

# Pre-embedding Immunoelectron Microscopy를 이용한 *Helicobacter pylori*의 발견 - Immunoblotting법과 비교 -

경상대학교 의과대학 소아과학교실, 병리학교실\*, 미생물학교실†

정혜성 · 김은정 · 김은아 · 박지희 · 전진수 · 서지현 · 임재영 · 최명범  
우향옥 · 윤희상 · 고경혁\* · 백승철† · 이우곤† · 조명제† · 이광호†

## Detection of *Helicobacter pylori* by Pre-embedding Immunoelectron Microscopy - Comparison with Immunoblotting Method

Hae-Seoung Jung, M.D., Eun-Jung Kim, M.D., Eun-A Kim, M.D., Ji-Hoe Park, M.D.  
Jin-Su Jun, M.D., Ji-Hyoun Seo, M.D., Jae-Young Lim, M.D.  
Myoung-Bum Choi, M.D., Hyang-Ok Woo, M.D., Hee-Shang Youn, M.D.  
Gyung-Hyuck Ko, M.D.\*, Seung-Chul Baik, M.D.†, Woo-Kon Lee, M.D.†  
Myung-Je Cho, M.D.† and Kwang-Ho Rhee, M.D.†

Departments of Pediatrics, Pathology\* and Microbiology†,  
Gyeongsang National University College of Medicine, Jinju, Korea

**Purpose :** We tried to evaluate whether the detection rate of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens could be improved by using pre-embedding immunoelectron microscopy.

**Methods :** A total of 119 children who complained of upper gastrointestinal symptoms were endoscoped at the Gyeongsang National University Hospital from July, 1996 to July, 1999. Five biopsy specimens(three for urease test, one for hematoxylin-eosin(H & E) staining, and one for pre-embedding immunoelectron microscopy) were obtained from each antrum and body. Immunoblotting analysis were also performed.

**Results :** Among the 119 patients, *H. pylori* were found in 116 patients(97.5%) by the immunoelectron microscopy. Among three patients who were found *H. pylori* negative in immunoelectron microscopy, two patients showed *H. pylori* in H & E stained slides and one patient was urease test positive(color change within six hours). Urease tests were positive in 107 patients(89.9%). The positive rate of immunoblotting tests was 81.5%. However, only 13 patients(10.9%) showed *H. pylori* on the H & E stained antrum or body tissue.

**Conclusion :** In this study, we found *H. pylori* histopathologically in most of the pediatric patients who complained of upper gastrointestinal symptoms. This study showed that pre-embedding immunoelectron microscopic examinations can be used as a gold standard in the diagnosis of childhood *H. pylori* infection. However, this method also has limited capacity to detect widely scattered *H. pylori* compared to the other histopathologic diagnostic methods. (J Korean Pediatr Soc 2002;45:862-874)

\* 이 논문은 2000년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음(KRF-2000-041-F00198).

접수 : 2002년 2월 26일, 승인 : 2002년 5월 14일

책임저자 : 윤희상, 경상대학교병원 소아과

Tel : 055)750-8158 Fax : 055)752-9339 E-mail : hsyoun@nongae.gsnu.ac.kr

**Key Words :** *Helicobacter pylori*, Pre-embedding immunoelectron microscopy, Diagnosis, Child

**서 론**

*Helicobacter pylori*(*H. pylori*)가 위염의 원인균이며, 위십이지장 궤양, 나아가서 위암을 일으킬 수 있는 원인 균이라는 사실에 대해서는 많은 연구를 통하여 알려진 바 있다. *H. pylori* 감염 진단에 있어 최적 표준(gold standard) 조건은 위생검조직에서 세균을 증명하는 것이다. 위생검 조직에서 세균을 증명하는 방법 중 세균학적 배양을 시도하여 세균 감염증을 확인하는 것이 가장 정확한 방법이지만 배양검사 시행과정이 복잡하고 결과를 얻기까지 7일 이상 소요된다. 또한 연구자간의 방법, 숙련성 등의 차이에 따라 결과가 들쭉날쭉하며, 경험이 부족한 경우 위음성이 발생할 가능성이 있기 때문에 유능한 미생물학자의 도움을 받지 못할 경우에는 표준으로 사용할 수 없다.

위생검조직 요소분해효소(urease) 검사는 *H. pylori* 감염 진단에 비교적 쉽게 사용할 수 있고 결과 판정시 객관적인 동시에 민감도와 특이도에 있어서도 좋은 방법으로 유용하게 사용되고 있다. 윤 등<sup>1)</sup>은 5 개 이상의 위전정부 생검조직을 확보하여 -70℃에 냉동보관할 수 있었던 환자 중 위내시경 검사 당시 요소분해효소 검사 양성인 25명과 음성인 25명을 대상으로 보관하였던 생검조직을 각각 2% 요소 액체배지(urea broth)를 이용한 요소분해효소 검사를 시행하였는데 요소분해효소 검사 양성 및 음성인 총 50명 중 30명에서는 모든 검체가 일관성 있는 결과를 보여주고, 20명에서는 일관성이 없었다.

소아 환자를 대상으로 *H. pylori* 감염진단을 위해 위전정부 생검조직 1개를 이용하여 요소분해효소 검사를 시행할 경우 최대 40%에서 위음성으로 판정할 가능성이 있는 것이다. *H. pylori*는 위점막 여기 저기에 분산 분포하여 존재하며 세균의 양도 위 조직마다 다른 것으로 알려져 있다<sup>2)</sup>. 초기 감염 환자 및 항균요법 후는 이런 사항이 더 심화될 것으로 추측된다.

실제적으로 요소분해효소 검사는 위생검조직 절편에 최소 10,000마리의 *H. pylori*가 있어야 양성 반응을 보인다고 한다<sup>3)</sup>.

Hematoxylin-Eosin 염색법, Warthin-Starry 은염

색법, Giemsa 염색법, Genta 염색법, Gram 염색법 등의 전통적인 세균 염색법을 통한 조직병리학적 검사 방법 등은 요소분해효소 검사보다 예민도 및 특이도에 있어 통상 나은 점은 없다고 한다<sup>4,5)</sup>.

*H. pylori*의 DNA 또는 16S-rRNA에 대한 탐식자를 이용한 중합효소연쇄반응(PCR)은 위생검 조직에 적은 수의 세균이 있을 때 진단하는데 도움이 된다고는 하지만 위음성 및 위양성의 위험성이 높을 뿐만 아니라 검사 결과를 확인할 수도 없기 때문에 일반적인 진단법으로 사용할 수 없다<sup>6)</sup>. 즉 위생검조직을 이용하여 *H. pylori* 진단에 사용되는 현재까지 알려진 검사법으로는 초기 감염 또는 항균요법을 받은 후 위점막에 적은 수의 세균이 존재하거나 위점막내에 여기저기 산재하여 분포할 경우 *H. pylori*를 쉽게 특이적으로 발견할 수 없다.

임 등<sup>7)</sup>은 소아를 대상으로 항-*H. pylori* 다클론항체(anti-*H. pylori* polyclonal antibody)를 이용한 면역조직화학적 검사를 이용하여 조직학적으로 세균을 발견하고자 한 적이 있다. 당시 면역블롯팅(immunoblotting)법과 비슷한 양성률의 결과를 얻었지만 면역조직화학적 검사의 단점인 비특이적 염색과 세균이 염색된 것과 감별이 어려웠다.

최근 면역조직화학적 염색으로 세포의 미세구조를 검색한 후 전자현미경의 고배율 확대를 이용하여 구조를 확인하는 전포매 면역 전자현미경 검사(pre-embedding immunoelectron microscopy)가 이용되고 있다. 항-*H. pylori* 다클론항체로 위생검조직을 면역조직화학적 염색한 후 염색된 부위를 절단하여 전자현미경으로 관찰하면 염색된 세균을 형태학적으로 증명할 수 있다.

