

*Helicobacter pylori*의 병원성 비교를 위한 gerbil의 수침구속 스트레스 모델

이진욱¹ · 김옥진^{1,2*}

¹서울대학교 의과대학 실험동물학교실

²서울대학교 의과대학 특수생명자원연구센터

(게재승인: 2004년 11월 8일)

Water-Immersion-Restraint Stress model in Mongolian gerbil for comparison of pathogenicity of *Helicobacter pylori* strains

Jin-Uk Lee¹ and Okjin Kim^{1,2*}

¹Department of Laboratory Animal Sciences, College of Medicine, Seoul National University, Seoul 110-799, Korea

²Center for Animal Resource Development, College of Medicine, Seoul National University, Seoul 110-799, Korea

(Accepted: November 8, 2004)

Abstracts : *Helicobacter pylori* (*H. pylori*)-infection is an important pathogen of stomach cancer after chronic gastritis and ulceration in the stomach and duodenum. However, the virulences of *H. pylori* strains have not been well-defined between clinical isolates. This study was designed to establish water-immersion-restraint stress (WIRS) model in mongolian gerbil for comparison of pathogenicity of *H. pylori* strains. To determine an optimal duration time for WIRS model in gerbil, 5-week-old Mongolian gerbils were divided into different groups by WIRS duration time. After graded duration of WIRS, the macroscopic ulcer index (UI) was measured with the stomach and duodenum of sacrificed animal. There were no significant differences between male and female in same duration group. However, the UI increased significantly in a time-dependent fashion. The group of 6 hours-WIRS animals showed severe hemorrhage and ulceration in their stomach and duodenum. On the other hand, the very mild lesions induced in 2 hours-treated animals. Therefore, we determined an optimal duration time for WIRS model in gerbil as 4 hours. Thereafter, we evaluated whether this WIRS model in gerbil could be used as an useful tool for *in vivo* comparison of pathogenicity of *H. pylori* strains by enhancement of pathological severity in *H. pylori*-infected gerbils. Mongolian gerbils were divided into *H. pylori*-infected and PBS-inoculated groups. Thereafter, they were divided again into 4 hours-WIRS and no WIRS subgroups. After treatment, the severity of pathological changes was evaluated in a same manner with previous duration-determining experiment. When the animals were exposed to WIRS, the UI was significantly higher in the infected group than in the uninfected group. These results suggested that the established gerbil-WIRS model in this study enhanced effectively the severity of pathogenic changes in the *H. pylori*-infected Mongolian gerbils and could be used as an useful tool for *in vivo* comparison of pathogenicity of *H. pylori* strains.

Key words : *Helicobacter pylori*, pathogenicity, mongolian gerbil, water-immersion-restraint stress

서 론

위점막에 미생물이 존재한다는 것은 1893년 Bizzozero

가 개의 위점막에서 spirochetes의 세균을 관찰 보고한 이후로 여러 연구자에 의해서 사람과 동물의 위점막에서 유사한 세균을 관찰 보고하였으나, 음식으로

본 연구는 Brain Korea 21 인간생명과학연구단의 지원과 서울대학교 의과대학 특수생명자원연구센터의 내부정책과제 연구비를 일부 지원받아 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

*Corresponding author: Okjin Kim

Department of Laboratory Animal Sciences, College of Medicine, Seoul National University, Seoul 110-799, Korea

[Tel: +82-2-740-8077, Fax: +82-2-763-520, E-mail: kimoj@snu.ac.kr]

