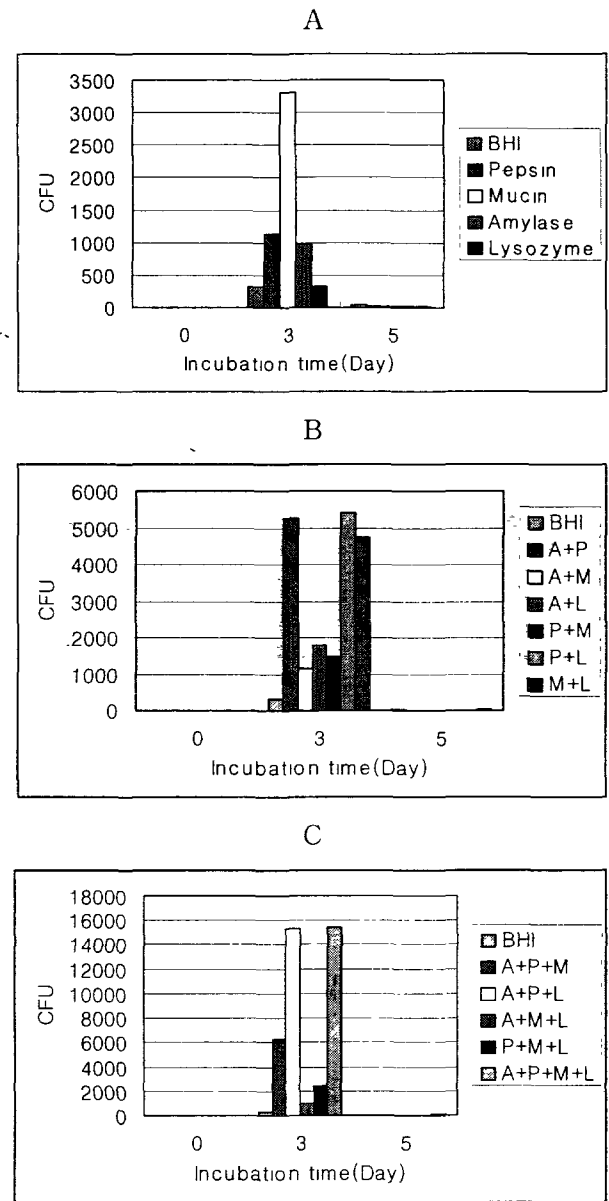


Fig. 4. Growth of *Helicobacter pylori* 94 in the 5% serum BHI broth on day 5.

A: Each amylase, pepsin, mucin, and lysozyme was added to the medium.

B: A+P, A+M, A+L, P+M, P+L, and M+L were added to the medium.

C: A+P+M, A+P+L, A+M+L, P+M+L, A+P+M+L were added to the medium.

Colony forming units (CFU) of *H. pylori* were calculated by the 10^4 /ml.

보다 100배 이상 증가하였으나, lysozyme이 함유된 경우에는 대조군과 차이가 없었다.

6. 5일 배양균에서 두 가지 효소의 병합 처리가 *H. pylori* 94 균주의 증식에 미치는 영향

BHI 액체배지에 5일간 배양한 *H. pylori* 94 균주를 A+P, A+M, A+L, P+M, P+L, M+L이 각각 함유된 BHI 액체배지에 접종하여 배양한 후에 균의 증식을 비교한 성적은 Fig. 4-B와 같다. 균 접종 3일 후에 A+P이 함유된 배지에서는 대조균에서 보다 100배이상 증가하였으며, A+M, A+L, P+M이 함유된 경우에는 대조균 보다 3배 이상 증가하였으며, P+L, M+L이 함유된 경우에는 대조균에서 보다 100배 정도 증가되었다.

7. 5일 배양균에서 세 가지 이상 효소의 병합 처리가 *H. pylori* 94 균주의 증식에 미치는 영향

BHI 액체배지에 5일간 배양한 *H. pylori* 94 균주를 A+P+M, A+P+L, A+M+L, P+M+L, A+P+M+L이 각각 함유된 BHI 액체배지에 접종하여 배양한 후에 균의 증식을 비교한 성적은 Fig. 4-C와 같다. 균 접종 3일 후에 A+P+M이 함유된 배지에서는 대조균에서 보다 30 배 이상 증가하였으며, A+P+L이 함유된 경우에는 대조균 보다 1000배 이상 증가하였으나, A+M+L이 함유된 경우에는 대조균에서 보다 2배 정도만 증가하였으며, P+M+L이 함유된 경우에는 대조균에서 보다 10배 정도 증가되었으나, A+P+M+L이 각각 함유된 경우에는 대조균에서 보다 1000배 이상 증가하였다.

8. 7일 배양균에서 각 효소처리가 *H. pylori* 72균주의 증식에 미치는 영향

BHI 액체배지에 7일간 배양한 *H. pylori* 72 균주를 amylase 0.25 μ g/ml, pepsin 0.25 μ g/ml, mucin 2.5%, lysozyme 1.5 μ g/ml이 각각 함유된 BHI 액체배지에 접종하여 배양한 후에 균의 증식을 비교한 성적은 Fig. 5-A와 같다. 균 접종 3일 후에 amylase나 pepsin이 함유된 배지에서는 대조균(BHI)에서 보다 3배이상 증가하였으며, mucin이 함유된 경우에는 100배 이상 증가하였으나, lysozyme이 함유된 경우에는 대조균과 차이가 없었다.