본 연구에서는 위점막조직을 이용한 *H. pylori* 검출법으로 전포매 면역 전자현미경 검사를 시행하여 이 결과를 요소분해효소 검사 및 면역블롯팅법과 비교하고자 하였다.

**대상 및 방법**

**1. 대 상**

1996년 7월부터 1999년 7월까지 경상대학교병원

소아과에 상부 위장관 증세로 내원한 환자 중 부모의 허락을 얻은 총 119명을 대상으로 하였다. 모든 검사는 다른 검사의 결과를 알지 못하는 상태에서 독립적으로 시행 및 판정하였다.

## 2. 방 법

### 1) 위내시경 검사

위 십이지장 내시경술을 시행하기 하루 전부터 금식을 시켰다. 말을 알아 들을 수 있는 아동은 검사 10분전에 xylocain을 인두에 뿌렸다. 내시경술은 Olympus XP-20 위내시경 기구를 사용해서 시행하였다. 위의 기저부, 체부, 전정부, 유문부, 십이지장을 세밀히 관찰하고 위의 전정부 및 체부에서 조직을 각각 5개씩 채취하였다. 내시경과 조직 생검용 검사는 사용 후 매번 glutaraldehyde로 소독한 후 흐르는 수돗물을 이용하여 세척한 뒤 다음 환자에게 사용하였다. 위 전정부 및 체부 각각의 생검 조직 중 3개는 요소분해효소 검사를 시행하고, 1개는 포르말린 고정하였다. 또 다른 1개는 Optimal Cutting Temperature (O.C.T.) 화합물(Diagnostic division, Elkhart, IN 46515, USA)에 넣은 후 70°C에 냉동 보관하였다가 면역 조직학적 검사 및 면역 전자현미경 검사용으로 사용하였다.

### 2) 요소분해효소 검사

에펜돌프 튜브 안에 들어 있는 0.2 mL 2% 완충 요소 액체배지(2% urea broth; urea 20 g/L, phenol red 0.04 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2 g/L, NaCl 0.5 g/L; pH 6.8)에 전정부 및 체부에서 얻은 각각 3개의 위생검조직을 동시에 넣은 후 38°C에서 시간별로 붉은색으로의 양성 변화를 관찰하였다. 시간은 1시간 이내, 1-6시간 사이, 7-12시간 사이, 13-24시간 사이, 25-36시간 사이, 37-48시간 사이로 구분하여 관찰하였고, 48시간까지 변화가 없는 경우를 음성으로 판정하였다. 전정부와 체부를 각각 관찰하였고 한군데서라도 양성판정이 나오면 요소분해효소 검사 양성으로 판정하였다.

### 3) 위생검조직검사

위의 전정부 및 체부에서 채취한 조직 생검체를 10% 중성 포르말린과 80% 알코올 용액에 4°C에서 밤새 고정시킨 후 파라핀에 포매하여 4-5 μm 두께의 연속 절편을 만든 후 hematoxylin-eosin(H & E) 염색을 시행하여 광학 현미경으로 검경, 염증의 정도와 *H. pylori* 존재 유무를 관찰하였다. 광학현미경으로

검경하여 *H. pylori*가 한 개라도 관찰되면 양성으로 판독하였고, 조직표본의 판독은 Updated Sydney System에 준하여 하였다<sup>8)</sup>.

## 4) 면역블롯팅

### (1) *H. pylori* 항원제조

경상대학교병원 환자에서 분리한 *H. pylori* 51균주를 항원으로 사용하였다<sup>9)</sup>. 우혈청을 10% 농도가 되도록 첨가한 Mueller-Hinton 한천 배지에서 *H. pylori* 분리주를 CO<sub>2</sub>가 5-10%, 100% 습도, 그리고 38°C에서 48시간 배양한 다음 균체를 얻었다. 이를 인산 완충액(pH 7.4, 0.1 M)으로 1회 원심세척한 다음 동일 완충액으로 재부유하였다. Phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF)를 5 mM 농도로 첨가하고 초음파 파쇄기(Ultrasonics W-380)를 사용하여 20-60초 간격으로 수회 균체를 파쇄하였다. 이 세포파쇄액을 냉동보관하면서 항원으로 사용하였다. 세포파쇄항원의 단백질 농도는 Lowry법<sup>10)</sup>으로 측정하여 20 g/mL이 되도록 조정하여 사용하였다.

### (2) SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동

면역블롯팅을 실시하기 위한 SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동을 Laemmli 방법<sup>11)</sup>으로 실시하였다. 10-20% SDS-폴리아크릴아미드 경사 분리 겔(gradient separating gel)인 0.75 mm 두께의 평면 겔(slab gel)에 세포파쇄항원 35 μL를 분주한 후 Mighty Small II(Hoefer Scientific Instruments, San Fernando, CA)에서 15 mA에서 60분간 전기영동 하였다. 표지 단백질로는 Mark 12 Wide Range Protein Standard(NOVEX system, San Diego, CA, USA)를 사용하였다.

### (3) 면역블롯팅

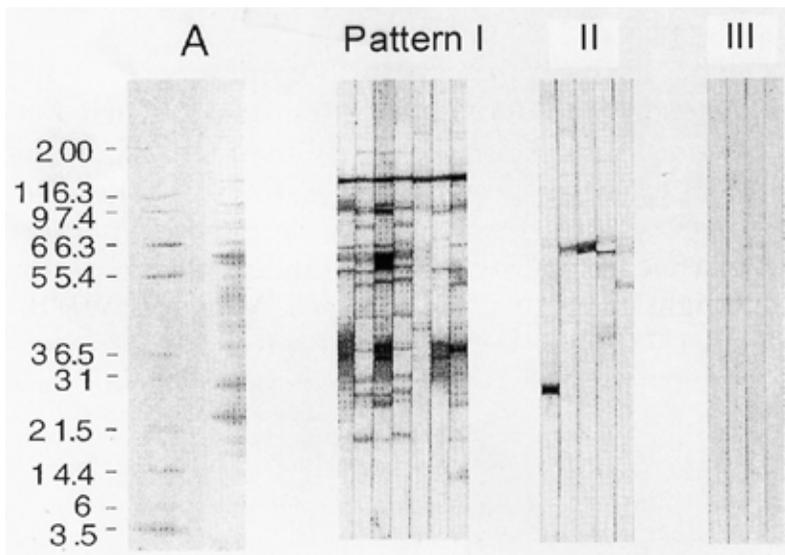
전기영동이 끝난 폴리아크릴아미드 겔을 전달 완충액(20 mM Tris, 144 mM glycine, 25% methanol, 0.01% sodium dodecyl sulfate)에 넣어 분획된 단백을 고정하였다. 전기영동 후 단백을 전기 전달(electro-transfer)할 nitrocellulose(NC) membrane(0.2 micron, Bio-Rad Laboratories) 역시 동일 용액에 30분간 담구었다. 폴리아크릴아미드 겔과 NC membrane을 음극으로부터 그리드(grid), 스펀지, 3MM 여과지, NC membrane, 겔, 3MM 여과지, 스펀지, 그리드 순으로 조립하여 Mighty Small Transphor(Hoefer Scientific Instruments)를 이용하여 120 mA로 60분간 4°C 내외의 전달 완충액(20 mM Tris,

