

환경적 스트레스에 의한 *Helicobacter pylori*의 형태 변화

이학성 · 최태부*

건국대학교 공과대학 미생물공학과

Morphologic Conversion of *Helicobacter pylori* from Bacillary to Coccoid by Environmental Stress. Hak-Sung Lee and Tae-Boo Choe*. Department of Microbial Engineering, Kon-kuk University, Seoul 143-701, Korea - Bacillary is the most common form of *H. pylori* observed during human infection. However, it is known that the morphology change of *H. pylori* from bacillary to coccoid can be occurred with a response to the environmental stresses such as the nutrient depletion, accumulation of toxic metabolites, pH alteration, and exposure to antimicrobial agents. The coccoid form of *H. pylori*, which is viable but non-culturable in vitro, seems to be the major cause of antibiotic resistancy and high reinfecability of *H. pylori*. In this regard, we studied the environmental factors that can induce the morphological change in vitro of *H. pylori*, and the change of fatty acid composition of plasma membrane. The morphological change from bacillary to coccoid could be observed with the depletion of nutrients, pH variation and reactive oxygen species added in the culture media. This morphologic conversion was paralleled by a dramatic decrease in unsaturated fatty acids and an increase in saturated fatty acids of plasma membrane. The change in composition of membrane fatty acid seems to be a kind of protection mechanism of *H. pylori* against these environmental stresses.

*H. pylori*는 1982년 Warren과 Marshall에 의해 분리된 뒤(1) 위염을 비롯한 위궤양 및 십이지장궤양의 원인균으로 알려져 있으며, 현재는 위암과도 관계가 있는 것으로 보고되고 있다(2~6). 1994년 2월 미국 National Institute of Health(NIH) 주관 하에 개최된 Consensus Development Conference에서는 위궤양 및 십이지장궤양과 같은 소화성 궤양은 초발 또는 재발을 막론하고 산분비 억제제를 이용한 치료 이외에 *H. pylori*에 대한 항생제 치료가 필요하다는 결론을 발표한 바 있고, 같은 해 6월 International Agency for Research on Cancer (IARC)에서 주관한 working party에서는 *H. pylori*를 사람에게 대한 확실한 발암물질(definite carcinogen, group I)로 분류 발표하였다.

*H. pylori*는 Gram 음성 균으로 만곡형의 bacillary 형태를 갖는 것이 일반적이지만 주위 환경에 따라 형태를 coccoid로 바꾸는 것으로 알려져 있다(7~8). 사람의 위 속에는 bacillary 형태와 coccoid 형태가 같이 관찰되기도 한다(9). *In vitro*에서는 주로 배양시간의 연장(8, 10~11), 영양분의 고갈(12), pH의 변화(13), 산화적 stress(14), 항생제에 대한 노출(10, 15) 등에 의해 coccoid 형태로 바뀌게 된다. 또한 *H. pylori*가 감염된 인체 내에서는 *H. pylori* 외막의 항원성이 큰 단백질들이 면역세포를

자극하여 TNF- α , IL-2, IL-8과 같은 cytokine을 방출함으로써 활성화된 대식세포들이 발생시키는 활성산소(16, 17)에 대한 방어책으로 형태 변화가 일어날 수 있다고 추측된다. *H. pylori*가 형태를 바꿈으로써 항생제에 대한 내성(18)과 치료후 재발에 관여하리라고 추측되지만, 형태 변화의 근본적인 이유 및 원인은 아직도 명확하게 밝혀져 있지 못하다. Coccoid 형태로의 변화는 증식의 중지를 의미하게 되는데 일단 coccoid 형태로 바뀐 *H. pylori*는 더 이상의 증식이 어렵게 된다. 하지만 결코 죽은 세포가 아니고 휴지기(dormant)상태를 유지한다는 것이 정설화 되고 있다(8, 15). 이상의 이유들로 해서 재발 및 재감염에 대해 아직 논란의 여지가 많이 남아있기는 하지만 그럼에도 불구하고 위궤양치료를 있어서의 가장 큰 문제는 *H. pylori*에 의한 궤양의 재발이며 형태의 변화가 어느 정도는 이에 관련이 되어 있다는 것이 받아들여지고 있는 실정이다(9, 19).

본 연구에서는 여러가지 환경적인 스트레스 중에서 배양시간과 pH 그리고 산화적 스트레스에 의한 *H. pylori*의 형태변화를 관찰하였으며, 특히 환경적 스트레스에 따른 형태 변화시 세포막 지방산의 변화를 관찰함으로써 그 원인을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

사용 균주

H. pylori NCTC 11637을 ATCC로 부터 구입하였으

*Corresponding author

Tel. 82-2-450-3523, Fax. 82-2-3436-5594

E-mail: tbchoe@kkvcc.konkuk.ac.kr

Key words: *Helicobacter pylori*, Morphology, Coccoid form, Environmental stress

며, Gram stain 하여 morphology를 관찰하고 urease test, catalase test등을 실시하여 *H. pylori*을 확인한 후 실험에 사용하였다.

사용 배지

액체 배지로는 brucella broth media(difco; Detroit MI 48232-7058, USA), 고체배지로는 columbia blood agar base(difco), blood agar plate(Korea media; 성남시 분당구 야탑동 분당 산업타운 가동 404호)를 사용하였으며, supplement로 3% bovine calf serum(HyClone; 1725 S. State Highway 89-91 Logan, Utah 84321, USA), 0.2% activated charcoal(Sigma; St. Louis, MO 63178, USA), 1% cyclodextrin을 사용하였다. 항생제로는 vancomycin(6 mg/l), nalidixic acid(20 mg/l), amphotericin B(2 mg/l)를 첨가하여 배양하였다.

균의 배양

37°C, 10% CO₂ incubator에서 과습한 상태를 유지하며 삼각 flask에서 10 ml씩 진탕배양기를 이용하여 100 rpm으로 교반하면서 배양하거나 jar fermentor에서 1-2 리터씩 배양하였다. 성장한 균은 -70°C의 deep-freezer에서 보관하였으며 필요시 꺼내어 사용하였다. *H. pylori*를 계대배양 할때 마다 oxidase test, catalase test, urease test, Gram stain을 시행하여 타균과의 오염 여부를 판단하였다. 균체량은 배양액 1 ml을 취하여 원심분리 후 cell을 phosphate buffer saline(PBS) 1 ml로 재현탁시킨 후 PBS를 blank로 하여 600 nm에서 흡광도를 측정 한 후 다시 agar plate에서 colony forming units (CFU)를 측정해서 만든 표준곡선으로부터 결정하였다.

형태 관찰

여러 조건에서 배양된 균의 형태를 광학현미경(×1,000)으로 관찰하고 사진 촬영을 실시하였다.

지질과산화물의 측정(37)

*H. pylori*를 각 시간대에서 50 ml의 균체를 회수한 후 농축하여 5분 간격으로 sonication 하여 파쇄하였다. 0.1 ml의 파쇄액에 증류수 2.9 ml, acetic acid 1 ml, TBA (thiobarbituric acid) 1 ml, 8.1% SDS 0.2 ml을 혼합하여 vortexing 한 후 끓는 물에 1시간 반응을 시켰다. 반응 정지 후 butanol 5 ml을 섞어 다시 30초 동안 vortexing을 하고 원심분리(3,000 rpm, 5분)하여 층분리가 일어나면 상층액을 회수하여 fluorescence spectrophotometer를 사용하여 excitation 515 nm, emission 553 nm에서 측정하였으며 표준 물질로 1,1,3,3-tetraethoxy propane(TEP)를 사용하여 표준곡선을 작성하여 비교 정량하였다.