9. 7일 배양균에서 두 가지 효소의 병합 처리가 *H. pylori* 72 균주의 증식에 미치는 영향

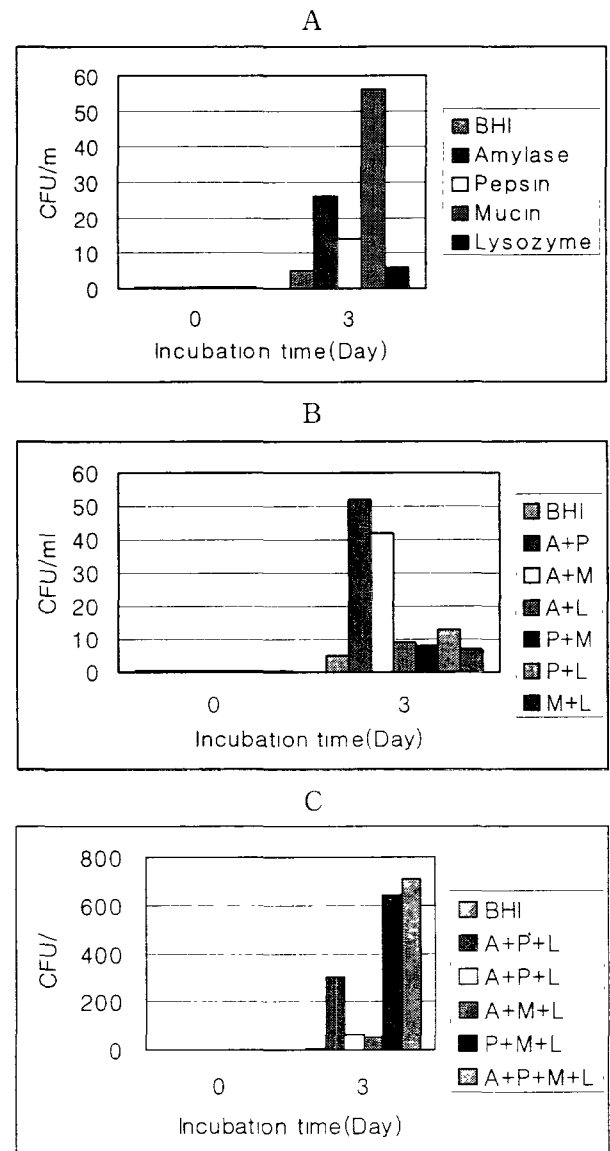


Fig. 5 Growth of *Helicobacter pylori* 72 in the 5% serum BHI broth on day 7.

A: Each amylase, pepsin, mucin, and lysozyme was added to the medium.

B: A+P, A+M, A+L, P+M, P+L, and M+L were added to the medium.

C: A+P+M, A+P+L, A+M+L, P+M+L, A+P+M+L were added to the medium.

Colony forming units (CFU) of *H. pylori* were calculated by the 10^4 /ml

BHI 액체배지에 7일간 배양한 *H. pylori* 72 균주를 A+P, A+M, A+L, P+M, P+L, M+L이 각각 함유된 BHI 액체배지에 접종하여 배양한 후에 균의 증식을 비교한

성적은 Fig. 5-B와 같다. 균 접종 3일 후에 A+P이 함유된 배지에서는 대조군에서 보다 100배이상 증가하였으며, A+M, A+L, P+M이 함유된 경우에는 대조군 보다 10배 이상 증가하였으며, P+L, M+L이 함유된 경우에는 대조군에서 보다 50배 이상 증가되었다.

10. 7일 배양균에서 세 가지 이상 효소의 병합 처리가 *H. pylori* 72 균주의 증식에 미치는 영향

BHI 액체배지에 7일간 배양한 *H. pylori* 72 균주를 A+P+M, A+P+L, A+M+L, P+M+L, A+P+M+L이 각각 함유된 BHI 액체배지에 접종하여 배양한 후에 균의 증식을 비교한 성적은 Fig. 5-C와 같다. 균 접종 3일 후에 A+P+M이 함유된 배지에서는 대조군에서 보다 100배이상 증가하였으며, A+P+L이 함유된 경우에는 대조군 보다 1000배 이상 증가하였으나, A+M+L이 함유된 경우에는 대조군에서 보다 2배 정도만 증가하였으며, P+M+L이 함유된 경우에는 대조군에서 보다 10배 정도 증가되었으나, A+P+M+L이 각각 함유된 경우에는 대조군에서 보다 1000배 이상 증가하였다.

11. 10일 배양균에서 각 효소처리가 *H. pylori* 94 균주의 증식에 미치는 영향

BHI 액체배지에 10일간 배양한 *H. pylori* 94 균주를 amylase 0.25 $\mu\text{g/ml}$, pepsin 0.25 $\mu\text{g/ml}$, mucin 2.5%, lysozyme 1.5 $\mu\text{g/ml}$ 이 각각 함유된 BHI 액체배지에 접종하여 배양한 후에 균의 증식을 비교한 성적은 Fig. 6-A와 같다. 균 접종 3일 후에 amylase, pepsin, mucin이 함유된 경우에는 모두가 대조군에서 보다 100배 이상 증가하였으나, lysozyme이 함유된 경우에는 대조군과 차이가 없었다.

12. 10일 배양균에서 두 가지 효소의 병합 처리가 *H. pylori* 94 균주의 증식에 미치는 영향

BHI 액체배지에 10일간 배양한 *H. pylori* 94 균주를 A+P, A+M, A+L, P+M, P+L, M+L이 각각 함유된 BHI 액체배지에 접종하여 배양한 후에 균의 증식을 비교한 성적은 Fig. 6-B와 같다. 균 접종 3일 후에 A+P이 함유된 배지에서는 대조군에서 보다 100배 이상 증가하였으며, A+M, A+L, P+M, M+L이 함유된 경우에는 각각 대조군 보다 3배 정도 증가하였다.