부터 소화되지 않은 세균으로 생각하고, 병리학적 의미는 없다고 생각하였었다 [5]. 그러나, *Helicobacter pylori*(*H. pylori*)가 Marshall과 Warren에 의하여 최초로 1984년에 만성 위염 환자의 위점막 생검조직에서 나선형의 만곡형 그람음성 간균으로 분리 배양되었고, 이후로 위염, 위궤양, 십이지장궤양, 위암에 이르는 각종 소화기 질환의 주요한 원인 인자로 밝혀지고 있다 [6, 7, 8, 12]. 서양과는 달리 위장질환이 많은 국내에서는 정상인에서 60-70%, 위염환자에서 64-95%, 위궤양환자에서 75-94%, 십이지장궤양환자에서 79-90%, 위암환자에서 40-60%의 *H. pylori* 보균율을 보이고 있다 [11]. 정상인과 위염 및 위궤양환자에서 *H. pylori* 보균율이 60-90%로 유의성 있는 차이가 없고, 위암환자에서 오히려 40-60%로 오히려 낮은 보균율을 보이는 점 때문에 질환에 따른 보균율 비교로는 *H. pylori* 병태생리를 충분히 설명할 수 없는 실정이다 [2]. 감염된 환자들에서 임상 증상들의 발현에 대한 이러한 불일치한 현상들을 *H. pylori*의 병원성 차이로 설명하고 있는데, *H. pylori*에 양성이라도 병원성이 낮은 균주에 감염되면 무증상으로 진행되고, 병원성이 높은 *H. pylori* 균주에 감염이 되면 위십이지장 질환이 유발되는 것으로 설명되어지고 있다 [9]. 현재까지 *H. pylori*의 임상 분리주들의 병원성 차이를 비교할 수 있는 시스템은 개발되어 있지 않으며, 그 정보 또한 제한되어 있다. 현재까지 *H. pylori*의 병원성을 결정하는 인자로는 vacuolating cytotoxin(*vacA*) gene [4], cytotoxin associated protein(*cagA*) gene [17], urease [3], catalase [14], superoxide dismutase [15] 등이 추정되고 있으며, 이들 병원성 인자들에 대한 분자생물학적 분석들이 활발히 수행되어지고 있다. 그러나, 최근의 일부 보고들에 의하면 이러한 유전자들의 유무와 병원성의 발현 사이에 상관관계가 높지 않다고 한다 [18]. 따라서 이들 유전자들의 유무로 *H. pylori* 균주들의 병원성을 단순히 판단하는 것은 오류가 따른다는 것을 알 수 있으며, 이러한 이유로 병원성의 차이를 알아 볼 수 있는 시스템의 개발이 요구되어지고 있다.

본 연구는 *H. pylori* 균주들의 병원성 차이를 구분할 수 있는 *in vivo* 시스템을 개발하고자 수행되었다. 이를 위하여 Mongolian gerbil에서의 수침구속 스트레스(water-immersion-restraint stress, WIRS) 노출 시간을 정하기 위한 시험을 수행하고, Mongolian gerbil에 *H. pylori* 균주들의 감염 후 WIRS의 병행으로 *H. pylori* 균주들의 병원성 차이를 단기간에 유발된 병변의 정도 차이로 알아볼 수 있는지 평가하고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물

서울대학교 의과대학 실험동물실에서 특정병원체무제(specific-pathogen free, SPF)의 상태로 계통이 유지되고 있는 Mongolian gerbil(*Meriones unguiculatus*)을 4주령에 공급받아 1주일 동안 SPF 사육실에서 순화사육한 후 실험에 사용하였다. 사육기간 중 온도는 $23\pm 1^\circ\text{C}$, 습도 $50\pm 5\%$, 소음 60 phone 이하, 조명시간 08:00-20:00(1일 12시간), 환기 시간당 10-12회의 SPF 환경에서 사육되었으며, 사료는 실험동물전용사료(푸리나)를 2.0 Mrad의 방사선으로 멸균시켜 자유급식 시켰고, 음수는 자외선 멸균수를 자유 급수하였다. 본 연구에 사용된 실험동물에 관련된 모든 실험과정과 절차는 서울대학교 의과대학 실험동물 운영위원회(Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)의 규정을 준수하며 수행되었다.

H. pylori 배양

H. pylori(ATCC 43504, American Tissue Culture Collection, Rockville, MD) 균주를 10% calf serum이 첨가된 브루셀라 한천배지에 접종 후, 10% CO₂, 100% 습도가 유지되는 37°C 항온기에서 3일간 배양하였다. 배양된 *H. pylori*를 멸균된 PBS(pH 7.2)가 들어 있는 튜브에 모은 후, 1 ml 당 2.0×10^9 colony-forming unit(CFU)의 균 수를 포함하게 준비하여 실험에 사용하였다.

적정 WIRS 시간 결정 및 성별 차이 확인 시험

1주일간의 순화사육 후 5주령의 건강한 암·수 Mongolian gerbil을 각각 18두씩, 총 36두를 시험에 사용하였다. 적정 WIRS 시간을 알아보기 위하여 WIRS 0 시간, 30분, 1시간, 2시간, 4시간, 6시간 노출 군으로 분류한 후, 각 군당 암·수 각각 3두, 총 6두를 사용하여 군 구성을 하였다. 분류된 Mongolian gerbil을 18시간 절식시킨 후, WIRS 전용의 stress cage에 넣어 $21\pm 1^\circ\text{C}$ 로 유지되는 수조에 검상돌기가 물에 잠기도록 유지하였다. 각 군 별로 정해진 WIRS 시간을 적용한 후, 각각의 동물들을 ether 마취 하에 치사시킨 후 위와 십이지장을 적출하여 Ulcer Index(UI)를 측정하여 각 군별 차이를 평가한 후, 적정 WIRS 시간을 결정하였고, 암·수의 성별 차이에 따른 시험의 영향을 알아보았다.