지방산 분석

세포막의 지방산 분석을 위하여 gas chromatography를 이용하였으며 절차는 다음과 같다. 우선 *H. pylori*를 일정시간 배양한 후 균체를 회수하고 methanol/HCl과 chloroform 용액을 섞은 후 건열기에서 methanolysis 시키고 질소가스로 농축시킨 다음 다시 chloroform을 첨가하여 녹이고 불순물을 제거후 질소가스로 휘발시켜 생성된 순수한 지질 필름을 분석에 사용하였다. 최종적으로 필름화 시킨 시료는 질소가스를 채워 상온에서 밀봉하여 보관하였다. 지방산의 동정을 위해 Sigma (#189-19; 100 mg ample) lipid standard를 사용하였고 조성은 다음과 같다-Methyl esters of butyric acid(C4:0), caproic acid(C6:0), caprylic acid(C8:0), capric acid(C10:0), lauric acid(C12:0), myristic acid(C14:0), palmitic acid(C16:0), stearic acid(C18:0), oleic acid(C18:1, cis-9), linoleic acid(C18:2, cis-9,12), linoleinic acid(C18:3, cis-9,12,15), arachidic acid(C20:0), arachidonic acid(C20:4, cis-5,8,11,14), erucic acid(C22:1, cis-13)

Gas chromatography의 기기 및 작동 조건

Instrument: Shimazu Co. GC-8A

Detector: Flame Ionization Detector

Column: DB1 capillary column

Injector temperature: 270°C

Detector temperature: 300°C

Temperature program

Initial temp. 50°C, initial time 0 min

Final temp. ① 100°C ② 150°C ③ 300°C

Final time ① 0 min ② 0 min ③ 30 min

Program rate ① 10°C/min ② 3°C/min

③ 4°C/min

Carrier gas: N₂

Gas flow rate: 200kPa

결과 및 고찰

배양시간에 따른 형태적 변화와 막지질 성분 변화

Fig. 1은 *H. pylori*를 brucellar 배지에서 배양했을 때 얻어진 증식 곡선으로, 배양 40시간을 전후해서 균체농도가 최고에 달하며 그뒤 서서히 감소하는 형태를 보이고 있고, 균체 증식에 따라 pH도 점차 상승하였음을 알 수 있다. 균체농도가 최고에 달했을 때 agar plate에 도달하여 생존세포수를 측정하면 10⁸ colony/ml정도인데 이것은 다른 미생물에 비해 100-1000배 낮은 수치로, 유가식 배양등 여러가지 방법을 써 보았으나 *H. pylori*가 액체 배양에서 도달할 수 있는 최고 균체농도는 이 값 이상 증가하기 힘든 것으로 나타났다(Data not shown). *H.*

*pylori*가 액체 배양에서 제한된 증식 현상을 보이는데 대한 뚜렷한 이유는 아직까지 알 수 없으나 배양시간이 경과하면서 과도한 ammonia의 생성으로 pH가 높아지고

동시에 metabolism의 불균형으로 인해 glutamate 생합성에 필수적인 α -ketoglutarate가 결핍(28)되거나, 활성산소의 증가로 인한 세포막의 손상등이 균체 증식을 억제하는 것으로 사료된다. 정상적인 *H. pylori*는 그람음성의 미호기성 균이며 4~6개의 편모를 갖고 있어 운동성이 큰 특징을 보이고 있다. 형태는 "S"자 모양의 만곡형(bacillary)이지만 배양시간이 경과함에 따라 매우 심하게 형태변화가 일어나 배양시간에 따른 형태적 변화는 Fig. 2에서와 같이 60시간 이전의 배양에서는 전형적인 bacillary 형태를 보이지만 배양시간이 연장됨에 따라 "U"자 모양의 말굽모양(horse shoe)을 거쳐 coccoid 형태로 바뀌었다. 이러한 형태적 변화는 배양시간이 연장될 때 더 잘 관찰되었다(8). 일단 형태 변화가 일어난 균은 일반적으로 *in vitro*에서 재배양이 어려우나 죽은 것은 아니고 환경의 변화에 대한 보호 작용으로 생각되며 생존에 유리한 조건이 되면 다시 감염이 가능한 bacillary 형태로 전환될 수 있는 것으로 간주된다(20~22). 그러나 *H. pylori*와 유사한 *Helicobacter jejuni*의 경우 coccoid 형태로 변화되면 감염 능력이 없어지는 것으로 보고되고 있어(23~24) *H. pylori*가 coccoid 형태로 된 후 다시 재감염에 관련되어

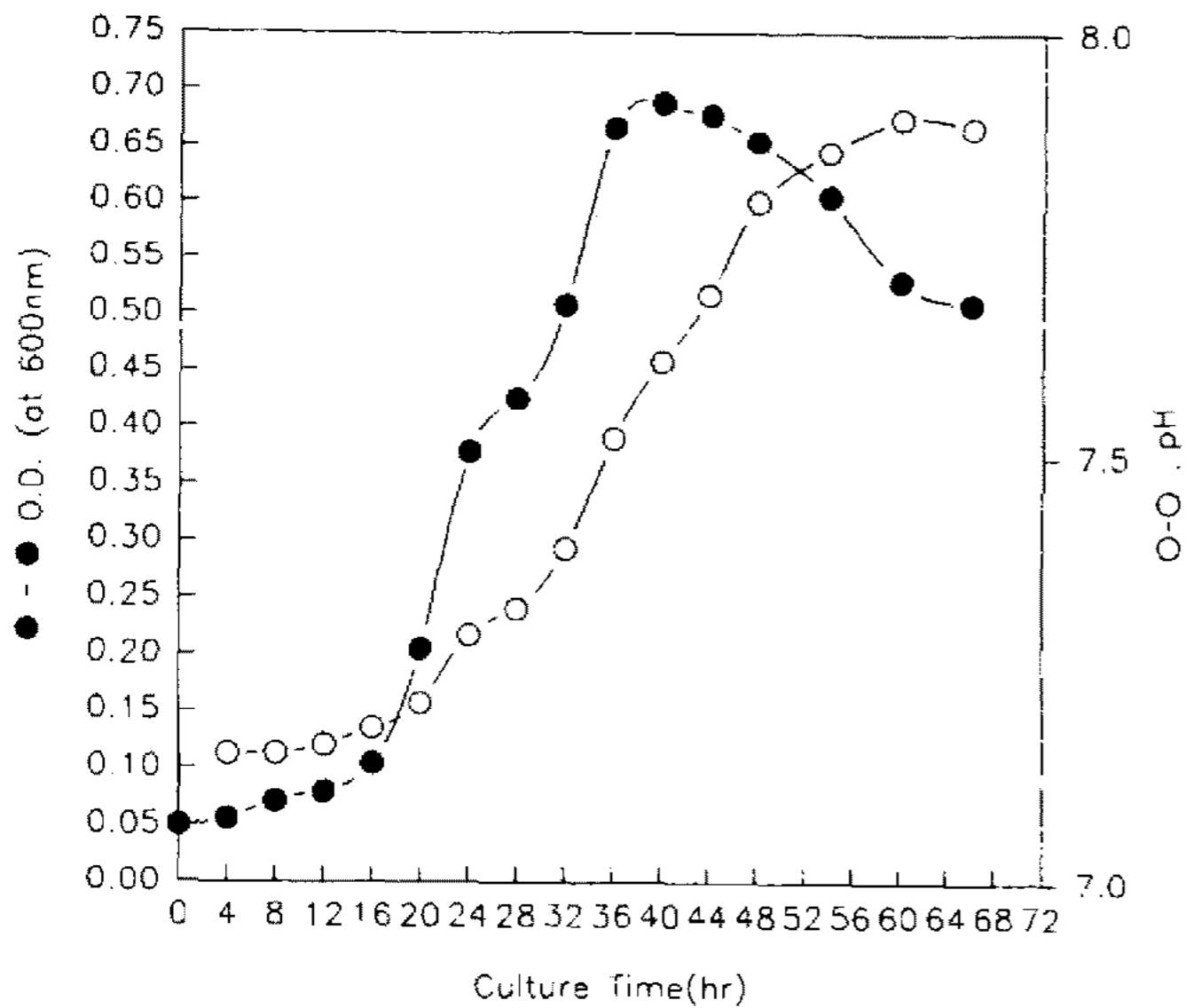


Fig. 1. Growth kinetics of *H. pylori* in brucellar broth containing 5% bovine calf serum.