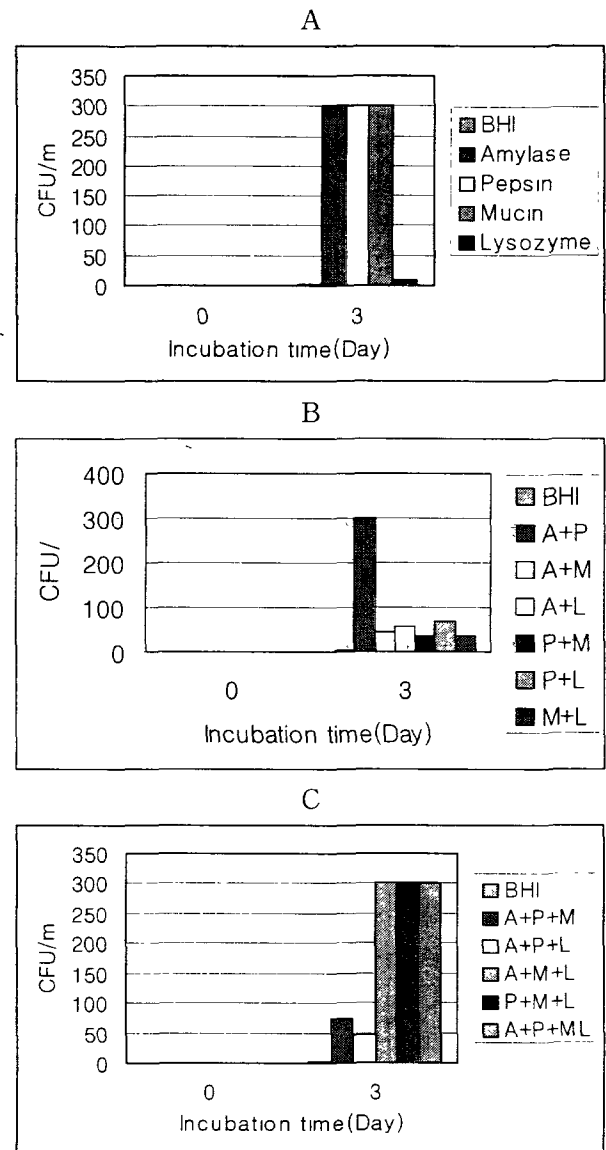


Fig. 6. Growth of *Helicobacter pylori* 94 in the 5% serum BHI broth on day 10.

A: Each amylase, pepsin, mucin, and lysozyme was added to the medium.

B: A+P, A+M, A+L, P+M, P+L, and M+L were added to the medium.

C: A+P+M, A+P+L, A+M+L, P+M+L, A+P+M+L were added to the medium.

Colony forming units (CFU) of *H. pylori* were calculated by the $10^4/\text{ml}$.

13. 10일 배양균에서 세 가지 이상 효소의 병합 처리가 *H. pylori* 94 균주의 증식에 미치는 영향

BHI 액체배지에 10일간 배양한 *H. pylori* 94 균주를 A+P+M, A+P+L, A+M+L, P+M+L, A+P+M+L이 각각 함유된 BHI 액체배지에 접종하여 배양한 후에 균의 증식을 비교한 성적은 Fig. 6-C와 같다. 균 접종 3일 후에 A+P+M이나 A+P+L이 함유된 배지에서는 대조군에서 보다 각각 20배 이상 증가하였으며, A+M+L이나 P+M+L이나 A+P+M+L이 각각 함유된 경우에는 대조군에서 보다 300배 이상 증가하였다.

14. 14일 배양균에서 각 효소처리가 *H. pylori* 94균주의 증식에 미치는 영향

BHI 액체배지에 14일간 배양한 *H. pylori* 94 균주를 amylase 0.25 $\mu\text{g/ml}$, pepsin 0.25 $\mu\text{g/ml}$, mucin 2.5%, lysozyme 1.5 $\mu\text{g/ml}$ 이 각각 함유된 BHI 액체배지에 접종하여 배양한 후에 균의 증식을 비교한 성적은 Fig. 7-A와 같다. 균 접종 3일 후에 amylase가 함유된 배지에서는 대조군에서 보다 4배 정도 증가하였으며, pepsin이 함유된 경우에는 대조군에서 보다 5배 정도 증가하였으며, mucin이 함유된 경우에는 대조군에서 보다 15배 정도 증가하였으나, lysozyme이 함유된 경우에는 대조군과 차이가 없었다.

15. 14일 배양균에서 두 가지 효소의 병합 처리가 *H. pylori* 94 균주의 증식에 미치는 영향

BHI 액체배지에 14일간 배양한 *H. pylori* 94 균주를 A+P, A+M, A+L, P+M, P+L, M+L이 각각 함유된 BHI 액체배지에 접종하여 배양한 후에 균의 증식을 비교한 성적은 Fig. 7-B와 같다. 균 접종 3일 후에 A+P이 함유된 배지에서는 대조군에서 보다 10배 정도 증가하였으며, A+M이 함유된 경우에는 5배 정도 증가하였으며, A+L, P+M, P+L, M+L이 함유된 경우에는 각각 대조군과 차이가 없었다.