H. pylori 감염 후 WIRS 병행에 따른 영향 평가

1주일간의 순화사육 후 5주령의 건강한 수컷 Mongolian gerbil 20두를 시험에 사용하였다. 각 군당 5두의 동물들을 사용하여 *H. pylori* 감염 후 WIRS 적용군(I 군), *H. pylori* 감염 후 WIRS 비적용군(II 군), PBS

투여 후 WIRS 적용군(III 군), PBS 투여 후 WIRS 비적용군(IV 군)의 4개 군으로 나누어 실험을 수행하였다. I 군과 II 군의 5주령 Mongolian gerbil을 18시간 절식시킨 후, 1 ml 당 2.0×10^9 colony-forming unit(CFU)의 균수가 포함되어 준비된 배양액을 두당 0.5 ml 씩 마우스용 존대를 이용하여 경구(p.o.)로 투여하여 *H. pylori* 감염을 유발하였다. III 군과 IV 군의 동물들은 18시간 절식 후 멸균 PBS(pH 7.2)를 0.5 ml 씩 경구 투여하였다. 투여 후 각 군의 동물들은 12시간의 절식 후 사료를 급여하였다. 절식 동안에 음수는 자유 급여할 수 있도록 하였다. *H. pylori* 또는 PBS 투여된 각 군의 동물들은 1주일 후 18시간 절식시킨 후, I 군과 IV 군의 개체들은 4시간의 WIRS를 적용시키고, II 군과 III 군의 동물들은 WIRS에 노출시키지 않고, ether 마취 하에 치사시킨 후 위와 십이지장을 적출하여 UI를 측정하여, WIRS가 *H. pylori*에 감염된 gerbil에서 유의한 차이를 유발하는지를 평가하였다.

Ulcer index의 측정

각 시험 군별로 WIRS 수행 후 적출된 위는 위의 대만부를 따라 절개하여 펼친 후에 실체현미경(X 10)을 사용하여 병변을 관찰하고, UI를 측정하였다. UI는 각 병변의 가로길이 X 세로길이(mm²)의 총합으로 계산하였다. 각 개체의 UI를 구한 후 각 군별로 암·수의 평균 UI를 구하였다. 적출된 십이지장은 길이방향으로 절개하여 펼친 후에 실체현미경(X 10)을 사용하여 병변을 관찰하고, 동일한 방법으로 각 군의 암·수의 평균 UI를 구하였다.

결 과

적정 WIRS 시간 결정 및 성별 차이 확인 시험

WIRS 노출 시간에 따른 Mongolian gerbil의 위 및 십이지장의 병변 유발에 차이가 있는지를 평가하기 위하여 0분, 30분, 1시간, 2시간, 4시간, 6시간의 각각 다른 노출시간을 적용한 결과, 노출시간의 증가에 따라 위 및 십이지장의 UI도 증가됨을 알 수 있었다(Fig. 1). WIRS에 의하여 유발된 위 병변은 선위 부위에 암적색 출혈 병변을 동반한 궤양 병소의 산재가 특징적이었으며, WIRS 노출시간의 증가와 상관적으로 궤양병소들의 면적들도 증가되는 것을 알 수 있었다. 6시간의 WIRS 노출에 의하여 매우 심한 위궤양 병변들이 유발되었으며, 위 내강 내에 암적색 혈액응고괴를 포함한 삼출물들이 차있는 소견이 관찰되었다. 2시간 이하의 WIRS 적용에 의하여 유도된 병변들은 그 정도가 약하고, 4시간 이상의 WIRS 적용 동물들에 비교하여 UI 또한 현격하게 감