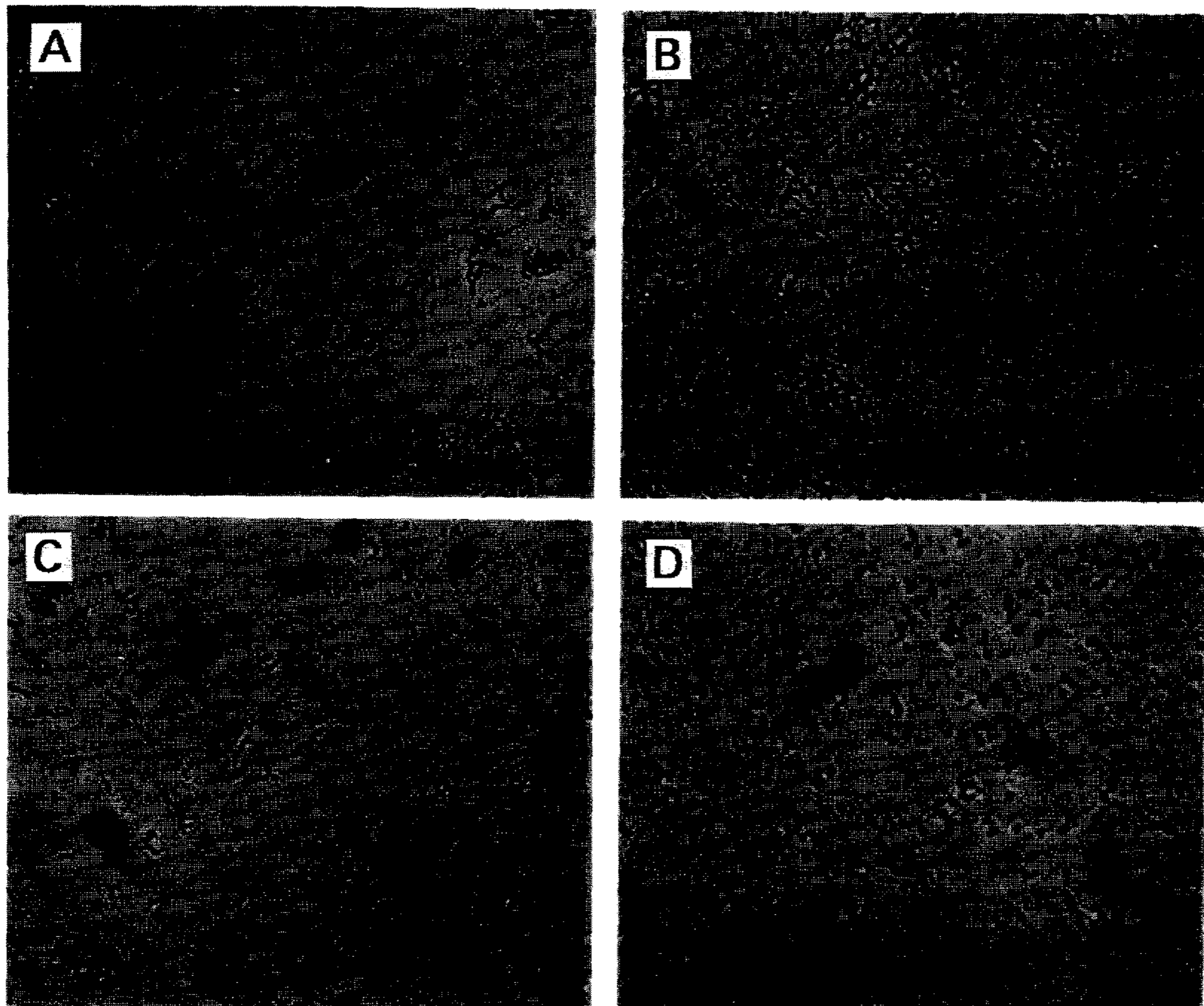


Fig. 2. Morphological changes of *H. pylori* in different time ($\times 1,000$). (A) 24 hr (B) 40 hr (C) 60 hr (D) 75 hr