16. 14일 배양균에서 세 가지 이상 효소의 병합 처리가 *H. pylori* 94 균주의 증식에 미치는 영향

BHI 액체배지에 14일간 배양한 *H. pylori* 94 균주를 A+P+M, A+P+L, A+M+L, P+M+L, A+P+M+L이 각각 함유된 BHI 액체배지에 접종하여 배양한 후에 균의 증식을 비교한 성적은 Fig. 7-C와 같다. 균 접종 3일 후

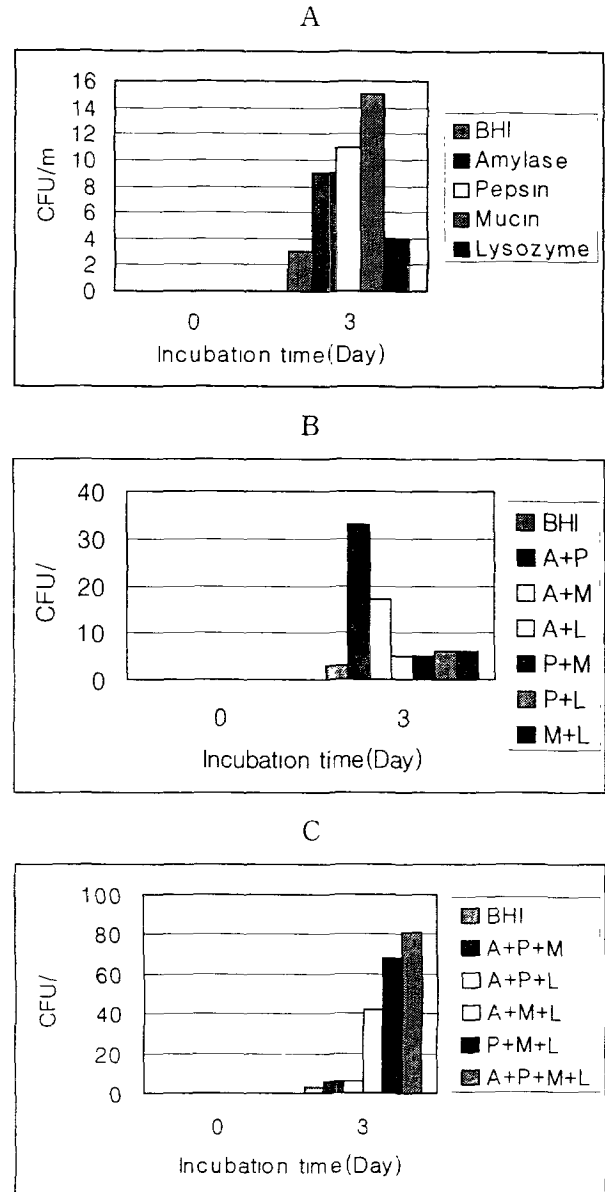


Fig 7. Growth of *Helicobacter pylori* 94 in the 5% serum BHI broth on day 14.

A: Each amylase, pepsin, mucin, and lysozyme was added to the medium.

B: A+P, A+M, A+L, P+M, P+L, and M+L were added to the medium.

C: A+P+M, A+P+L, A+M+L, P+M+L, A+P+M+L were added to the medium.

Colony forming units (CFU) of *H. pylori* were calculated by the $10^4/\text{ml}$.

에 A+P+M이나 A+P+L이 함유된 배지에서는 대조군에서 보다 각각 20배 이상 증가하였으며, A+M+L이나

P+M+L이나 A+P+M+L이 각각 함유된 경우에는 대조군에서 보다 300배 이상 증가하였다.

17. 효소처리가 *H. pylori*의 VT 생성능에 미치는 영향

Amylase, mucin, pepsin, lysozyme 등의 효소를 투여한 BHI 액체배지에 *H. pylori* 균주를 접종 4일간 배양한 배양 상층액에서 VT 역가를 비교한 성적은 Table 1과 Fig. 8과 같다. Amylase (0.25 µg/ml), pepsin (0.25 µg/ml), mucin (2.5 µg/ml), lysozyme (1.5 µg/ml) 농도로 첨가된 BHI 액체배지에 배양된 *H. pylori* 13, 39, 46, 59, 72, 94, 98, 125 균주의 VT 역가는 각각 32, 8, 8, 16, 32, 16, 8, 4배로 BHI 액체배지의 대조군과 차이가 없었으며, 이들 효소를 두 가지 이상 병합 투여한 경우에도 각 균주의 VT 역가는 차이가 없었다. 각 *H. pylori* 균주의 VT 역가는 Fig. 8에서와 같이 RK-13 세포의 neutral red 색소의 침투 정도로 구별하였다.

18. 효소처리가 *H. pylori*의 VT 역가의 중화능에 미치는 영향:

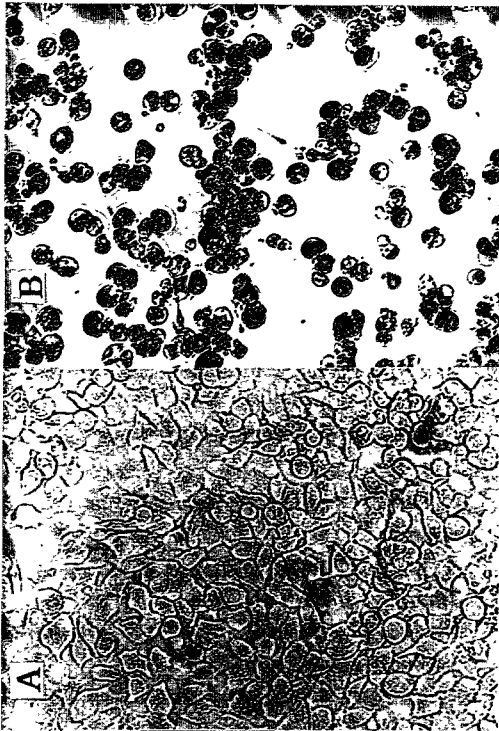


Fig. 8. Neutral red uptake by vacuolated RK-13 cells. The cells were incubated for 24 hours with(B) and without(A) the culture supernatant of *H. pylori*, and stained for 10 min with 0.05% neutral red solution. Magnification: 200x

Table 1. Effect of enzymes on the vacuolating toxin titer of *H. pylori* in vitro