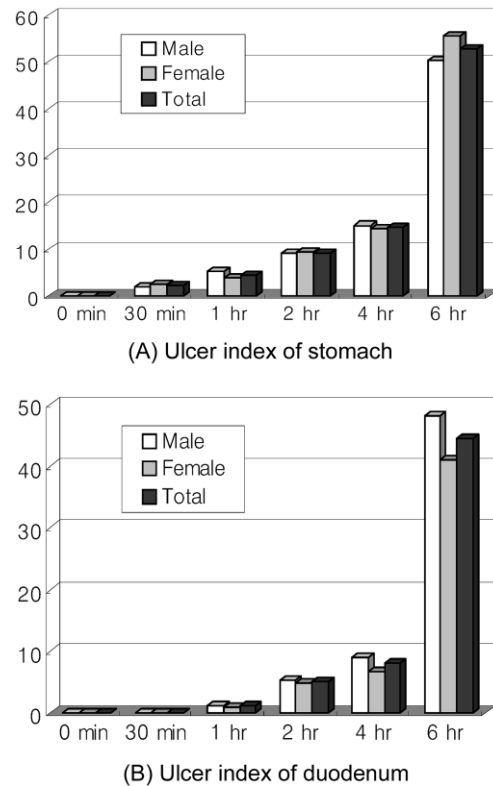


Fig. 1. Ulcer Index of stomach (A) and duodenum (B) after water-immersion-restraint-stress (WIRS) for optimal WIRS-time decision.

소되었다(Fig. 1). 십이지장의 병변은 위 병변과 유사한 궤양 병소들이 주된 병변이었으며, 위 병변에 비교하여 UI는 감소된 것을 알 수 있었다(Fig. 1). 십이지장 또한 WIRS 노출 시간에 상관되게 UI가 증가되었다. 같은 WIRS 노출 시간에 적용된 암·수 간에 UI에 성별 차이가 있는지를 비교한 결과, 암·수 간에 차이는 인정되지 않았다. 이러한 결과들을 토대로 2시간 이하의 WIRS 노출은 미약한 병변의 유도 때문에, 그리고 6시간의 노출은 매우 심한 병변의 유발로 인해 *H. pylori* 균주간 병원성 차이를 증폭시켜주는 역할로는 부적절하다고 판단되어 Mongolian gerbil의 WIRS 적정 시간은 4시간으로 정하였다.

***H. pylori* 감염 후 WIRS 병행에 따른 영향**

Mongolian gerbil을 이용하여 *H. pylori* 감염 후 WIRS 적용하는 모델이 *H. pylori*에 의한 *in vivo* 병변들을 증폭시켜 줄 수 있는지를 평가하고자 실험을 수행하였다. 이를 위하여 가장 적절한 Mongolian gerbil에서의 WIRS 노출 시간을 정하기 위한 시험이 선행되었고, 그 결과 4

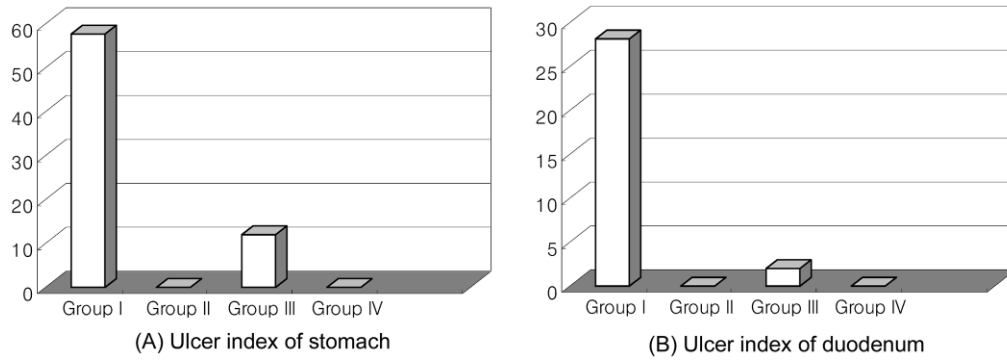


Fig. 2. Ulcer Index of stomach (A) and duodenum (B) after water-immersion- restraint-stress (WIRS) with or without *H. Pylori* infection. Group I (*H. pylori*+WIRS), Group II (*H. pylori*+No WIRS), Group III (PBS+WIRS), Group IV (PBS+No WIRS).