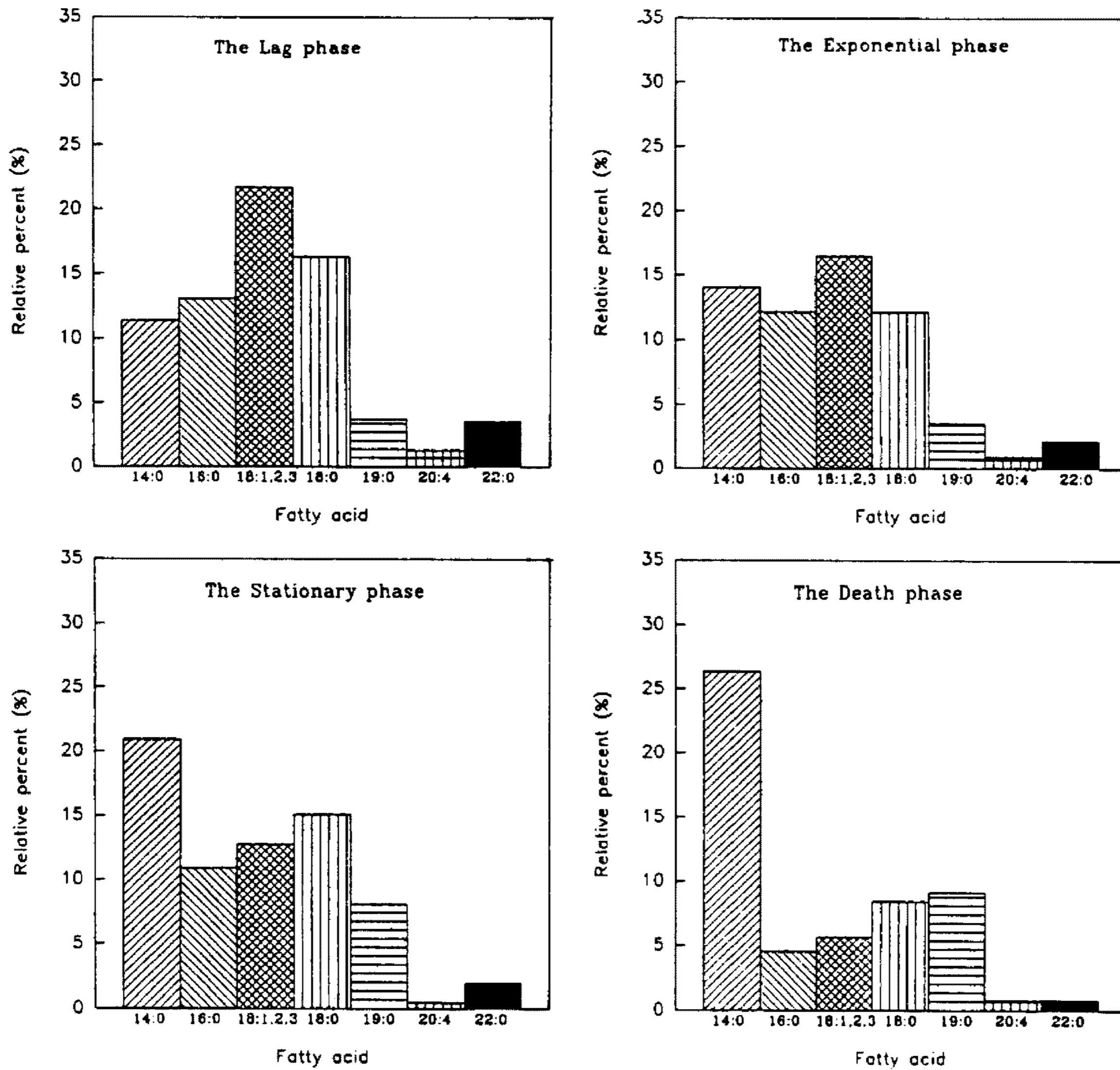


Fig. 3. Fatty acid profiles of *H. pylori* at different growth phase.

14:0 (myristic), 16:0 (palmitic), 18:1 (oleic), 18:2 (linoleic), 18:3 (γ -linolenic), 19:0 (cyclopropano-nonadecanoic), 20:4 (arachidonic), 22:0 (behenic).

있는지에 대해서는 아직 논쟁의 여지가 남아있다.

*H. pylori*의 세포막을 구성하는 인지질의 지방산 조성 변화를 배양시간에 따라 살펴보면(Fig. 3) linoleic acid (18:2)와 oleic acid(18:1), arachidonic acid(20:4) 등 불포화지방산의 감소와 myristic acid(14:0) 등 포화지방산의 증가가 관찰되는데, 이것은 배양도중 생기는 여러 가지 환경적 스트레스 즉, 독성이 있는 부산물 및 영양결핍에 따른 활성산소의 증가(14)와 pH의 변화 때문으로 해석된다. 특히 외부의 pH 변화에 대해 막을 안정화시키는 능력과 활성산소에 대한 방어능력을 갖는 cyclopropano-nonadecanoic acid(C₁₉, 19:0)의 변화는 상당히 중요한 의미를 갖는다(25~27). 따라서 pH 변화와 활성산소의 증가가 실제로 형태 변화와 관계가 있는지를 다음 실험을 통하여 조사하였다.

pH에 따른 형태적 변화와 막지질 성분 변화

*H. pylori*는 미생물중 드물게 강산이 분비되는 사람의 위속에서 성장이 가능한 것으로 알려져 있으나 *in vitro*에서 성장에 적합한 pH는 6.5~7.5 정도이다(28~29). 위속에서 *H. pylori*가 집락을 형성하는 것은 사실이지만 실제로 증식이 가능한 곳은 중성 pH에 가까운 점막(mucus gel layer)과 위벽세포(mucus cell) 사이이며(30), *in vitro*에서는 오히려 낮은 pH에 대단히 민감하여 증식이 억제되는 것으로 나타났다(11). 그러나 *H. pylori*가 사람의 감염 경로에서 강산성의 위장관(acid lumen)을 통과를 해야하는데 이것은 *H. pylori*의 세포막 단백질인 urease를 이용해 위장내의 요소(urea)를 분해하여 암모니아(NH₃)를 생성함으로써 국부적으로 pH를 증가시켜 자신을 보호한다고 알려져 있다(28). 그밖에도 위속에 존재하는 다른 미생물들, 예를들면 *Salmonella*나 *Shigella* 처럼 산성환경에 대한 방어 기작으로 위세포의 위산 분비를 억제하거나, 막단백질중 proton pump에 관여하여 세

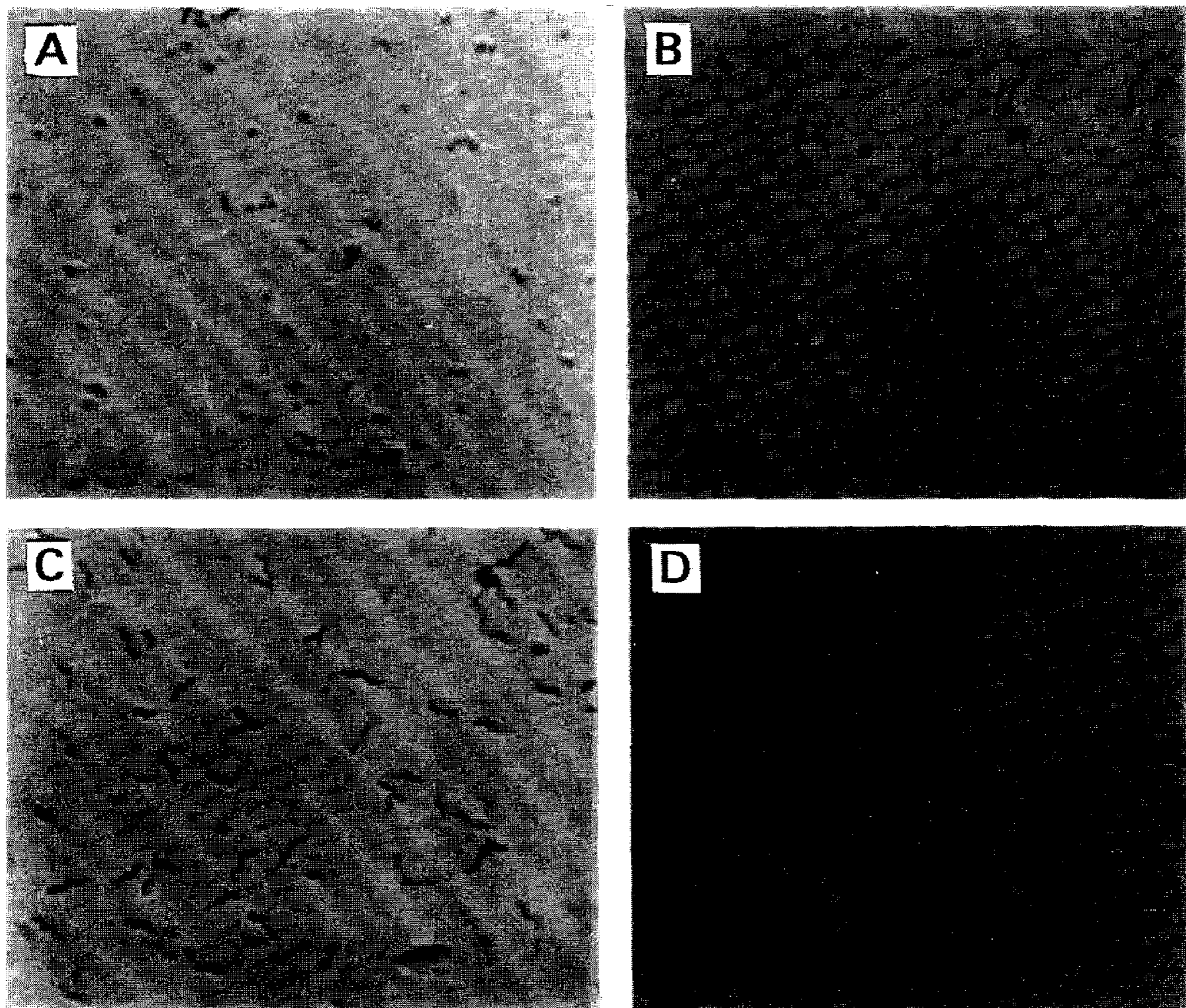


Fig. 4. Morphological changes of *H. pylori* in different pH ($\times 1,000$). (A) pH 3 (B) pH 5 (C) pH 7 (D) pH 9