Strains	Vacuolating Toxin titer					
	BHI	BHI+A	BHI+P	BHI+M	BHI+L	BHI+APML
<i>H. pylori</i> 13	32	32	32	32	32	32
<i>H. pylori</i> 39	8	8	8	8	8	8
<i>H. pylori</i> 46	8	8	8	8	8	8
<i>H. pylori</i> 59	16	16	16	16	16	16
<i>H. pylori</i> 72	32	32	32	32	32	32
<i>H. pylori</i> 94	16	16	16	16	16	16
<i>H. pylori</i> 98	8	8	8	8	8	8
<i>H. pylori</i> 125	4	4	4	4	4	4

BHI 액체배지에 *H. pylori* 균주를 접종 4일간 배양한 배양 상층액에 amylase, mucin, pepsin, lysozyme 등의 효소 희석액을 각 농도로 첨가한 후에 VT 역가를 비교한 성적은 Table 2와 같다. BHI 액체배지에 *H. pylori* 각 균주를 접종하여 4일간 배양한 상층액에 amylase (0.25 µg/ml), pepsin (0.25 µg/ml), mucin (2.5 µg/ml), lysozyme (1.5 µg/ml) 농도로 첨가한 후 *H. pylori* 13, 39, 46, 59, 72, 94, 98, 125 각 균주의 VT 역가는 각각 32, 8, 8, 16, 32, 16, 8, 4배로 BHI 액체배지의 대조군과 차이가 없었으며, 이들 효소를 두 가지 이상 병합 투여한 경우에도 각 균주의 VT 역가는 차이가 없었다.

고찰

*H. pylori*는 위점막 상피세포에 부착 증식하는 그람 음성 나선형 간균으로 위내의 낮은 pH, 높은 삼투질농도의 조건에서도 증식이 가능하다.²²⁾ 그러나 인공배지에서의 증식에는 복잡한 영양요구성과 배지의 pH, 습도, 산소분압 등의 증식 조건이 까다로와 일반적인 세균학적 방법으로 배양이 어렵다.²³⁾ 특히 이 균은 배양조건의 변화에 따라 두 가지 형태를 가지는데, 배양조건이 적합하면 활발하게 증식하는 나선형 간균의 형태를 가지나, 배양조건이 부적합하면 인공배지에서 증식이 불가능한 상태의 구형체로 형태적 변화를 한다.²⁴⁾ 이 균체가 구형체로 바뀌게 되는 조건으로는 인공배지에서 배양시간이 경과되면서 배지내의 영양분의 고갈, pH의 상승, 대사산물의 축적 등을 들 수 있다.²⁵⁾ 이 구형체의 *H. pylori*가 살아있는 세균인지, 재 감염시켰을

Table 2. Neutralization effect of enzymes on the vacuolating toxin titer of *H. pylori* in vitro

Strains	Vacuolating Toxin titer					
	BHI	BHI+A	BHI+P	BHI+M	BHI+L	BHI+APML
<i>H. pylori</i> 13	32	32	32	32	32	32
<i>H. pylori</i> 39	8	8	8	8	8	8
<i>H. pylori</i> 46	8	8	8	8	8	8
<i>H. pylori</i> 59	16	16	16	16	16	16
<i>H. pylori</i> 72	32	32	32	32	32	32
<i>H. pylori</i> 94	16	16	16	16	16	16
<i>H. pylori</i> 98	8	8	8	8	8	8
<i>H. pylori</i> 125	4	4	4	4	4	4

때 감염력을 가지는지에 대해서는 아직도 찬반 양론이 있다.²⁵⁾ 또한 이 균의 전파 경로는 구강-구강, 대변-구강으로 추정하고 있으나 명확히 규명되지는 않고 있다.²⁶⁾ 그러므로 이 균의 전파경로의 규명과 구형체가 재 배양되는지에 대한 연구가 필요하다고 생각되었다. 따라서 본 연구에서는 *H. pylori* 균체가 간균의 형태에서 구형체로 바뀌는 시기를 확인하고, 간균일 때와 구형체로 바뀐 후에 각 균을 새로운 배지와 각종 효소가 함유된 새로운 배지에 재 접종하여 증식양상을 관찰함으로써 구강이나 위내의 효소가 *H. pylori*의 증식에 미치는 영향을 알아 보고자 하였다.

본 연구에서 *H. pylori* 균주의 배양일 수(5, 7, 10, 14 일)에 따른 재 증식양상을 보면, 5일 배양한 후 새로운 배지에 계대 배양하였을 때, *H. pylori* 72, 94 균주의 균수는 3일 후에 최고치에 달하였다가 5, 7일 후에 급격히 감소하여 10일 후에는 사멸하였으며, *H. pylori* 98 균주는 3일 후에 최고치에 달하였다가 7일 후에는 사멸하였다. *H. pylori* 균주를 7일 배양한 후 새로운 배지에 계대 배양하였을 때, *H. pylori* 72, 94 균주의 균수는 3일 후에 최고치에 달하였다가 5, 7일 후에 급격히 감소하여 10일 후에는 사멸하였으며, *H. pylori* 98 균주는 3일 후에 최고치에 달하였다가 7일 후에는 사멸하였다. *H. pylori* 균주를 10일 배양한 후 새로운 배지에 계대 배양하였을 때 *H. pylori* 72, 98 균주의 균수는 3일 후에 최고치에 달하였다가 5, 7일 후에 급격히 감소하여 10일 후에는 사멸하였으나, *H. pylori* 98 균주는 3일 후에 최고치에 달하였다가 10일 후에는 사멸하였다. *H. pylori* 균주를 14일 배양한 후 새로운 배지에 계대배양하였을 때 *H. pylori* 72, 98 균주의 균수는 3일 후에 최고치에 달하였다가 5, 7일 후에 급격히 감소하