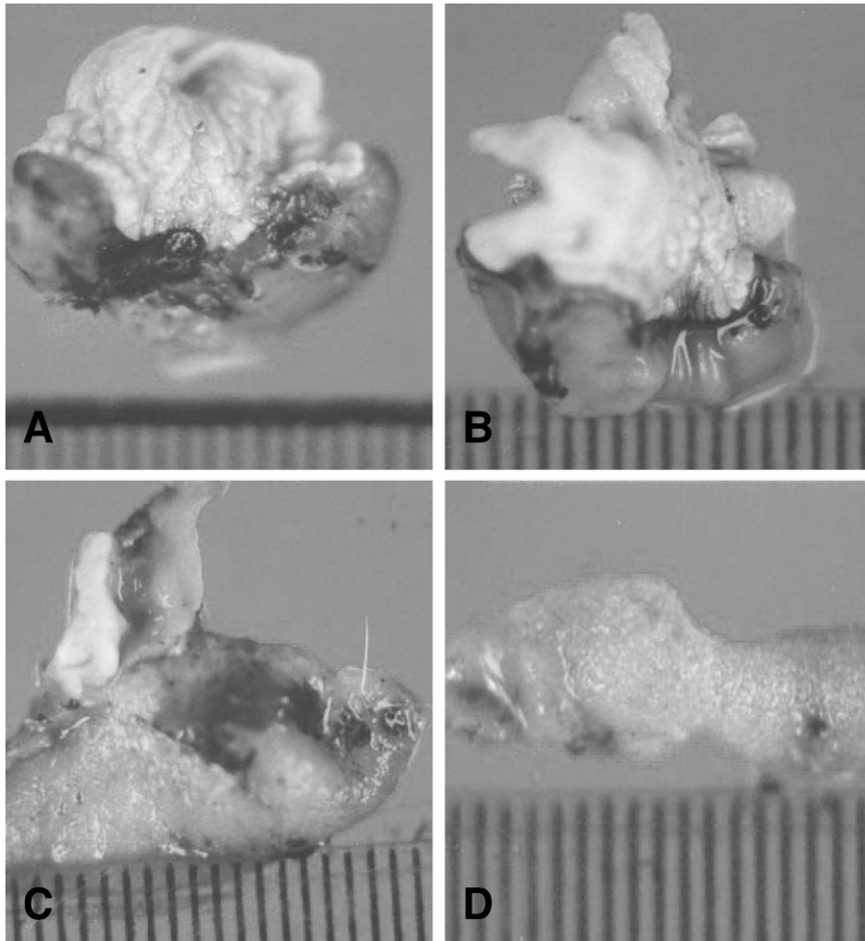


Fig. 3. Gross findings of the stomach and duodenum. A. Stomach of Group I (*H. pylori*+WIRS) gerbil. There were severe hemorrhagic gastric erosions and ulcers on the glandular stomach. B. Stomach of Group III (PBS+WIRS) gerbil. There were several gastric erosions and ulcers on the glandular stomach. C. Duodenum of Group I (*H. pylori*+WIRS) gerbil. There were severe hemorrhagic erosions and ulcers. D. Duodenum of Group III (PBS+WIRS) gerbil. There was one focal ulcer lesion.

시간의 WIRS 노출시간이 결정되었다. 개체당 1×10^9 CFU의 *H. pylori*를 감염시킨 후 1주일 만에 4시간의 WIRS를 적용하였을 때, 대조군에 비교하여 위 및 십이지장의 UI가 유의한 차이를 보여주었다(Fig. 2). *H. pylori*에 감염된 Mongolian gerbil에 WIRS를 적용하였을 때, 비감염된 개체에 WIRS를 적용하였을 때 보다 위 궤양 병소의 UI는 증가되었다(Fig. 3A, Fig. 3B). 십이지장의 경우도 위 점막의 변화와 유사하게 감염된 개체가 비감염 개체보다 궤양 병소가 증가되었다(Fig. 3C, Fig. 3D). 이러한 결과로부터 WIRS는 *H. pylori*에 감염된 Mongolian gerbil에서 그 병원성을 효과적으로 증폭시킬 수 있음을 알 수 있었다. 본 연구를 통하여 개발된 Mongolian gerbil을 이용한 수침구속 모델은 *H. pylori* 균주들의 병원성 차이를 구분할 수 있는 *in vivo* 시스템으로 사용될 수 있을 것으로 판단되었다.