0.01% SDS, 144 mM glycine pH 8.3, 25% methanol)에서 전기 전달시켰다. 이 NC membrane을 TBS-Tween 20 완충액(TBST; TBS; 50 mM Tris-HCL, 150 mM NaCl pH 8.0, 0.05% Tween)으로 세척하고 1% bovine serum albumin(BSA)-TBST 용액으로 NC membrane의 나머지 단백 결합 부위를 차단시켰다. 이것을 3 mm 간격으로 strip을 만들어 1:5로 희석시킨 혈청과 37°C에서 30분간 반응시켰다. TBST 완충액으로 3분 간격으로 3회 세척하고 IgM인 경우 알칼리성 포스파타제가 결합된 가토 항-인체(alkaline phosphatase conjugated rabbit anti-human) IgM(mu chain specific, DAKO A/S, Denmark) 항체를 1:500으로 희석하여 첨가하고, IgA인 경우 알칼리성 포스파타제가 결합된 가토 항-인체 IgA(alpha chain specific, DAKO A/S, Denmark) 항체를 1:500으로 희석하여 첨가하고, IgG인 경우 알칼리성 포스파타제가 결합된 가토 항-인체 IgG(gamma chain specific, DAKO A/S, Denmark) 항체를 1:1,000으로 희석하여 첨가하여 37°C에서 30분간 처리하였다. TBST 완충액으로 3분간 5회 세척한 다음 기질용액을 넣어 실온에서 15분간 효소반응

을 진행시켰다. 기질용액은 알칼리성 포스파타제 완충액(100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM MgSO<sub>4</sub> pH 9.5)에 0.03% nitroblue tetrazolium 기질(Sigma, St. Louise, MO, USA)과 0.015% 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate(BCIP) 기질(Sigma, St. Louise, MO, USA)을 첨가하여 제조하였다. 효소반응은 반응 중지용 완충액(20 mM tris-HCl, 50 mM EDTA, pH 8.0)으로 중지시켰다.

**(4) 면역블롯(immunoblot) 반응형의 분류**

면역블롯 반응형태가 120 kDa의 항원에만 반응하거나 또는 120 kDa의 항원을 포함하여 그 외의 다수 항원에 반응하는 경우는 제 I형으로, 일부 항원에는 반응하고 있으나 120 kDa 항원 분획과는 반응하지 않는 경우는 제 II형으로, 그리고 전 항원에 전혀 반응하지 않는 경우는 제 III형으로 구분하였다. 면역블롯 반응형태가 제 I형인 경우만 혈청학적 양성으로 판정하였고, 제 II형이나 제 III형은 혈청학적 음성으로 판단하였다<sup>12)</sup>. IgG, IgA와 IgM 각각에 대한 면역블롯 반응형태를 관찰한 후 3가지 중 한 가지 이상의 항체에 반응을 보인 경우를 면역블롯 양성으로 판정하였다(Fig. 1).



**Fig. 1.** Classification of immunoblotting results. Only pattern I which shows reactivities against 120 kDa antigen as well as other antigens of *H. pylori* was considered *H. pylori* infection positive in this study. Any immunoblots showing positive bands other the 120 kDa antigen was classified as pattern II. Nonreacting immunoblots were classified as pattern III. Panel A shows a ponceau S-stained nitrocellulose membrane onto which marker proteins and separated *H. pylori* antigens were transferred.

**5) 전포매 면역 전자현미경 검사**

**(1) 조직 처리**

OCT 화합물에 넣어서 냉동보관 되어 있던 위 전정부와 체부의 생검 조직절편을 신속히 녹여 PLP (paraformaldehyde, DI-lysine, sodium-m-periodate) 용액 4℃에서 2시간 동안 고정하였다. 이후 10% 자당 용액에 넣어 4℃에서 15시간 이상 고정한 후 이 조직을 다시 O.C.T. 화합물에 포매하여 동결시킨 후 -20℃ 초냉동 박절기에서 30 μm 두께로 연속 냉동절편을 제작하였다. 냉동절편은 poly-L-lysine이 코팅된 슬라이드에 올려놓았다.

**(2) 면역조직화학적 염색**

냉동절편을 95% 에탄올에 10분간 고정하고 실온에서 30분 이상 건조시킨 후 0.05 M Tris 완충액에 5분간 세척하였다. 이후 3% 과산화수소에 실온에서 10분 동안 처리하였다. 조직절편을 1차 증류수로 1분 동안 세척하고, 0.05 M Tris 완충액에 5분 동안 세척하였다. 그 후 조직절편을 5% 돼지 혈청(Swine serum (normal) X0901. DAKO)이 첨가된 Tris 완충액에 실온에서 1시간 동안 처리한 후 세척하지 않고, 이어서 1:10으로 희석시킨 1차 항체인 가토 항-*H. pylori* 다클론항체에 4℃에서 15시간 이상 반응시켰다. 0.05 M Tris 완충액에 15회 이상 진탕기로 세척한 후 5% 돼지 혈청이 첨가된 Tris 완충액에 실온에서 10분 동안 처리하였다. 0.05 M Tris 완충액에 1초 동안 세척한 후 다시 5% 돼지 혈청이 첨가된 Tris 완충액에 10분간 처리하였다. 세척하지 않고 1:50으로 희석된 2차 항체(biotinylated swine anti-rabbit IgG in Tris buffer, Code No.E0431. DAKO)에 실온에서 1시간 처리하였다. 다시 0.05 M Tris buffer에 15회 이상 진탕 세척한 후 과산화효소가 표지된 Streptavidin(LSAB 2kit, peroxidase conjugated, Code No. K1016. DAKO)에 반응시켰다. 0.05 M Tris 완충액에 세척한 후 기질액(6 mg of 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride(Lot77H1559. SIGMA) in 250 mL of 0.05 M Tris buffer, pH 7.6, 100 μL of 35% hydrogen peroxide) 내에서 3분간 발색 시켰다. 그 후 조직절편을 0.05 M Tris 완충액에 5회 진탕 세척하였다.

**(3) 면역 전자현미경적 염색**

면역전자현미경적 염색표본의 제작은 전포매법을 적용하였다. 면역조직화학적 염색법으로 처리하여 상

피세포의 위쪽으로 염색이 양호하게 되었다고 판단된 절편 쪽을 1% osmium tetroxide에 1시간 동안 후고정 하였다. 이 조직을 에탄올을 이용하여 탈수시켰다. 이렇게 탈수시킨 조직을 에폭시수지(Epon 812 substitute Lot921118)에 60℃에서 2일간 중합반응시켜 포매하였다. 포매된 절편을 Ultracut-E(Reichert-Jung Germany)를 사용하여 70 nm 두께의 초박절편(ultrathin section)을 제작하여, 다시 uranyl acetate로 20분간, lead citrate로 10분간 염색한 후 투과 전자현미경(Hitachi, H-600, Japan)으로 75 KV에서 관찰하였다(Fig. 2).

**결 과**

**1. 대상 환자**

**1) 연령 및 성별 분포**

대상 환자들의 평균 연령은 7.4세였고, 연령 분포는 2세부터 15세였다. 남아가 57명(48%), 여아가 62명(52%)이었다(Table 1).