여 10일 후에는 사멸하였으나, *H. pylori* 98 균주는 3일 후에 최고치에 달하였다가 10일 후에는 사멸하였다. 이로써 일반배지에서 *H. pylori* 균주는 3일 후에 균수가 극기정지기에 달하며, 5일 이후부터 감소하나, 이 시기까지는 형태적으로 변화가 없으며(Fig. 2-A), 7일 이후에는 균수가 급격히 감소하며, 균체의 과반수가 구형체로 바뀌고(Fig. 2-B), 10일과 14일 이후에는 형태적으로는 대부분이 구형체이고, 간균의 형태가 관찰되지만(Fig. 2-C, 2-D), 배양상으로는 더 이상 증식하지 못하였다. 이 결과로 보아 *H. pylori* 72 균주는 빨리 증식하였다가 빨리 사멸하지만, *H. pylori* 94 균주는 서서히 증식하지만 서서히 사멸하는 균임을 알 수 있었으며, 액체배지에서는 10일 이상 장기간 배양된 균액은 계대 배양이 어렵지 않음을 알 수 있었다. Roe 등²⁷⁾은 Brucella blood agar에서 15일 배양한 후 염색하여 검경하였을 때 100%의 균이 구형체였다는 보고와 비교하면 구형체로 바뀌는 시기가 본 연구의 결과에서 다소 빠르지만 이는 액체배지에서는 대사산물의 축적이 더 빠를 것으로 생각되어 Roe 등²⁷⁾의 결과와 유사한 결과라고 생각된다. 따라서 5, 7, 10, 14일간 배양된 *H. pylori* 균액을 5% 말 혈청이 첨가된 BHI 액체배지와 각종 효소가 생리적 농도²⁸⁾로 함유된 BHI 액체배지에 재 접종하여 *H. pylori*의 증식양상을 관찰함으로써 사용된 효소들이 *H. pylori*의 증식에 미치는 영향을 관찰하고자 하였다.

본 연구에서 5일간 배양된 *H. pylori* 72, 94 균주를 BHI 액체배지와 각종 효소가 함유된 배지에 계대배양하였을 때 두 균주 모두에서 amylase (A), pepsin (P), mucin (M), lysozyme (L) 단독 투여시에는 amylase, pepsin, mucin에서 대조군 보다 균의 증식이 증가되었으나, 특히 mucin이 존재할 때가 다른 효소에 비하여 현저히 증가하였으며, 두 가지 효소를 병합 투여하였을 때는 *H. pylori* 72, 94 균주 모두에서 A+P, A+M, A+L, P+M, P+L, M+L이 함유되었을 때 대조군에서 보다 증식이 증가되었으나, 특히 A+P, P+L, M+L이 함유되었을 때 균의 증식이 현저하였으며, 세 가지 이상의 효소를 병합처리 하였을 때는 *H. pylori* 72, 94 균주 모두에서 A+P+L, A+P+M+L이 함유되었을 때 균의 증식이 현저하게 증가되었다. 이로써 증식속도가 빠른 균주나 증식속도가 느린 균주이거나 균의 형태적 변화가 많지 않는 5일 배양균액에서는 이들 효소의 증식촉진 효과가 균주에 따른 차이 없이 나타남을 알 수

있었다.

7일간 배양된 *H. pylori* 72 균주를 BHI 액체배지와 각종 효소가 함유된 배지에 계대배양하였을 때 효소 단독 투여시에는 amylase, pepsin, mucin에서 대조군 보다 균의 증식이 증가되었으나, 특히 mucin이 존재할 때가 다른 효소에 비하여 현저히 증가하였으며, 두 가지 효소를 병합 투여하였을 때는 A+P, A+M이 함유되었을 때 대조군에서 보다 증식이 현저히 증가되었으며, 세 가지 이상의 효소를 병합처리 하였을 때는 A+P+L, P+M+L, A+P+M+L이 함유되었을 때 균의 증식이 현저하게 증가되었다. 이로써 증식속도가 빠른 균주에서 반수 정도의 균이 구형체로 형태적 변화를 일으킨 7일 배양 균액에서도 이들 효소의 증식촉진 효과가 5일에서와 같이 현저히 나타남을 알 수 있었다.

10일간 배양된 *H. pylori* 94 균주를 BHI 액체배지와 각종 효소가 함유된 배지에 계대배양하였을 때 각 효소 단독 투여시에는 amylase, pepsin, mucin에서 대조군 보다 균의 증식이 증가되었으며, 두 가지 효소를 병합 투여하였을 때는 A+P이 함유되었을 때 대조군에서 보다 증식이 증가되었으며, 세 가지 이상의 효소를 병합처리 하였을 때는 A+M+L, P+M+L, A+P+M+L이 함유되었을 때 균의 증식이 현저하게 증가되었다. 이로써 증식속도가 느린 균주에서 대부분의 균이 구형체로 형태적 변화가 일어난 10일 배양균액에서도 이들 효소의 증식촉진 효과가 나타남을 알 수 있었다.

14일간 배양된 *H. pylori* 94 균주를 BHI 액체배지와 각종 효소가 함유된 배지에 계대배양하였을 때 각 효소 단독 투여시에는 amylase, pepsin, mucin에서 대조군 보다 균의 증식이 증가되었으나, 특히 mucin이 존재할 때가 다른 효소에 비하여 현저히 증가하였으며, 두 가지 효소를 병합 투여하였을 때는 A+P, A+M이 함유되었을 때 대조군에서 보다 증식이 증가되었으며, 세 가지 이상의 효소를 병합처리 하였을 때는 A+M+L, P+M+L, A+P+M+L이 함유되었을 때 균의 증식이 현저하게 증가되었다. 이로써 증식속도가 느린 균주에서 구형체로의 변화가 많은 14일 배양균액에서도 이들 효소의 증식촉진 효과가 나타남을 알 수 있었다.