고 찰

*H. pylori*의 유병율은 한국인에서 5살 이하에서 50%이지만, 8살에 80%, 20살 이상에서는 90%를 보이는 것으로 보고되어지고 있다 [10]. 이러한 자료들에 의하면 대부분의 한국인들은 *H. pylori*에 감염되어 있으며, 평균 40-45년 이상의 생애 동안, *H. pylori*에 감염된 상태로 지낸다는 것을 알 수 있다. 한국인의 연간 위암 발생율은 10만명당 남성 57.9와 여성 25.1로 보고되고 있다 [1]. 한국인의 위암 발생율이 다른 나라 사람들에 비교하여 매우 높은 발생율이지만, 대부분의 한국인 성인이 *H. pylori*에 감염된 점을 고려한다면, 상대적으로 낮은 위암 발생으로 해석될 수 있다. 즉, *H. pylori*에 감염되어도 무증상으로 건강하게 지내는 환자들이 있는가 하면, 위십이지장의 염증 및 궤양으로 고통을 받거나 암에 걸려 사망하는 환자가 있는 것을 설명하기 위한 연구들이 필요하다는 것을 알 수 있다. 이러한 불일치한 현상들을 해석하기 위하여 인종 차이, 섭식하는 음식의 차이 등의 여러 가지 측면의 설명 등이 되어지고 있지만, 최근 보고들에 의하면 *H. pylori* 균주들의 병원성 차이가 중요한 인자로 작용하여 *H. pylori*에 양성인더라도 병원성이 낮은 균주에 감염되면 무증상으로 진행되고, 병원성이 높은 *H. pylori* 균주에 감염이 되면 위십이지장 질환이 유발되는 것으로 설명하고 있다 [9]. 위십이지장 질환 환자에서 항생제를 이용한 *H. pylori*의 치료는 위염 및 위궤양 재발을 낮출 수 있으나, 항생제 내성 균주들의 출현과, *H. pylori*의 유병율이 높기 때문에 치료 후 주변 감염자들로부터 흔히 재감염이 일어나서 *H. pylori*의 완전 박멸은 어려운 것으로 전망되고 있으며, 다른 대안으로 병원성이 높은 균주를 선별적으로 선택

하여, 그 균주에 감염된 환자들을 선택적으로 치료하는 방법들이 현실적인 것으로 거론되고 있다 [13]. 따라서 *H. pylori*의 병원성 차이를 알아낼 수 있는 시스템의 개발은 *H. pylori*의 연구에 매우 중요한 의미를 가지고 있으며, 개발된 시스템들을 이용하여 병원성이 높은 균주들의 선별과 연구를 통하여 *H. pylori* 병원성에 관련되는 인자들의 발견과 고병원성 *H. pylori* 균주의 확보를 통한 *H. pylori* 백신 개발에 기여할 수 있을 것으로 기대되어진다.

H. pylori 감염을 연구하기 위한 실험동물 모델로는 Mongolian gerbil이 개발되어 사용되고 있으며, 감염 후 만성 위염의 유발과 위암발생 양상이 사람의 *H. pylori* 병태양상과 유사한 것으로 보고되고 있다 [8]. Mongolian gerbil에 *H. pylori*는 사람의 병태생리와 유사하게 만성으로 진행되어 위염, 위궤양과 위암을 유발하는 것으로 알려져 있다 [8]. 그러나 Mongolian gerbil에서 *H. pylori*의 감염에 의한 위십이지장 병변의 발현은 수개월 이상의 기간이 소요되는 것으로 알려져 있어 Mongolian gerbil을 이용하여 *H. pylori* 균주들의 병원성 차이를 알아본다는 것은 장기간의 시간 소요가 요구되어지는 문제점을 안고 있다 [5]. 한편, 설치류를 이용한 위염 및 위궤양 유발을 위하여 랫드를 이용한 WIRS 모델 [16]이 개발되어 위염 및 위궤양 치료제의 *in vivo* 약효 검색을 위하여 자주 이용되고 있다. 그러나 Mongolian gerbil에서 WIRS에 의한 위염 및 위궤양 유발 양상에 대한 유용한 자료들은 많지 않은 실정이다. 본 연구에서 gerbil은 암·수의 성별 차이 없이 WIRS에 노출되었을 때, 노출시간에 상관적으로 위 및 십이지장 궤양 병소의 정도가 증가되는 것을 알 수 있었다. 랫드와 마우스를 이용한 WIRS의 다른 연구 보고들은 위궤양의 유무에 주안점을 두고 있으나, 본 연구에 따르면 gerbil의 경우에 십이지장의 병변 또한, WIRS에 노출되었을 때 위 점막과 유사한 병변이 유발되었다. 이러한 연구 결과들은 gerbil을 사용한 WIRS 실험에 기초 자료를 제공할 수 있을 것으로 생각되었다. 본 연구의 결과가 *H. pylori* ATCC 43504 균주에 감염된 상태에서 WIRS에 노출시 위장관 병변이 증폭되는 것을 확인하는 것에 그친 점이 제한적이지만, 향후 본 연구에서 개발된 모델을 사용하여 다른 임상 분리주들의 병원성 차이를 비교하고 고병원성 균주들을 선별해 낼 수 있을 것으로 생각한다. 또한, 본 연구의 결과는 *H. pylori* 감염 환자들에서 스트레스에 노출될 경우에 위십이지장의 염증과 궤양이 발현될 수 있다는 것을 보여주는 결과라고 할 수 있다. 비록 *H. pylori* 감염 환자들에서 위장관 병변의 발현에 차이를 설명하는 것으로 균주의 병원성 차이가 가장 설득력 있게 받아들여지고 있지만 [9], 본 연구의 결과로부터 향후 스트레스