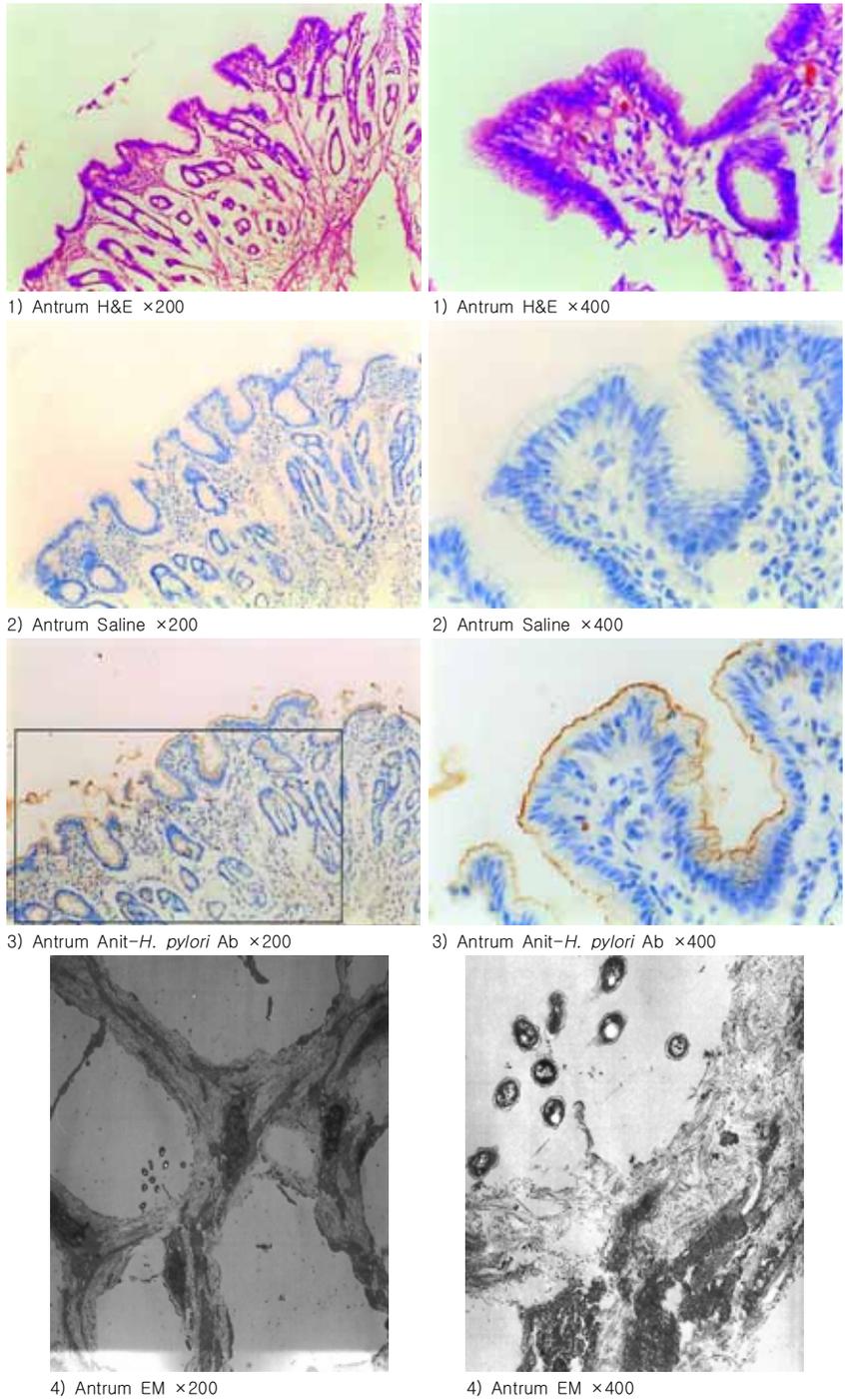
**2) 주증상**

내시경을 시행하게 된 주증상은 만성 반복성 복통 84명(70.6%), Henoch-Schönlein 자반증 11명, 잦은 구역 및 구토 10명, 상복부 통증 7명, 상부위장관 출혈 2명, 흉통 2명이었고 원인 불명의 빈혈, 누렇게 뜬 얼굴, 잦은 오심, 밤시간의 보챔이 각각 1명이었다(Table 2).

**2. 진단방법의 결과**

**1) 면역 전자현미경 검사**

위 전정부와 위 체부에서 생검한 조직을 각각 관찰하였고, 세균이 덩어리로 군데군데 모여 있는 경우(덩어리형; lumpy pattern), 서로 어우러져 줄을 이루고 있는 경우(선형; linear pattern), 분산되어 있는 경우(분산형; scattered pattern)로 구분하여 판정하였다(Fig. 3). 위 전정부에서는 덩어리형 28례, 선형 1례, 분산형 82례로 총 111례(93.3%)에서 *H. pylori*가 관찰되었고 위 체부에서는 덩어리형 16례, 선형 2례, 분산형 87례로 총 105례(88.2%)에서 *H. pylori*가 관찰되었다. 위 체부에서 보다 위 전정부에서 세균이 더 많이 관찰되긴 하였지만 유의한 차이는 없었다. 총 116례(97.5%)의 위 전정부 또는 위 체부에서 세균이 관찰되었다. 면역 전자현미경 검사상 세균이 관찰된



**Fig. 2.** Processing of immunohistochemistry and pre-embedding electron microscopy. (1) H&E stained low and high power field slides showed mild degree of chronic gastritis without visible *H. pylori* on epithelial mucous layer. (2) Immunohistochemistry done with saline as a primary antibody instead of rabbit anti-*H. pylori* polyclonal antibody showed no epithelial stain. (3) Immunohistochemistry done with rabbit anti-*H. pylori* polyclonal antibody and diaminobenzidine tetrahydrochloride(DAB) as a chromogen showed brown colored epithelial stain. Rectangle area is cut with a diamond knife for the electron microscopic examinations. (4) Electron microscopic view of immunohistochemically stained area showed many *H. pylori*.

**Table 1.** Age and Sex Distribution of Patients

Age(yr)	Number of patients		
	Male	Female	Total
2-4	21	12	33
5-9	22	34	56
10-15	14	16	30
Total	57	62	119

형과 다른 검사 결과는 서로 상관관계가 없었으며 선형이 제일 적었다. 위 전정부나 위 체부 면역 전자현미경 검사에서 세균이 관찰되지 않은 3명 중 2명은 H & E 염색검사에서도 세균이 관찰되었고 3명 모두 요소분해효소 검사상 6시간내 양성반응 및 면역블롯팅 검사상 IgG에서 I형을 나타내었다.

**2) 요소분해효소 검사**

위 전정부에서는 총 73례(61.3%), 위 체부에서는 총 102례(85.7%)가 양성이어서 위 전정부에서 보다 위 체부에서 양성률이 더 높았다. 총 107례(89.9%)에서 위 전정부 또는 위 체부에서 양성반응을 보였다. 요소분해효소 검사의 시간대별 양성 수는 Table 3에 기술되어 있다.

**3) 병리조직학적 검사**

**(1) Hematoxylin and Eosin 염색**

H & E 염색으로 위의 상피세포상에 존재하는 *H. pylori*를 관찰한 결과 위 전정부 9례(7.6%), 위 체부 12례(10.1%)에서 균이 발견되었고, 위 전정부 또는 위 체부에서 균이 관찰된 경우는 총 13례(10.9%)였다. H & E 염색에서 세균이 관찰된 13례 모두 요소분해효소 검사 양성이었으며 대부분 1시간 이내에 색깔이 변한 빠른 양성 반응을 보였다. 그러나 위 전정부 9례 중 1례, 위 체부 12례 중 3례에서는 광학현미경상 세균이 관찰되었으나 면역 전자현미경 검사에서는 관찰할 수 없었다. 총 13례 중 2례에서는 위 전정부 또는 위 체부 모두에서 면역 전자현미경 검사에서 세균을 관찰할 수 없었다(Table 4).