본 연구에서 구강내나 위에서 분비되는 amylase, pepsin, mucin 효소들은 *H. pylori*의 증식을 촉진시킬 수 있으며, 특히 lysozyme은 단독으로는 *H. pylori*의 증식에 영향을 미치지 못하지만 다른 효소들과 공존할 때는 *H. pylori*의 증식을 촉진시킬 수 있다는 결과는 흥

미로운 것이다. 또한 이 효소를 단독으로 처리하였을 때와 두가지를 병합하였을 때보다 4가지 효소를 모두 병합하였을 때 *H. pylori*의 증식이 더욱 현저한 것은 이들 효소가 공존하는 구강내나 위내에서 이들 효소가 *H. pylori*의 증식을 촉진시킬 수 있는 가능성이 있다고 생각된다. 이와 같은 결과는 Mori 등¹⁴⁾의 타액이 *H. pylori*의 증식을 촉진시킨다는 결과와 Li 등²⁹⁾과 Nguyen 등³⁰⁾의 타액에서 *H. pylori*의 분리율이 높다는 보고와, Pytko-Polonczyk 등³¹⁾의 구강내가 *H. pylori*의 영원한 서식처라는 보고 등과 일맥상통하는 하는 것으로 생각된다. 그러나 이들 효소가 어떤 기전으로 *H. pylori*의 증식을 촉진시키는가에 대한 연구가 뒤따라야 할 것으로 생각된다. Amylase (0.25 $\mu\text{g/ml}$), pepsin (0.25 $\mu\text{g/ml}$), mucin (2.5 $\mu\text{g/ml}$), lysozyme (1.5 $\mu\text{g/ml}$) 농도로 첨가된 BHI 액체배지에 *H. pylori* 균주를 접종 4일간 배양한 배양 상층액에서 각 균주의 RK-13세포에 대한 VT 역가는 대조군과 차이가 없었으므로, 이 효소들은 *H. pylori* 균주의 VT 생성에는 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다. 또한 *H. pylori* 균주를 접종 4일간 배양한 배양 상층액에 amylase (0.25 $\mu\text{g/ml}$), pepsin (0.25 $\mu\text{g/ml}$), mucin (2.5 $\mu\text{g/ml}$), lysozyme (1.5 $\mu\text{g/ml}$) 농도로 첨가한 후 각 *H. pylori* 균주의 VT 역가는 대조군과 차이가 없었으므로, 이 효소들은 *H. pylori* 균주의 VT 역가를 증화시키지도 않음을 알 수 있었다.

본 연구에서 구강내나 위에서 분비되는 amylase, pepsin, mucin 효소들은 *H. pylori*의 증식을 촉진시킬 수 있으며, 이 효소들이 두 가지 이상 공존할 때는 *H. pylori*의 증식을 촉진효과가 증가된다는 것은 이들 효소가 공존하는 구강내나 위내에서 *H. pylori*의 증식을 촉진시킬 수 있는 가능성이 있을 것으로 생각된다. 따라서 *H. pylori*는 대부분이 구형체로 대변으로 배설되지만 구강내로 들어오면 타액내의 각종 효소들에 의해 증식가능하게 될수 있는 가능성이 있으며, 배변-구강의 감염경로가 이루어 질 수 있을 것으로 생각된다.

결론

구강이나 위내에서 많이 분비되는 amylase, mucin, pepsin, lysozyme 등이 *H. pylori*의 증식과 VT 역가에 어떤 영향을 미치는가를 검토하여 본바 다음과 같은 결론을 얻었다.

5% 말 혈청이 함유된 BHI 액체배지에서 *H. pylori* 균

주를 5일간 배양하였을 때는 대부분의 균이 간균의 형태였으나, 7일 배양에서는 대부분의 균이 구형으로 바뀌었으며, 10일 배양에서는 거의 대부분의 균이 구형체였고, 14일 배양에서는 거의 모든 균이 구형체였으며, 균수도 적었다.

5일과 7일 배양된 *H. pylori* 72 및 94 균주는 amylase, mucin, pepsin이 각각 단독으로 첨가된 배지나, 두 가지나 세 가지의 효소를 병합 투여한 배지에서 균의 증식이 현저히 증가하였다. 10일과 14일 배양된 *H. pylori* 94 균주도 amylase, pepsin, mucin이 각각 단독으로 첨가되었거나, 두 가지나 세 가지 이상의 효소가 병합 투여된 배지에서 균의 증식이 현저히 증가하였다.

Amylase, mucin, pepsin, lysozyme 등의 효소가 첨가된 배지에서 *H. pylori*의 VT 생성에는 영향이 없었으며, 이 효소들은 *H. pylori*가 생성한 VT 역가에도 영향을 미치지 못하였다.

이상의 결과로써 구형체의 *H. pylori* 균주는 amylase, mucin, pepsin 등의 효소가 단독 혹은 두 가지나 세 가지 이상이 공존하는 상태에서 증식이 더욱 왕성하므로, 이 효소들이 존재하는 구강 경로를 통하여 *H. pylori*가 감염된다는 가설을 입증할 수 있었으며, 이들 효소는 *H. pylori*의 VT 생성이나 VT 역가에는 영향을 미치지 못한다는 사실을 알 수 있었다.