포내부의 pH를 외부의 pH와 관계없이 일정하게 유지하는 기능이 있는 단백질이 존재함으로써 낮은 pH에서도 생존할 수 있게 하는 것이 아닌가 추측된다(31). Fig. 4는 정상적으로 42시간 배양한 *H. pylori*를 pH 3 buffer에서 4시간 동안 방치하여 pH shock을 준후 다시 12시간 배양하여 *H. pylori*의 형태변화를 조사한 것으로, 중성 pH외에는 모두 bacillary 형태에서 coccoid 형태로 바뀌었다. 젖산균에 대한 많은 연구들 중에서 온도와 pH에 따라 세포막 지방산 조성이 변하며 특히, 낮은 pH에서는 지방산의 fluidity가 감소하고 rigidity가 증가하였음을 보고 하였다(27). 따라서 *H. pylori*에서도 배양액의 pH 변화가 세포막 지방산 조성에 어떤 변화를 가져오는가를 검토하기 위해서 gas chromatography로 지방산 조성을 분석하여 대조군과 비교하여 보았다. 주로 불포화지방산과 포화지방산을 중심으로 검토해본 결과 Fig. 5와 같은 결과를 얻었다. 불포화 지방산은 대부분 감소하는 것으로 관찰된 것과는 달리 포화지방산은 증가하여 세포막이 전반적으로 rigid 하게된다는 결과를 얻었으며 cyclopropano-nonadecanoic acid(C₁₉, 19:0)역시 증가하는 것으

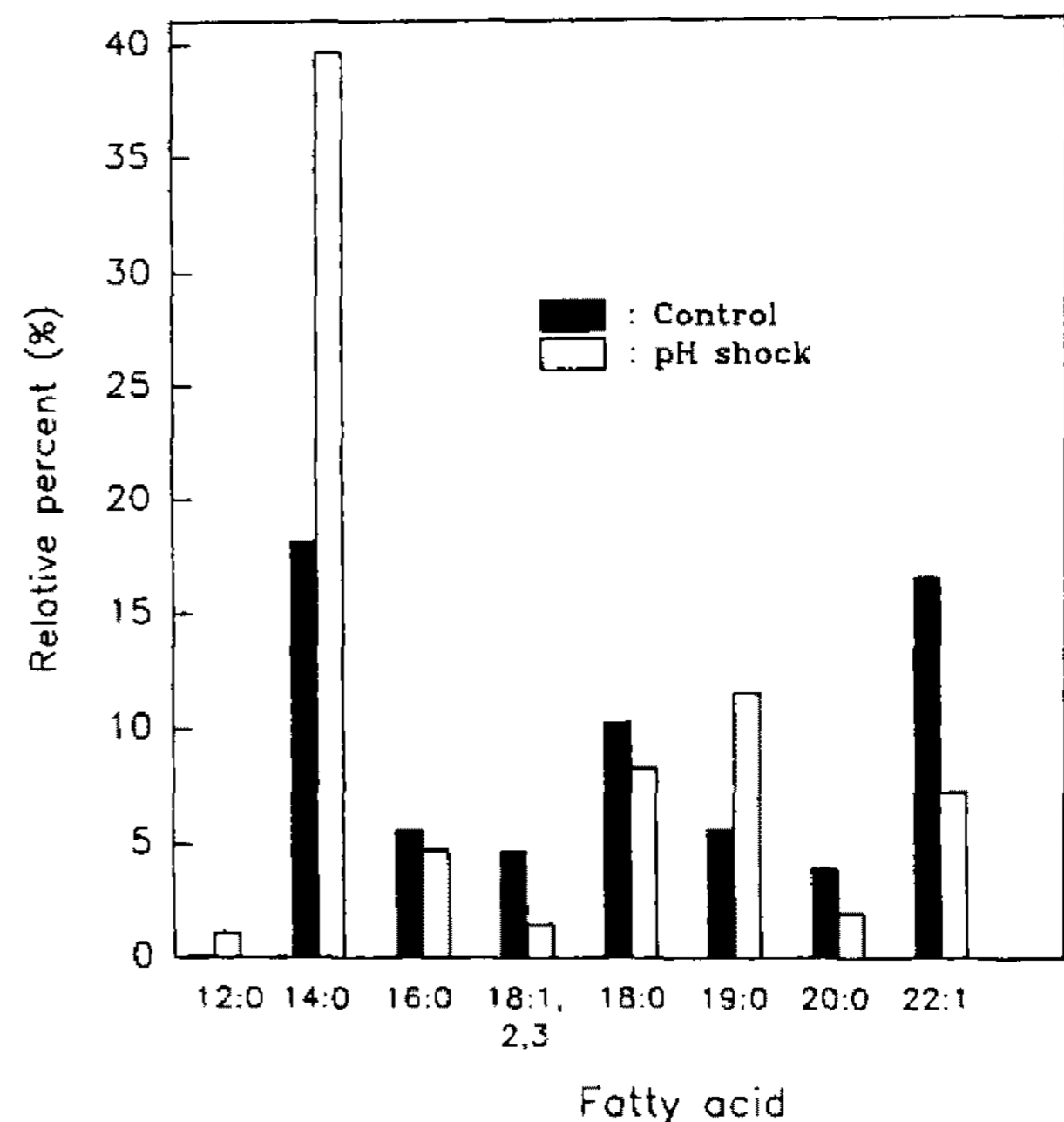


Fig. 5. Change in fatty acid composition of *H. pylori* after pH shock for 4 hours. Cells were cultured for 42 hours before the pH shock and were harvested after 12 hours culture.