와 *H. pylori* 감염과의 연관성에 대한 연구가 보다 진행되어야 할 것으로 생각되었다.

본 연구의 결과 5주령의 Mongolian gerbil은 6시간의 WIRS에 노출되었을 경우에 성별 차이에 관계없이 매우 심한 위 및 십이지장의 변화를 보임을 알 수 있었다. 단계적으로 적용한 WIRS 노출 시간 실험을 바탕으로 4시간의 WIRS 적용 시간을 결정할 수 있었다. 또한, WIRS에 의한 *H. pylori*에 감염된 개체의 병리학적 변화를 증폭시킬 수 있는지를 알아보려고 실시한 실험의 결과, *H. pylori*에 감염된 Mongolian gerbil을 4시간의 WIRS에 적용시켰을 때, 위 및 십이지장의 UI에서 대조군의 동물들과 유의성 있는 차이를 보이는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과들을 바탕으로 Mongolian gerbil에 *H. pylori* 균주들을 감염시킨 후, WIRS의 적용으로 증폭된 변화들을 평가하여 *H. pylori* 균주들의 병원성 비교를 할 수 있는 *in vivo* 시스템으로 사용될 수 있을 것으로 판단되었다. 향후, 본 연구를 통하여 개발된 Mongolian gerbil을 이용한 수침구속 모델을 이용하여 여러 *H. pylori* 임상 분리 균주들의 병원성 차이를 비교하고, 그 결과 분류된 저병원성 균주와 고병원성 균주와의 분자생물학적 차이를 분석할 예정이다.

결 론

Mongolian gerbil을 이용하여 *H. pylori* 감염 후 WIRS 적용하는 모델이 *H. pylori*에 의한 *in vivo* 병변들을 증폭시켜줄 수 있는지를 평가하고자 실험을 수행하였다. 이를 위하여 가장 적절한 Mongolian gerbil에서의 WIRS 노출 시간을 정하기 위한 시험이 선행되었고, 그 결과 4시간의 WIRS 노출시간이 결정되었다. 개체당 1×10^9 CFU의 *H. pylori*를 감염시킨 후 1주일 만에 4시간의 WIRS를 적용하였을 때, 대조군에 비교하여 위 및 십이지장의 UI와 등급에 유의한 차이가 있음을 알 수 있었다. 이러한 결과로부터 WIRS는 *H. pylori*에 감염된 Mongolian gerbil에서 그 병원성을 효과적으로 증폭시킬 수 있음을 알 수 있었다. 본 연구를 통하여 개발된 Mongolian gerbil을 이용한 수침구속 모델은 *H. pylori* 균주들의 병원성 차이를 구분할 수 있는 *in vivo* 시스템으로 사용될 수 있을 것으로 판단되었다.

참고문헌

1. Ahn, Y. O., Park, B. J., Yoo, K. Y., Kim, N. K., Lee, J. K., Ahn, H. S., Kang, D. H., Kim, H., Lee, M. S. and Park, T. S. Incidence estimation of stomach cancer among Koreans. J. Korean Med. Sci. 1991, **6**,