**(2) 병리학적 소견**

Updated Sydney System의 분류 방법에 따라 위 전정부와 위 체부에서 염증의 정도를 관찰한 결과 활동성 위염은 위 전정부에서 8례(6.7%), 위 체부에서 13례(10.9%)였고, 만성 위염은 위 전정부에서 100례(84.0%), 위 체부에서 97례(81.5%)였다. 중등도 이상의 만성위염은 위 전정부에서 14례(11.8%), 위 체부

**Table 2.** Chief Complaints of Patients

Chief complaints	Number of patients
Recurrent abdominal pain	84
Henoch-Schönlein purpura	11
Frequent nausea and/or vomiting	10
Epigastric pain	7
UGI bleeding	2
Chest pain	2
Anemia of unknown origin	1
Sallow face	1
Anorexia	1
Night irritability	1

에서 14례(11.8%)였고, 중증 이상의 만성위염은 위 전정부에서 3례(2.5%), 위 체부에서 2례(1.7%)였으며 중등도 이상의 활동성 위염은 위 전정부와 위 체부에서 각각 1례(0.8%)씩 관찰되었다. 위 전정부나 위 체부에서 염증 소견이 관찰된 경우는 총 115례(96.6%)였다.

**4) 면역블롯팅**

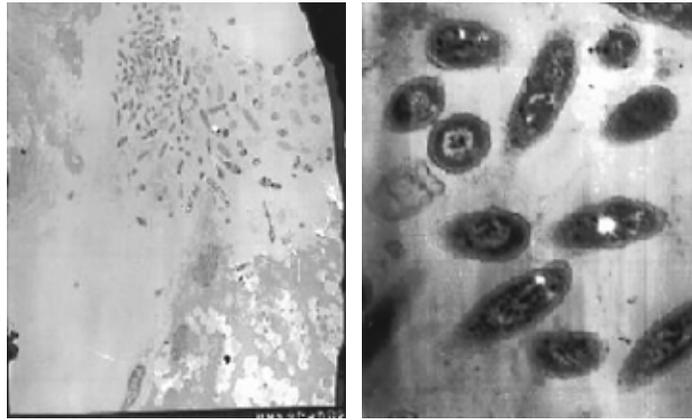
면역블롯팅 제 I형은 IgG 항체 95례(79.8%), IgA 항체 53례(44.5%), IgM 항체 20례(16.8%)에서 관찰되었다. IgG, IgA, IgM 중 한가지 이상의 항체반응을 보인 경우를 면역블롯팅 양성으로 판정하였고 총 97례(81.5%)였다.

**3. 각 진단 방법의 생검 위치 및 연령에 따른 결과 비교**

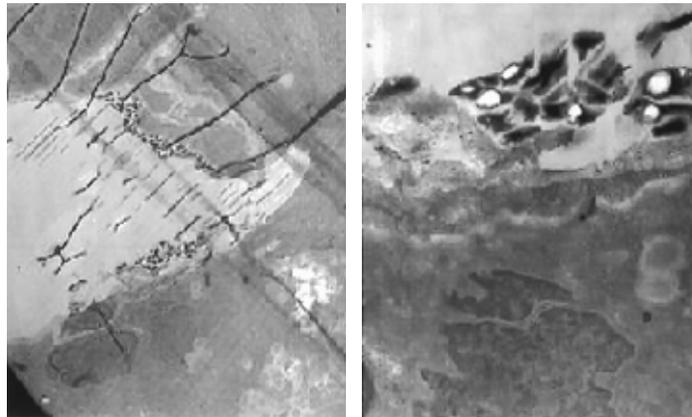
각 검사결과를 생검 위치에 따라 비교하면 면역 전자현미경 검사법에서는 전정부에서, 요소분해효소 검사 및 H & E 염색 검사에서는 체부에서 양성률이 높았다. 면역 전자현미경 검사와 요소분해효소 검사의 체부 양성률은 비슷하였지만 전정부 양성률은 면역 전자현미경 검사가 요소분해효소 검사보다 높았다 (Table 5). 각 검사결과를 2-4세(33명), 5-9세(56명), 10-15세(30명)의 연령별로 구별시 각 연령군에 따른 차이는 없었고, 전반적으로 면역 전자현미경 검사, 요소분해효소 검사 및 면역블롯팅은 비교적 높은 양성률을 보이고 H & E 염색 검사는 매우 낮은 양성률을 보였다(Table 6).

**고 찰**

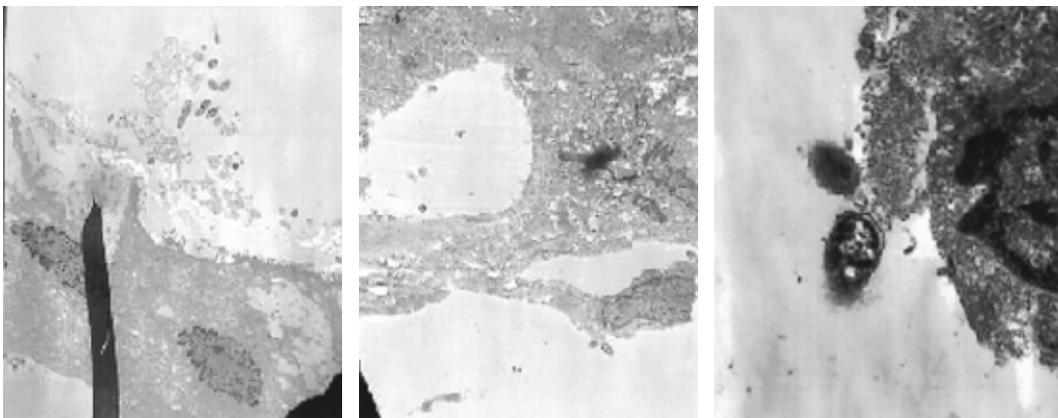
*H. pylori*가 1982년 인체 위점막으로부터 순배양된



1) Lumpy pattern, antrum EM ×3,000      1) Lumpy pattern, antrum EM ×30,000



2) Linear pattern, antrum EM ×3,000      2) Linear pattern, antrum EM ×12,000



3) Scattered pattern, antrum EM ×3,000      3) Scattered pattern, antrum EM ×5,000      3) Scattered pattern, antrum EM ×30,000

**Fig. 3.** Distribution patterns of *H. pylori* in gastric mucosa observed by the electron microscopy. (1) lumpy patterns, (2) linear patterns, (3) scattered patterns.

이래<sup>13-15)</sup>이 세균은 급성 위염 및 B형 만성 위염의 원인으로 확립되었고<sup>16, 17)</sup>, 위궤양, 십이지장궤양의 발

생에 중요 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>18-20)</sup>. 또한 1994년 WHO는 당시까지 발표된 전 세계의 자료<sup>21-24)</sup>

를 조사하여 이 세균이 위암의 명확한 발암원(group I carcinogen)이라 분류 정의하였다<sup>25)</sup>.

**Table 3.** Numbers of Patients according to Time Interval of Positive Urease Tests from Antrum and Body

Time interval(hr)	Antrum	Body
≤1	13	19
2-6	5	6
7-12	7	11
13-24	22	39
25-36	10	15
37-48	16	12
Total	73	102

**Table 4.** Urease Test Positive Patterns and Immunoelectron Microscopic Positivity in 13 Patients Who Showed *H. pylori* on Hematoxylin-Eosin Stained Slides from Antrum or Body

	Antrum(%)	Body(%)
Urease test positivity	9(100.0)	12(100.0)
Positive time interval(hr)		
≤1	7 ( 77.8)	11( 91.7)
2-6	1( 11.1)	0
7-12	0	1( 8.3)
13-24	0	0
25-36	1( 11.1)	0
37-48	0	0
Immuno-EM positivity	8( 88.9)	9( 75.0)
<i>H. pylori</i> positivity on H & E staining	9(100.0)	12(100.0)