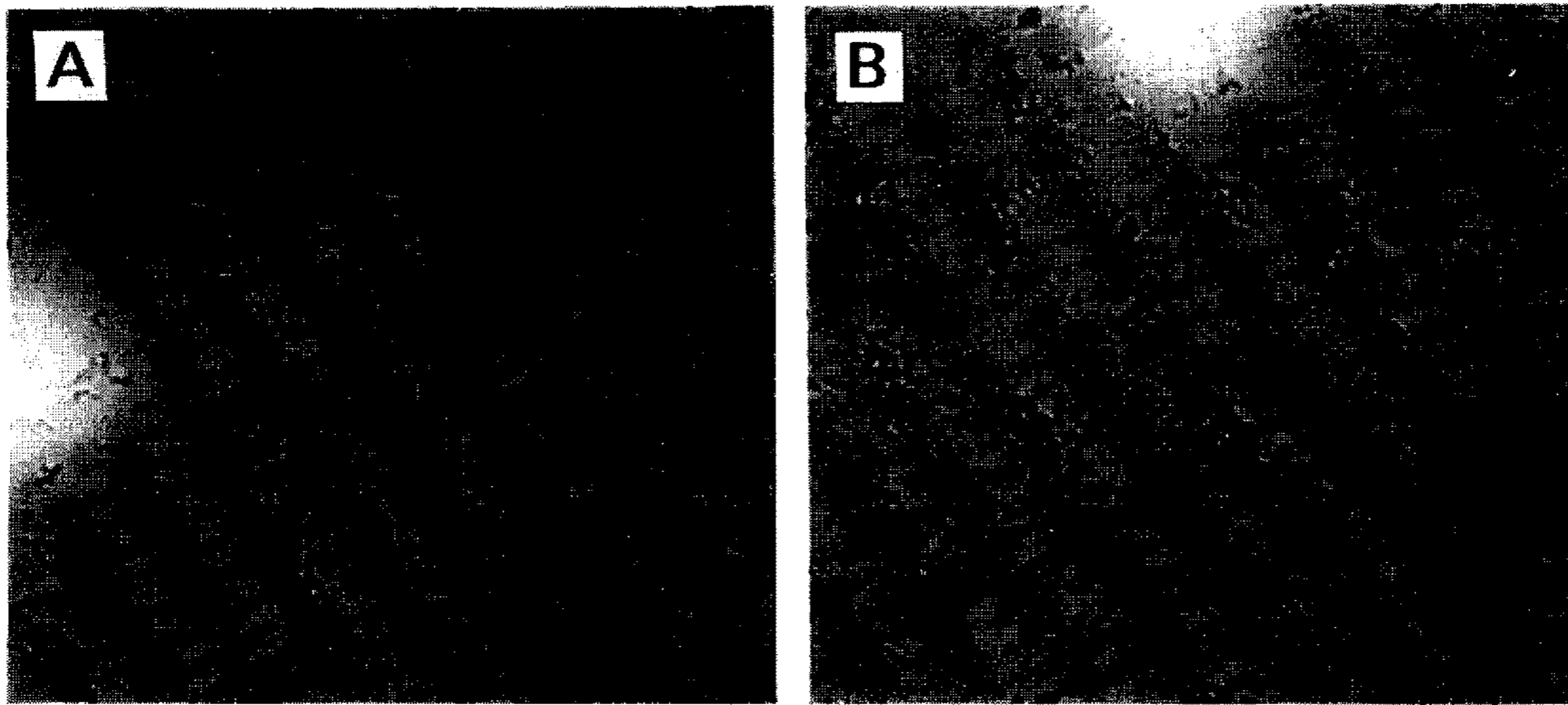


Fig. 6. Morphological changes of *H. pylori* with the addition of t-butyl hydroperoxide ($\times 1,000$).
 (A) 40 hr-culture showing pleomorphic appearance of the bacteria including ring shape (compare with Fig. 2B).
 (B) 60 hr-culture showing most coccoid form.

로 나타났다. 따라서 cyclopropano-nonadecanoic acid ($C_{19}, 19:0$) 지방산이 *H. pylori*가 pH변화에 적응하는 방어인자 임이 거의 확실하다 하겠다. 특히 불포화 지방산 중 linoleic acid, oleic acid($C_{18}, 18:2,1$) 감소는 낮은 pH에서 고농도의 H^+ 이온에 의한 공격에 대한 방어기작으로 세포막의 유동성을 낮추는데 기여한 것으로 추측된다. 실질적으로 외부에서 인위적으로 불포화 지방산인 linoleic acid나 oleic acid를 첨가할 경우 막자체의 불포화도가 증가하게 되어 pH에 대해 상당히 sensitive해진다는 보고도 있다(26, 34) 이러한 결과로 볼때 *H. pylori*는 pH의 변화에 민감하게 대처하는 미생물임을 알 수 있고 pH가 산성이나 알칼리성으로 변할 경우 생존에 유리하다고 생각되는 coccoid 형태를 취하는 것으로 여겨진다. 이러한 형태 변화가 가역적인 것인지는 앞으로 좀 더 많은 실험을 수행해 보아야 알 수 있겠으나, 세포막 조성의 변화등으로 인해 항생제 등에 대한 내성도 증가할 것으로 짐작된다. 실제로 위장내의 산분비 억제제를 항생제와 병용할 경우 *H. pylori*에 대한 치료효과가 증가한다는 것도 이러한 가설을 뒷받침 해주고 있다(32~33).

t-Butyl hydroperoxide 첨가에 따른 형태적 변화와 막 지질 성분 변화

산소를 전자 수용체로 사용하는 호기성 생물들은 사용되는 산소중 1-5% 정도가 불완전하게 환원되어 반응성이 높은 활성 산소종(reactive oxygen species)이 발생된다(35). 활성 산소종은 최외각에 짝짓지 못한 전자쌍(unpaired electron pair)을 가지는 유리 라디칼(free radical)의 일종으로서 반응성이 대단히 높아 주변 물질을 산화시켜 원래의 활성을 잃게 하는데, 특히 막을 구성하는 지질의 산화는 막의 투과성, 유동성 및 막단백질의

활성등에 심각한 손상을 주어 세포의 생육을 위협한다(36). 또 활성 산소는 면역 세포에 의한 면역 반응중에서도 다량 발생하게 되는데, 위장내에 감염되어 있는 *H. pylori* 역시 이러한 활성 산소에 노출될 것으로 예측된다. 따라서 *H. pylori*의 형태 변화 인자로서 배양시간 및 pH 변화 외에 활성 산소종을 고려하여 보았다. 이를 위해 *H. pylori*를 배양하면서 활성 산소종의 일종인 peroxy radical을 유발할 수 있는 t-butyl hydroperoxide (BHP)를 첨가하여 형태변화에 미치는 영향을 관찰 하였으며 이때 균의 생육과 지질 과산화값(lipidperoxide, LPO)을 함께 측정하였다. Fig. 6은 세포가 대수증식기로 도달하는 26시간에 BHP 2.0 M을 첨가하고 배양시간이 각각 40시간과 60시간 경과한 다음 *H. pylori*의 형태 변화를 관찰한 것으로 같은 시간대의 비 첨가군(Fig. 2B 참조)에 비해 bacillary 형태보다 coccoid 형태가 현저히 증가되었음을 알 수 있다. 또 Fig. 7에 나타난 것처럼 세포농도도 현저히 감소되면서 지질 과산화값(LPO)도 대조군에 비하여 각 시간대에서 30~50%정도 증가하여 지질과산화물이 *H. pylori*의 생육 및 형태 변화에 영향을 주었다고 사료된다. 이렇게 배양된 *H. pylori*의 세포막 지방산을 분석한 결과는 Fig. 8과 같다. 전체적인 경향은 pH shock에 의한 지방산 변화와 유사하였으나 behenic acid($C_{22}, 22:0$)의 증가와 myristic acid ($C_{14}, 14:0$)의 감소가 두드러진 차이이다. 이것은 짧은 포화지방산보다 긴 사슬의 포화지방산의 함량을 증가시켜 막전체가 증가된 활성 산소에 대해 방어장벽을 구축하는 것으로 추측된다.

이상에서 살펴본 바와 같이 *H. pylori*는 배양시간의 경과, pH의 변화, 활성산소의 증가 등과 같은 환경적 스트레스에 대해 형태 변화와 세포막의 지방산 조성 변화라