참고문헌

- Marshall BJ and Warren JR: Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* I: 1273-1274, 1983
- Marshall BJ and Warren JR: Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* I:1311-1315, 1984
- Marshall BJ, Warren JR, Francis GJ: Rapid urease test in the management of *Campylobacter pyloridis* associated gastritis. *Am J Gastroenterol* 82: 200-210, 1987
- Graham DY, Lew GM, Klein PD: Effect of treatment of *Helicobacter pylori* infection on the long-term recurrence of gastric or duodenal ulcer. *Ann Intern Med* 116: 705-708, 1992
- Forman D, Eurogast study group: An internal association between *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. *Lancet* 341: 1359-1362, 1993
- 장명웅, 송갑영, 차형수: 인삼추출물 등이 *Helicobacter pylori*의 vacuolating toxin 생성에 미치는 영향. *대한미생물학회지* 32: 539-551, 1997
- 이광호, 윤희상, 백승철, 이우근, 조명제, 최휴진, 맹국영, 고광욱: 한국인의 위염 원인균 *Helicobacter pylori*에 관한 보균실태. *대한미생물학회지* 25: 475-490, 1990
- 송갑영, 장명웅: 위암환자에서 분리된 *Helicobacter pylori*의 항생물질에 대한 감수성과 저항성 균에 대한 항생제 병합요법의 효과. *대한미생물학회지* 34: 543-554, 1999
- Thomas JE, Gibson GR, Darboe MK, Dale A, Weaver LT: Isolation of *H. pylori* from human feces. *Lancet* 340: 1194-1195, 1993
- Nguyen AM, Engstrand L, Genta RM, Graham DY: Detection of *H. pylori* in dental plaque by reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 32: 783-787, 1993
- 백승철, 김중배, 조명제, 김영채, 박철근, 유항희, 최휴진, 이광호: 한국인 정상성인의 *Helicobacter pylori* 보균율. *대한미생물학회지* 25: 455-462, 1990
- Bode G, Mauch F, Malfertheiner P: The coccoid forms of *Helicobacter pylori*. Criteria for their viability. *Epidemiol Infect* 111: 483-490, 1993
- Catrenich CE, Makin KM: Characterization of the morphologic conversion of *Helicobacter pylori* from bacillary to coccoid forms. *Scand J Gastroenterol* 26: 58-64, 1991
- Mori H, Nishizawa Y, Miki T, Yano I, Tatsumi N, Yamaguchi T: Effect of saliva on the growth of *Helicobacter pylori*. *Osaka City Med J* 45: 15-23, 1999
- Cover TL, Dooley CP & Blaser MJ: Characterization of and human serologic response to proteins in *Helicobacter pylori* broth culture supernatants with vacuolizing cytotoxin activity. *Infect Immun* 58: 603-610, 1990
- 神谷 茂: *H. pylori*의 생물학적 특성. *醫學のあゆみ* 169: 255-258, 1994
- 김충기, 정승수, 이점철, 서대홍, 송갑영: 위 질환 환자에서 분리된 *Helicobacter pylori*의 공포화독소 생성. *대한내과학회지* 54: 1-9, 1998
- Cover TL, Halter SA & Blaser MJ: Characterization of HeLa cell vacuoles induced by *Helicobacter pylori* broth culture supernatant. *Hum Pathol* 23(9): 1004-1010, 1992
- Kamiya S, Taniguchi T, Yamamoto T, Shirai T, Harasawa S, Miwa T, Ozawa A: Evaluation of rapid urease test for detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens. *Eur J Epidemiol* 9: 450-452, 1993
- Kamya Shigeru, Masanori Kai, Atsushi Ozawa, Hirohisa Kobayashi, Takayuki Shirai, Shigeru Harasawa and Takeshi Miwa: Characteristics of vacuolating toxin produced by *Helicobacter pylori*. *European J Gastroenterol & Hepatology* 6(suppl 1): S23-S27, 1994
- Cover TL, Cao P, Lind CD: Correlation between vacuolating cytotoxin production by *Helicobacter pylori* isolates in vitro and in vivo. *Infect Immun* 61: 5008-5012, 1993

22. Graham DY, Go MF: *Helicobacter pylori* current status. Gastroenterology 105: 279-282, 1993
23. Shirai M, Morshed MG, Akada JK, Nakazawa T: Coccoid-like bodies of *Helicobacter pylori* under anaerobic conditions. Gut(Abstract) 41: A11, 1997
24. Cellini L, Allocati N, Angelucci D, Lezzi T, Di Campi E, Dainelli B: Coccoid *Helicobacter pylori* not culturable in vitro reverts in mice. Microbiol Immunol 38: 843-850, 1994
25. West AP, Miller MR, Tompkins DS: Survival of *Helicobacter pylori* in water and saline. J Clin Pathol 43: 609-613, 1990
26. Megraud F: Transmission of *Helicobacter pylori*: faecal-oral versus oral-oral route. Aliment Pharmacol Ther 9 (Suppl 2): 85-91, 1995
27. Roe IH, Son SH, Oh HT, Choi J, Shin JH, Lee JH, Hah YC: Changes in the evolution of the antigenic profiles and morphology during coccoid conversion of *Helicobacter pylori*. Kor J Intl Med 14: 9-14, 1999
28. Ganong WF: Review of Medical Physiology, 17th ed. Lange, 1995, Connecticut, 341-441
29. Li C, Musich PR, Ha T, Freguson DA, Chi DS, Thomas E: High prevalence of *Helicobacter pylori* in saliva demonstrated by a novel PCR assay. Clin J Pathol 48: 662-666, 1995
30. Nguyen AM, Zaatari FA, Graham DY: *Helicobacter pylori* in the oral cavity. A critical review of the literature. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 79: 705-709, 1995
31. Pytko-Polonczyk J, Konturek SJ, Karczewska E, Bielanski W: Oral cavity as permanent reservoir of *Helicobacter pylori* and potential source of reinfection. J Physiol Pharmacol 47: 121-129, 1996