**Table 5.** Positivity of Each Diagnostic Test according to Biopsy Site

	Antrum(%)	Body(%)	Total(%)
Immunoelectron microscopy	111( 93.3)	105( 88.2)	116( 97.5)
Urease test	73( 61.3)	102( 85.7)	107( 89.9)
Histology	9( 7.6)	12( 10.1)	13( 10.9)
Immunoblotting	—	—	97( 81.5)
Total number of specimen	119(100.0)	119(100.0)	119(100.0)

**Table 6.** Positivity of Each Diagnostic Test according to Age Groups

	2-4 yr(%)	5-9 yr(%)	10-15 yr(%)
Immunoelectron microscopy	31( 93.9)	56(100.0)	29( 96.7)
Urease test	29( 87.8)	52( 92.9)	26( 86.7)
H & E staining	4( 12.1)	4( 7.1)	5( 16.7)
Immunoblotting	24( 72.7)	48( 85.7)	25( 83.3)
Total number of patients	33(100.0)	56(100.0)	30(100.0)

1998년 몽골리안 저빌에 *H. pylori*를 감염시켜 18개월 후 40%에서 위암이 유발됨이 보고된 바 있다<sup>26)</sup>. 또한 선진국 및 개발도상국의 영유아의 만성설사 및 영양실조가 *H. pylori* 감염에 의할 수 있다는 것<sup>27, 28)</sup>이 보고되었으며 Weaver<sup>29)</sup>는 개발도상국에서 *H. pylori* 감염의 대부분은 출생 직후 일어나며 모유수유를 시키면 감염의 시기가 늦어질 수도 있다고 하였으며, 감염된 영아는 이 세균에 의해 유발되는 위장내 저산증, 그로 인한 장내 감염에 잦은 노출로 반복성 설사에 시달리다 만성적인 영양실조와 성장장애가 동반될 수 있다고 하였다. Patel 등<sup>30)</sup>은 사춘기 전의 소아를 코호트(cohort)로 한 연구에서 *H. pylori*에 감염된 7세 여아가 11세가 되었을 때 감염 안된 경우보다 키가 평균 1.1 cm가 작았다고 보고하였다.

개발도상국은 물론 선진국에서도 대부분의 *H. pylori* 감염은 소아기에 발생하고<sup>31, 32)</sup>, 소아기에 감염된 *H. pylori*는 특이 항균요법을 하지 않는 한 자연치유의 기회가 아주 적고, 성인에서는 새로운 감염 기회가 적기 때문에 현재 세계 각 국의 연령별 *H. pylori* 감염 양상은 소아기에 결정된 감염률이 모든 연령에 걸쳐 유지되는 현상을 반영하는 것으로 알려져 있다<sup>33, 34)</sup>.

*H. pylori*의 감염시기는 15세 이전의 소아 연령기에 결정되고 성인에서의 새로운 감염 기회는 매우 적다고 한다. 따라서 한국인의 위장질환인 만성 B형위염, 위십이지장 궤양, 위암 등을 해결하기 위해서는 소아 연령에서 *H. pylori*의 정확한 진단법이 개발되어야 소아를 대상으로 한 치료 및 예방대책을 세울

수 있을 것이다.

1990년 Vaira 등<sup>35)</sup>은 소화장애를 호소하는 성인 환자를 대상으로 내시경 검사를 시행하여 위 점막이 정상으로 관찰되는 많은 경우에서도 조직검사상 위염이 있다는 것을 보고하면서 내시경 검사시 생검을 하지 않으면 활동성 위염을 찾아내지 못하고, *H. pylori* 감염을 알지 못하며, 소화장애를 호소하는 환자의 반수 정도를 내시경 검사상 정상으로 판정하여 정신과로 보내는 잘못을 범하고 있다고 강조하였다. 실제로 반복적인 만성 복통이나 잦은 구도와 구역, 소화장애, 상복부 불쾌감 등의 상부 위장관 증상을 호소하는 많은 수의 소아 환자들에게 일상적인 기본검사(예, 일반 혈액검사와 혈청검사, 소변 및 대변 검사, 복부방사선 검사 등)를 시행하여 염증성 장질환 등의 기질적 이상을 배제한 후 통증은 확실히 있고 피병은 아니지만 스트레스나 성장과정 중의 한 부분인 것으로 설명하고 사회정서적인 치료를 권유하는 현실을 고려할 때 소아에서의 상부 위장관 증상에 대한 원인과 치료방법에 있어 전면적인 재고가 필요하다고 생각된다.

본 연구 대상자 중 Henoch-Schönlein 자반증 환자 11명은 심한 복통이 동반되어 위내시경을 시행하였는데, 검사상 위 점막 발적이 관찰되어 요소분해효소 검사 및 병리조직학적 검사를 시행하였다. 이들 모두 전정부 또는 체부의 요소분해효소 검사 양성 및 면역 전자현미경 검사 양성으로 판명되었다. Henoch-Schönlein 자반증 환자에서 *H. pylori*가 우연히 발견된 것이지 어떤 인과관계가 있는지를 확인하기 위해서는 더 많은 환자를 대상으로 한 전향적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

면역 전자현미경 검사시 O.C.T. 화합물에 넣어져 냉동 보관되었던 조직을 녹여 PLP 용액에 고정 후 다시 O.C.T. 화합물에 넣어 냉동절편을 만들었기 때문에 광학현미경상 관찰되는 조직의 형태가 깨끗하지 않았으나 이 연구의 목적인 세균을 발견하는 데는 문제가 되지 않았다. 요소분해효소 검사는 체부에서 훨씬 높은 양성률을 보이거나 조직을 이용한 형태학적 관찰인 면역 전자현미경 검사에서는 위 전정부에서 체부에서보다 양성률이 높았다. *H. pylori*가 살고있는 보급자리(niche)에 따라 기능이 다를 수 있다는 것을 시사한다.

*H. pylori*가 생산하는 효소인 요소분해효소는 세균의 집락화 및 발병기전에 관여할 것으로 알려져 있는

데, 요소분해효소 검사는 위생검 조직에서 요소분해효소 존재를 확인함으로써 세균감염을 진단하는 방법이다. 이 검사법은 *H. pylori*가 위점막에 산발적으로 분산 분포하는 문제점을 극복해야 하며 균 수가 적어도 10<sup>4</sup>마리 이상이 있어야 양성반응을 보인다는 한계가 있어 특히 소아에서는 위음성 판정이 많으므로 *H. pylori* 감염의 검사방법으로 부적절하다고 알려져 있다<sup>36)</sup>. 본 연구에서는 이러한 문제들을 고려, 민감도를 높이기 위해 통상적인 요소분해효소 검사와는 다르게 위 전정부와 체부에서 동시에 생검을 시행한 후 각각 3개의 위생검 점막 절편을 1개의 요소분해효소 키트에 넣어 48시간까지 결과를 관찰하였다.

윤 등<sup>37)</sup>은 소아에서 3개의 위생검 조직절편을 사용할 경우 위에서 기술한 요소분해효소 검사의 위음성을 극복할 수 있는지를 평가하였다. 1개의 조직절편을 이용했을 경우 89명 중 44명(49%), 3개의 조직절편을 이용한 경우 89명 중 66명(74%)에서 요소분해효소 검사 양성 결과를 얻을 수 있었다. 이 당시 89명 중 72명(82%)에서 면역블롯팅 검사에서 혈청학적 양성이어서 3개의 조직절편을 이용한 요소분해효소 검사는 1개의 조직절편을 이용할 때보다는 위음성을 줄일 수 있었지만 혈청학적 양성률에는 미치지 못했다.