- 7-14.
2. Baik, S. C., Kim, J. B., Cho, M. J., Kim, Y. C., Park, C. K., Ryou, H. H., Choi, H. J. and Rhee, K. H. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection among normal Korean adults. J. Korean Soc. Microbiol. 1990, **25**, 455-462.
3. Eaton K. A., Morgan, D. R. and Krakowks, S. Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. Infect. Immun. 1991, **59**, 2470-2475.
4. Figura, N., Guglielmetti, P., Rossolini, A., Barberi, A., Cusi, G., Musmanno, R. A., Russi, M. and Quaranta, S. Cytotoxin production by *campylobacter pylori* strains isolated from patients with chronic gastritis only. J. Clin. Microbiol. 1989, **27**, 225-226.
5. Hahm, K. B., Lee, K. M., Kim, Y. B., Han, S. U. and Kim, M. W. Animal models of *Helicobacter pylori* infection. Korean J. Gastroenterol. 2001, **37**, 399-405.
6. Hansson, L. E., Nyren, O., Hsing, A. W., Bergstrom, R., Josefsson, S., Chow, W. H., Fraumeni, J. F. and Adami, H. O. The risk of stomach cancer in patients with gastric or duodenal ulcer disease. N. Engl. J. Med. 1996, **335**, 242-249.
7. Ho, S. A., Hoyle, J. A., Lewis, F. A., Secker, A. D., Cross, D., Mapstone, N. P., Dixon, M. F., Wyatt, J. I., Tompkins, D. S., Tayler, G. R. and Quirke, P. Direct polymerase chain reaction test for detection of *Helicobacter pylori* in humans and animals. J. Clin. Microbiol. **29**, 2543-2549, 1991.
8. Honda, S., Fujioka, T., Tokieda, M., Satoh, R., Nishizono, A. and Nasu, M. Development of *Helicobacter pylori* induced-gastric carcinoma in Mongolian gerbils. Cancer. Res. 1998, **58**, 4255-4259.
9. Ito, Y., Azuma, T., Ito, S., Miyazi, H., Hirai, M., Yamazaki, Y., Sato, F., Kato, T., Kohli, Y. and Kuriyama, M. Analysis and typing of the *vacA* gene from *cagA*-positive strains of *Helicobacter pylori* isolated in Japan. J. Clin. Microbiol. 1997, **35**, 1710-1714.
10. Jung, T. S., Kang, S. C., Choi, Y. J., Jeon, B. S., Park, J. W., Jung, S. A., Song, J. Y., Choi, S. H., Park, S. G., Choe, M. Y., Lee, B. S., Byun, E. Y., Baik, S. C., Lee, W. K., Cho, M. J., Youn, H. S., Ko, G. H. and Rhee, K. H. Two-dimensional gel Electrophoresis of *Helicobacter pylori* for Proteomic Analysis. J. Korean Soc. Microbiol. 2000, **35**, 97-108.

11. **Lee, S. H., Lim, C. Y., Lee, K. H., Yeo, S. J., Kim, B. J., Kim, S. J., Cho, M. J., Rhee, K. H. and Kook, Y. H.** rpoB Gene analysis of *Helicobacter pylori*. J. Korean Soc. Microbiol. 1999, **34**, 401-408.
12. **Marshall, B. J. and Warren, J. R.** Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastric and peptic ulceration. Lancet. 1984, **1**, 1311-1315.
13. **Marshall, B. J.** The future of *Helicobacter pylori* eradication: a personal perspective. Aliment. Pharmacol. Ther. 1997, **1**(Suppl.), 109-115.
14. **Newell, D. G.** Virulence factors of *Helicobacter pylori*. Scand. J. Gastroenterol. Suppl. 1991, **187**, 31-38.
15. **Spiegelhalder, C., Gerstenecker, B., Kerstem, A., Schiltz, E. and Kist, M.** Purification of *Helicobacter pylori* superoxide dismutase and cloning and sequencing of the gene. Infect. Immun. 1993, **61**, 5315-5325.
16. **Takagi, K. and Okabe, S.** The effects of drugs on the production and recovery processes of the stress ulcer. Jpn. J. Pharmacol. 1968, **18**, 9-18.
17. **Tummuru, M. K. R., Cover, T. L. and Blaser, M. J.** Cloning and expression of a high-molecular-mass major antigen of *Helicobacter pylori*: evidence for linkage to cytotoxin production. Infect. Immun. 1993, **61**, 1799-1809.
18. **Xiang, Z., Censini, S., Bayeli, P. F., Telford, J., Figura, N., Rppuoli, R. and Covacci, A.** Analysis of expression of *cagA* and *vacA* virulence factor in 43 strains of *Helicobacter pylori* reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that *cagA* is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin. Infect. Immun. 1995, **63**, 94-98.