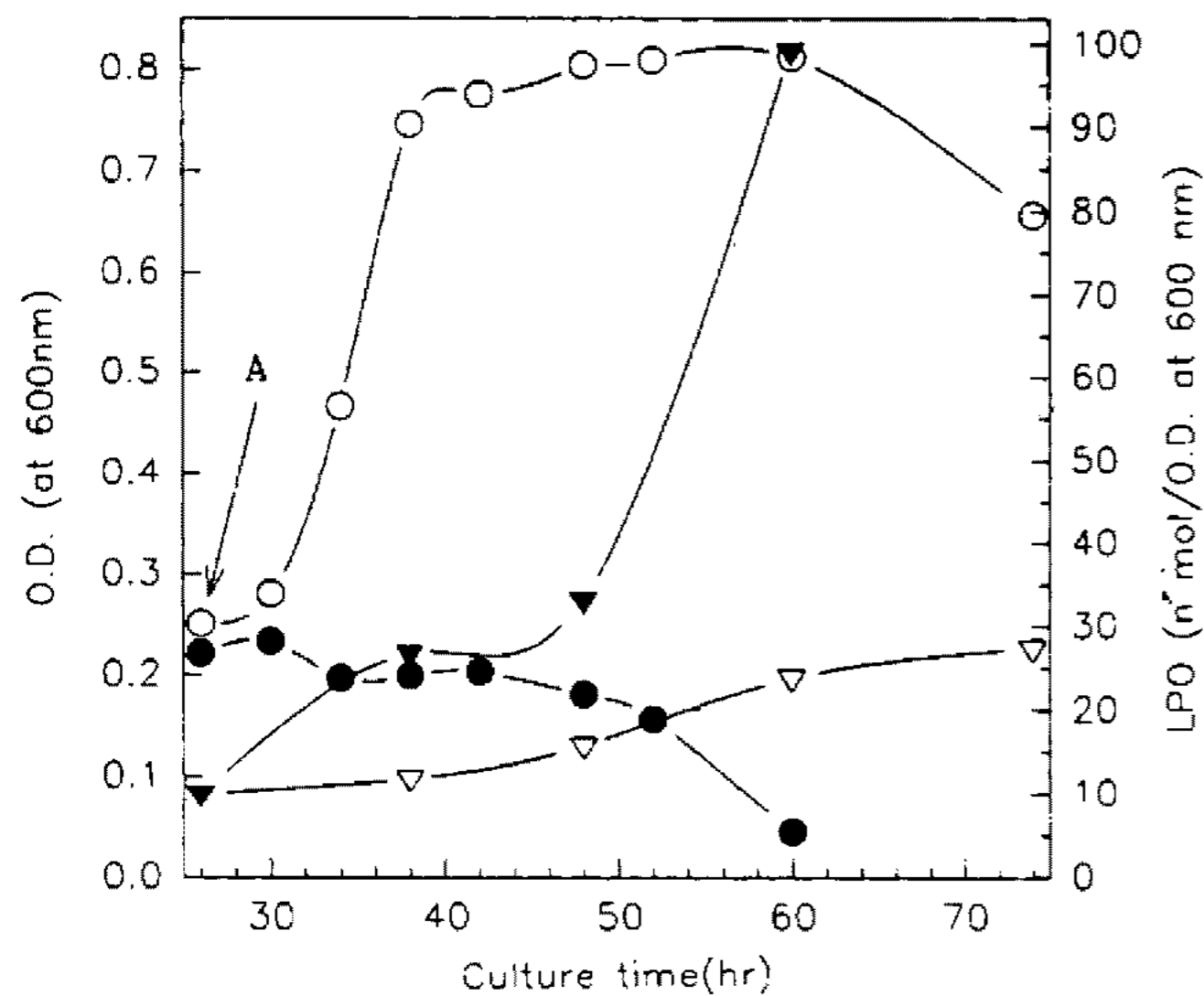


Fig. 7. Variation of *H. pylori* cell density and lipidperoxide (LPO) content with or without *t*-butyl hydroperoxide (BHP).

○, control; ●, addition of BHP; ▽, LPO content (control); ▼, LPO content in the presence of BHP.

A: Additionpoint of 2.0 μM BHP.

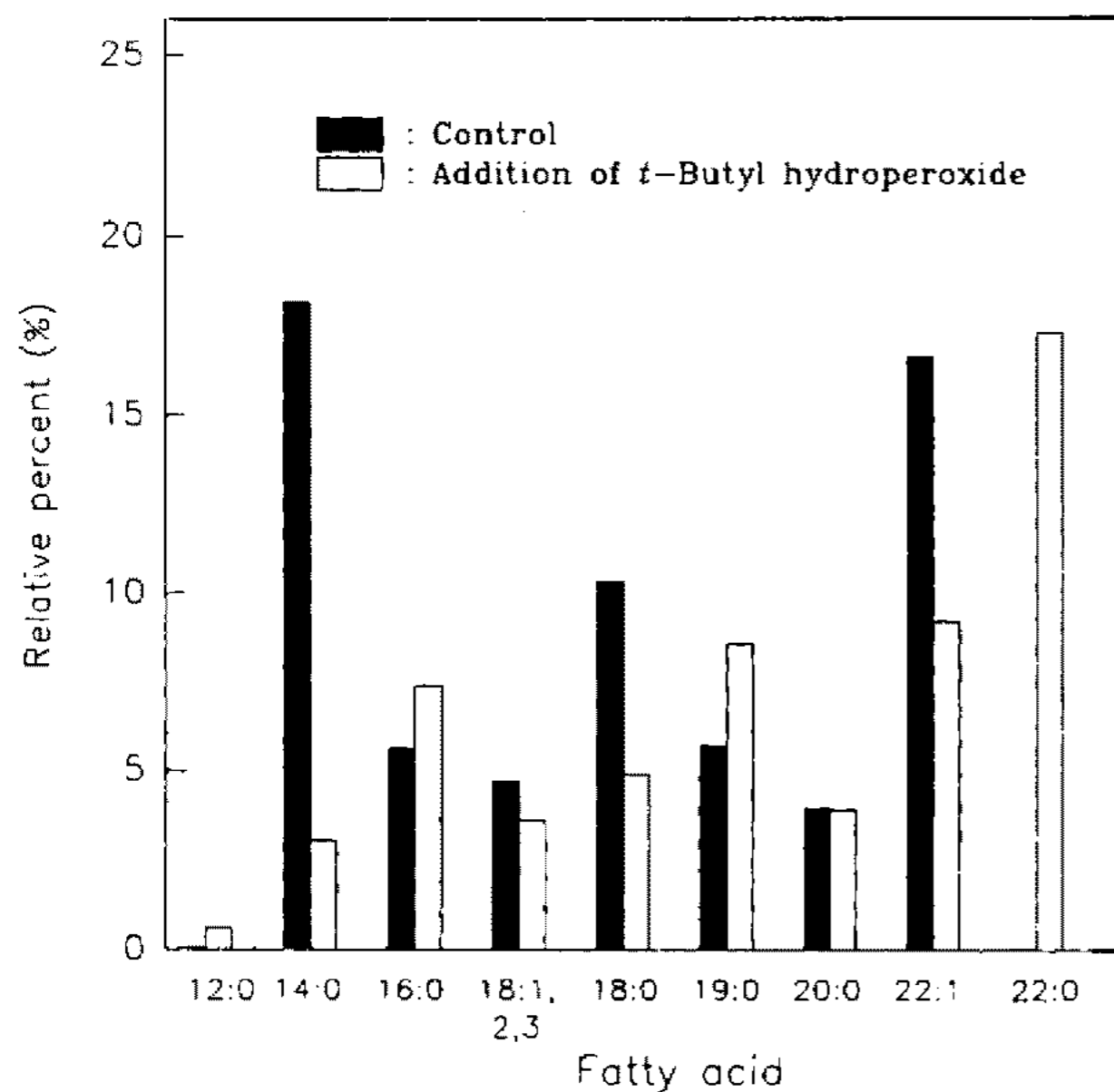


Fig. 8. Change in fatty acid composition of *H. pylori* membrane with or without 2.0 μM BHP. Cells were harvested after 40 hours culture.

는 방법으로 대처하고 있음을 알 수 있다. 즉 *H. pylori*는 외부의 나빠진 환경에 대한 방어작용으로 세포내의 대사 경로의 변화나 세포막 지방산의 조성 변화를 유발하게 되고, 이것이 형태 변화로 까지 이어진다고 볼 수 있겠다. 그러나 coccoid form으로 변환된 *H. pylori*가 위장내에서 항생제나 여러가지 면역세포의 방어작용에 대해 좀 더 잘 견딜수 있는 안전한 형태이고, 이것이 치료후에도 죽지않고 남아 있다가 위궤양과 같은 질병의 재발에 관여하는지에 대해서는 앞으로 더 많은 연구에서 밝혀져야 할 것이다.