본 연구에서는 비교적 객관적으로 쉽게 진단에 사용할 수 있는 요소분해효소 검사가 면역블롯팅 검사법보다 양성률이 높게 나타났는데 이는 위 전정부 및 위 체부 2군데 모두에서 요소분해효소 검사를 시행한 검사 방법상의 보완 때문인 것으로 사료된다. 통상 요소분해효소 검사는 24시간까지 색깔변화가 있는 것만 요소분해효소 검사 양성으로 판정하였으나 본 연구 결과에 의하면 25-48시간에 색깔변화가 있는 것도 예민도 및 특이도가 100%에 가깝다. 따라서 24시간 이후에 색깔변화가 있는 경우 현재 지침대로 위양성으로 판정하는 것은 재고해 보아야 할 것이다.

전자현미경 검사상 세균이 덩어리로 관찰되는 덩어리 형(lumpy pattern)이 요소분해효소검사가 빨리 변하거나 H & E 조직염색 검사에서 세균이 관찰될 것이라고 예견되었으나 그렇지 않았다. 흥미로운 사항으로 좀더 연구해 볼 가치가 있다.

위생검조직을 H & E 염색하여 광학현미경으로 염증 정도 및 세균을 직접 관찰하는 방법은 다른 검사법에 비해 세균 검출률이 낮았다. 이 방법은 위 점막 상에 산발적 분산으로 분포하는 세균의 특성 이외에

도 균의 크기가 너무 작고 염색시의 오염물질과 감별하기 어려우며 균 자체의 염색이 안되었거나 준비과정에서 절단된 균의 단면만 보이는 경우 등과 검사자의 숙련성 차이를 고려하면 민감도가 낮고, 보고자에 따라 세균 검출률이 다양할 수밖에 없다<sup>38)</sup>.

위생검 조직으로부터 세균을 배양하는 것 또한 생검 조직의 부위나 양에 따른 오차와 까다로운 배양조건, 복잡한 시행과정 및 오랜 시간이 필요한 점 등의 문제를 가지고 있어 본 연구에서는 시행하지 않았다.

H & E 조직염색 검사상 전정부 또는 체부에서 균이 관찰된 대부분의 경우 요소분해효소 검사에서 1시간 이내 양성으로 나타났다. 병리조직학적 검사상 세균이 관찰되면 환자의 위점막에 세균이 많다는 것을 시사한다<sup>39)</sup>. 반면 H & E 조직염색 검사상 전정부에서 균이 관찰된 9례 중 1례는 요소분해효소 검사 양성(1시간 이내) 및 면역블롯팅 양성, 체부에서 균이 관찰된 12례 중 3례는 요소분해효소 검사 양성(1시간 이내 2례, 7-12시간 1례) 및 면역블롯팅 양성이었지만 면역 전자현미경 검사에서는 세균이 관찰되지 않았다. 이런 검사 방법 간의 불일치는 현재 표준으로 사용되는 *H. pylori* 감염 진단법의 한계를 보여주는 결과이다.

*H. pylori* 진단법에 있어서 조직검사나 배양검사에 의한 제한 및 문제점들은 본 연구에서 시행한 면역 전자현미경 검사법을 이용하면 많은 부분을 극복할 수 있으리라 판단되지만 본 연구에서 위 전정부나 위 체부 면역 전자현미경 검사에서 세균이 관찰되지 않은 3명 중 2명은 H & E 염색검사서 세균이 관찰되었고 3명 모두 요소분해효소 검사상 6시간내 양성 반응 및 면역블롯팅 검사 양성을 나타내었다. 본 연구에서 전포매 면역 전자현미경 검사가 *H. pylori* 진단법의 최적 표준으로 사용될 수도 있는 결과를 보여주었지만, 이 검사 역시 민감도가 100%는 아니며, 극소량의 조직절편을 이용, 고배율로 확대하여 굉장히 넓은 시야 전체에서 균 관찰을 해야 하는 문제점과 더불어 세균이 위점막 전체에 고르게 분포하지 않는 특성 때문에 기본적으로 조직검사를 통한 검사 방법이 가지는 한계를 가지고 있다.

본 연구 대상자 119명 중 116명은 면역 전자현미경 검사에서 세균이 확인되었고, 나머지 3명 모두는 요소분해효소 검사에서 모두 6시간 내 양성 반응이었고 이중 2명은 H & E 염색에서도 세균이 관찰되어

119명 모두에서 *H. pylori*를 증명할 수 있었다. 이는 소아에서 상부 위장관 증상으로 위내시경 검사를 받는 환자의 대부분이 *H. pylori*에 감염되어 있다는 것을 시사하며, 소아에서 다양한 목적으로 흔히 사용되는 *H. pylori* 감염 진단법의 타당성을 의심하게 하는 결과이다. 하지만 이번 연구는 상부위장관 증상을 호소하는 환자만을 대상으로 하여 시행하였으므로 아무런 증상이 없는 건강한 자원을 포함시키지 못한 문제점은 지적 받을 수 있을 것으로 생각된다.

## 요 약

**목적 :** *H. pylori* 감염 진단에 있어 최적 표준 조건은 위생검 조직에서 세균을 증명하는 것이다. 위생검 조직을 이용한 현재의 검사법으로는 초기 감염 또는 항균요법을 받은 후 위점막에 적은 수의 세균이 존재하거나 여기저기 산재하여 분포할 경우 *H. pylori*를 쉽게 발견할 수 없다. 본 연구에서는 위점막 조직을 이용한 *H. pylori* 검출법으로 전포매 면역 전자현미경 검사법을 시행하여 이 검사를 요소분해효소 검사 및 면역블롯팅법과 비교하고자 하였다.

**방법 :** 1996년 7월부터 1999년 7월까지 상부 위장관 증세를 주소로 경상대학교병원 소아과를 찾은 2-15세 사이의 환자 119명을 대상으로 위내시경을 시행하여 위생검 조직검사, 요소분해효소 검사, 전포매 면역 전자현미경 검사, 면역블롯팅 검사를 시행하였다.

### 결 과 :

1) 전포매 면역 전자현미경 검사상 위 전정부에서는 111례(93.3%), 위 체부에서는 105례(88.2%)에서 *H. pylori*가 관찰 되었다. 대상 환자 119명 중 116명(97.5%)의 위 전정부 또는 위 체부에서 *H. pylori*가 검출되었다.

2) 위 전정부나 위 체부에서 세균이 관찰되지 않은 3명 중 2명은 H & E 염색검사서 세균이 관찰되었고 3명 모두 요소분해효소 검사상 6시간내 양성 반응 및 면역블롯팅 검사상 양성반응을 보였다.

3) 요소분해효소 검사는 위 전정부에서 73례(61.3%), 위 체부에서 102례(85.7%)가 양성이었고, 총 107례(89.9%)에서 위 전정부 또는 위 체부에서 양성반응을 보였다.

4) H & E 염색 검사상 위 전정부 9례(7.6%), 위 체부 12례(10.1%)에서 균이 발견되었고, 위 전정부

또는 위 체부에서 균이 관찰된 경우는 총 13례(10.9%)였다. H & E 염색에서 세균이 관찰된 13례 모두 요소분해효소 검사 양성이었으며 대부분 1시간 이내에 색깔이 변한 빠른 양성 반응을 보였다. 그러나 위 전정부 9례 중 1례, 위 체부 12례 중 3례에서는 광학 현미경상 세균이 관찰되었으나 면역 전자현미경 검사에서는 관찰할 수 없었다. 총 13례 중 2례에서는 위 전정부 또는 위 체부 모두에서 면역 전자현미경 검사에서 세균을 관찰할 수 없었다.

5) 면역블롯팅 검사상 총 97명(81.5%)에서 양성반응이 관찰되었다.

**결론** : 전포매 면역 전자현미경 검사가 소아 *H. pylori* 진단법의 최적 표준으로 사용될 수도 있는 결과를 보여 주었지만, 이 검사 역시 세균이 위점막 전체에 고르게 분포하지 않는 특성 때문에 기본적으로 조직검사를 통한 검사 방법이 가지는 한계를 가지고 있다. 소아에서 상부 위장관 증상으로 위내시경 검사를 받는 환자 대부분에서 *H. pylori*를 검출할 수 있었다는 것은 소아에서 흔히 사용되는 *H. pylori* 감염 진단법의 재평가 필요성을 시사한다.

**참 고 문 헌**

- 1) 윤희상, 최명범, 백승철, 이우곤, 조명제, 이광호. 위 생검조직 urease test를 이용한 *Helicobacter pylori* 감염 진단의 한계. 제 43차 대한소아과학회 추계학술대회초록집 1993:178.
- 2) Goodwin CS. The sydney system: microbial gastritis. *J Gastroenterol Hepatol* 1991;6:235-7.
- 3) Hartmann D, von Graevenitz A. A note on name, viability and urease tests of *Campylobacter pylori*. *Eur J Clin Microbiol* 1987;6:82-3.
- 4) 이광호, 조명제, 김종배 최상경, 박철근, 김영채 등. 위십이장 염증성 질환과 *Campylobacter pylori*에 관한 전향적 연구. *대한미생물학회지* 1987;23:9-16.
- 5) Megraud F. Direct and indirect diagnostic methods for *Helicobacter pylori* infections. *Gastroenterol Clin Biol* 1994;18:217-22.
- 6) 조윤경, 정양숙, 임재영, 김윤옥, 최명범, 박찬후 등. 소아 위생검 조직절편을 이용한 *H. pylori* 감염 진단에 있어서 PCR 적용의 한계. *대한소화기학회지* 1998;31:16-22.
- 7) Lim JY, Jung YS, Cho YK, Kim YO, Choi MB, Woo HO, et al. Immunohistochemical detection of *Helicobacter pylori* using home-made polyclonal antibody in children. *Proceedings of the 5th Congress of the Asian Pan Pacific Society of Pe-*

- diatric Gastroenterology and Nutrition*; 1997 Apr 10-13; Taipei. Taipei. Asian Pan Pacific Society of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 1997.
- 8) Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. Classification and grading of gastritis. The updated sydney system. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. *Am J Surg Pathol* 1996;20:1161-81.
- 9) 이광호, 조명제, 김종배, 최상경, 김영채. 위내시경 생검체에서 분리된 *Campylobacter pylori*의 미생물학적 특성. *대한미생물학회지* 1987;23:17-26.
- 10) Lowry OH, Rosebrough JN, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with Folin reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-75.
- 11) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-5.
- 12) 윤희상, 백승철, 이우곤, 조명제, 류항희, 최홍진 등. *Helicobacter pylori* 감염의 혈청학적 진단법. *대한미생물학회지* 1990;25:463-74.
- 13) Marshall BJ. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 1983;1:1273-5.
- 14) Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1984;1:1311-5.
- 15) Warren JR. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 1983;1:1273-5.
- 16) Marshall BJ, Armstrong JA, McGeachie DB, Glaney RJ. Attempt to fulfill Koch's postulates for pyloric *Campylobacter*. *Med J Aust* 1985;142:436-9.
- 17) Morris A, Nicholson G. Ingestion of *Campylobacter pyloridis* causes gastritis and raised fasting gastric pH. *Am J Gastroenterol* 1987;82:192-9.
- 18) Anderson LP, Nielsen H. Peptic ulcer: an infectious disease? *Ann Med* 1993;25:563-8.
- 19) Blaser MJ. *Helicobacter pylori*: its role in disease. *Clin Infect Dis* 1992;15:386-91.
- 20) Nomura A, Stemmermann GN, Chyou PH, Perez-Perez GI, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* infection and the risk for duodenal and gastric ulceration. *Ann Intern Med* 1994;120:977-81.
- 21) Forman D, Sitas F, Newell DG, Stacey AR, Boreham J, Peto R, et al. Geographic association of *Helicobacter pylori* antibody prevalence and gastric cancer mortality in rural China. *Int J Cancer* 1990;46:608-11.
- 22) Parsonnet J, Friedmann GD, Vandersteen DP, Chang Y, Vogelmann JH, Orentreich N, et al. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N Engl J Med* 1991;325:1127-31.

- 23) The EUROGAST Study Group. An international association between *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. *Lancet* 1993;341:1359-62.
- 24) Nomura A, Stemmermann GN, Chyou PH, Kato I, Perez-Perez GI, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. *N Engl J Med* 1991;325:1132-6.
- 25) IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to human. vol 61 Lyon. World Health Organization, 1994:177-240.
- 26) Honda S, Fujioka T, Tokieda M, Satoh R, Nishizono A, Nasu M. Development of *Helicobacter pylori*-induced gastric carcinoma in Mongolian gerbils. *Cancer Res* 1998;58:4255-9.
- 27) Sullivan PB, Thomas JE, Wight DG, Neale G, Eastham EJ, Corrah T, et al. *Helicobacter pylori* in Gambian children with chronic diarrhoea and malnutrition. *Arch Dis Child* 1990;65:189-91.
- 28) Walker-Smith JA. Diarrhoeal disease: current concepts and future challenges. *Malnutrition and infection. Trans R Soc Trop Med Hyg* 1993;87(3 Suppl):13S-15S.
- 29) Weaver LT. Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene Meeting at Manson House, London, 16 February 1995. Aspects of *Helicobacter pylori* infection in the developing and developed world. *Helicobacter pylori* infection, nutrition and growth of West African infants. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1995;89:347-50.
- 30) Patel P, Mendall MA, Khulusi S, Northfield TC, Strachan DP. *Helicobacter pylori* infection in childhood: risk factors and effect on growth. *BMJ* 1994;309:1119-23.
- 31) Banatvala N, Mayo K, Megraud F, Jennings R, Deeks JJ, Feldman RA. The cohort effect and *Helicobacter pylori*. *J Infect Dis* 1993;168:219-21.
- 32) Malaty HM, Graham DY. Importance of childhood socioeconomic status on the current prevalence of *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 1994;35:742-5.
- 33) Kuipers EJ, Pena AS, van Kamp G, Uytendaele AM, Pals G, Pels NF, et al. Seroconversion for *Helicobacter pylori*. *Lancet* 1993;342:328-31.
- 34) Sipponen P, Helske T, Jarvinen P, Hyvarinen H, Seppala K, Siurala M. Fall in the prevalence of chronic gastritis over 15 years: analysis of outpatient series in Finland from 1977, 1985, and 1992. *Gut* 1994;35:1167-71.
- 35) Vaira D, Holton J, Osborn J, D'Anna L, Romanos A, Falzoni M, et al. Endoscopy in dyspeptic patients: is gastric mucosal biopsy useful? *Am J Gastroenterol* 1990;85:701-4.
- 36) Madani S, Rabab R, Tolia V. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection from antral biopsies in pediatric patients: is urease test that reliable? *Dig Dis Sci* 2000;45:1233-7.
- 37) Youn HS, Lim JY, Cho YK, Lee SJ, Suh JH, Kim EA, et al. Positive rate of urease test according to the number of gastric biopsy specimens in children. *Proceedings of Digestive Disease Week; 1999 May 15-19; Orlando. Washington D.C.: American Gastroenterological Association, 1999.*
- 38) Lerang F, Moum B, Mowinckel P, Haug JB, Ragnhildstveit E, Berge T, et al. Accuracy of seven different tests for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection and the impact of H2-receptor antagonists on test results. *Scand J Gastroenterol* 1998;33:364-9.
- 39) 조윤경. 위생검조직의 병리조직학적 소견과 urease 검사와의 관계. 석사학위 청구논문, 진주: 경상대학교 대학원, 1996.