요 약

*H. pylori*는 위·십이지장궤양의 원인균으로 알려져 있으며 이러한 궤양의 치료에 있어서 *H. pylori*의 제거가 필수적이라는 것이 많은 학자들의 공통된 견해이다. 그러나 *H. pylori*는 항생제를 포함한 환경적 스트레스에 대해 bacillary형태에서 coccoid 형태로의 변화를 통하여 방어 및 내성을 갖는 것으로 알려졌다. 본 연구에서는 배양시간, pH 변화, 활성산소등이 *H. pylori*의 형태 변화 및 세포막의 지방산 조성에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과, 배양시간이 60시간 이상이 되면서 서서히 형태 변화가 관찰되었으며, 생육에 적합한 pH의 범위를 벗어날 경우 균의 성장억제 및 급속한 형태 변화가 관찰되었다. 활성산소를 증가시키는 *t*-butyl hydroperoxide를 배양액에 첨가할 경우에도 첨가한 시점을 기준으로 균의 성장이 현저히 감소하였고 동시에 형태변화도 빠르게 발생하였다. 이러한 형태 변화시 세포막을 구성하는 지방산 조성 변화는 공통적으로 불포화도는 감소하면서 포화도는 증가하였다. 특히 포화지방산의 변화중에서 cyclopropano-nonadecanoic acid(C₁₉, 19:0)의 증가가 두드러졌으며 이것이 형태 변화에 많은 영향을 줄것으로 예상되며 불포화지방산의 변화중에는 oelic acid, linoleic acid (C₁₈, 18:1,2)의 감소가 pH 및 활성산소에 대한 방어적 변화로 사료된다.

감사의 말

본 논문은 교육부 생물화공 연구비 및 건국대학교 학술진흥 연구비의 지원을 받아 수행되었습니다.

참고문헌

- Warren, J. R., B. Marshall. 1983. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis *Lancet* i: 1273-1275.
- Martin J. Blaser. 1992. Hypotesis on the pathogenesis and natural histoy of *Helicobacter pylori*-induced inflammation *Gastroenterology* **102**: 720-727.
- Martin J. Blaser. 1990. *Helicobacter pylori* and the pathogenesis of gastroduodenal inflammation *J. Infect. Dis.* **161**: 626-633.
- Martin J. Blaser. 1987. Gastric *Campylobacter*-like organisms, gastritis, and peptic ulcer disease *Gastroenterology*. **93**: 371-383.
- Buck, G. E., K. A. Parshall and C. P. Davis. 1986. Relation of *Campylobacter pyloridis* to gastritis and peptic ulcer *J. Infect. Dis.* **153**: 664-669.
- Jiang, S. J., M. K. Chan. 1987. *Campylobacter*-like organisms in chronic gastritis, peptic ulcer and gastric carcinoma *Scand. J. Gastroenterol.* **22**: 553-558.

7. Mohammed, B., B. Philippe and Q. Nathalie. 1996. Changes in *Helicobacter pylori* ultrastructure and antigens during conversion from the bacillary to the coccoid form *Infect. Immun.* **64**(6): 2331-2335.
8. Catrenich, C. E., K. M. Makin. 1991. Characterization of the morphologic conversion of *Helicobacter pylori* from bacillary to coccoid forms *Scand. J. Gastroenterol.*, **26 Suppl 181**: 58-64.
9. Chan, W. Y., P. K. Hui, K. M. Leung, C. John and C. S. Ng. 1994. Coccoid forms of *Helicobacter pylori* in the human stomach *Am. J. Clin. Pathol.* **102**: 503-507.
10. Cellini, L., N. Allocati. 1994. *Helicobacter pylori*: a fickle germ *Microbiol. Immunol.* **38**: 25-30.
11. Moshkowitz, M., A. Gorea, N. Arber, F Konikoff, S. Berger and T. Gilat. 1994. Morphological transformation of *Helicobacter pylori* during prolonged incubation: Association with decreased acid resistance *J. Clin. Pathol.* **47**: 172-174.
12. West, A. P., M. R. Millar. 1990. Survival of *Helicobacter pylori* in water and saline *J. Clin. Pathol.* **43**: 609.
13. Jones, D. M., A. Currey. 1990. The genesis of coccal form of *Helicobacter pylori*. In: Malfertheiner P., Dischuneit H.(ed): *Helicobacter pylori*, gastritis and peptic ulcer *Springer-Verlag, Berlin.* 29-37.
14. Bruce A. Freeman, James D. Crapo. 1982. Biology of disease: Free radicals and tissue injury *Laboratory Investigation.* **47**(5): 412-426.
15. Bode, G., F. Mauch and P. Malertheiner. 1993. The coccoid forms *Helicobacter pylori*. Criteria for their viability *Epidemiol. Infect.* **111**: 483-490.
16. Turfano, M. A., F. Rossno. 1994. Immunological activities of *Helicobacter pylori* porins *Infect. Immun.* **62**: 1392-1399.
17. Fan, X. G. 1996. *Helicobacter pylori* increases proliferation of gastric epithelial cells *Gut.* **38**: 19-22.
18. Axon, A.T.R. 1994. The role of acid inhibition in the treatment of *Helicobacter pylori* infection *Scand. J. Gastroenterol.* **29 Suppl 201**: 16-23.
19. Cellini, L., N. Allocati, D. Angelucci, T. Lezzi and E. D. Campil. 1994. Coccoid *Helicobacter pylori* not *in vitro* reverts in mice *Microbiol. Immunol.* **38**(11): 843-850.
20. Sorberg, M., M. Nilsson and H. Hanberger. 1996. Morphologic conversion of *Helicobacter pylori* from bacillary to coccoid form *Eur. J. Microbiol. Infect. Dis.* **15**: 216-219.
21. Mai, U., G. Geis, and H. Leying. 1989. Dimorphism of *Campylobacter pylori*. In: F. Megraud, H. Lamouliatte, eds. *Gastrointestinal pathology and Campylobacter pylori* Elsevier Science Publishers, Amsterdam. 29-33.
22. Shamat, M., M. Mai. 1990. Survival of *Helicobacter pylori* in the environment (Abstract I 101) *Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol.*
23. Buck, G. E., K. A. Parshall and C. P. Davis. 1983. Electron microscopy of the coccoid form of *Campylobacter jejuni* *J. Clin. Microbiol.* **18**: 420-421.
24. Moran, A. P., M. E. Upton. 1986. A comparative study of the rod and coccoid forms of *Campylobacter jejuni* ATCC 29428 *J. Appl. Bacteriol.* **60**: 103-110.
25. Christie, W. W. 1990. Lipid analysis *Pergamon Press 2nd edition.* 1-6.
26. Khulusi, S., H. A. Ahmed, P. Patel, M. A. Mendel and T. C. Northfield. 1995. The effects of unsaturated fatty acids on *Helicobacter pylori* *in vitro* *J. Med. Microbiol.* **42**: 276-282.
27. Veerkamp, J. H. 1971. Fatty acid composition of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains *J. Bacteriol.* **108**(2): 861-867.
28. Sjostrom, J. E., H. Larsson. 1996. Factors affecting growth and antibiotic susceptibility of *Helicobacter pylori*: effect of pH and urea on the survival of a wild-type strain and a urease-deficient mutant *J. Med. Microbiol.* **44**: 425-433.
29. Goodwin, C. S., J. A. Armstrong. 1990. Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **9**(1): 1-13.
30. Martin J. Blaser. 1996. The bacteria behind ulcers *Scientific American.* 104-107.
31. Catherine C. McGowan, Timothy L. Cover and Martin J. Blaser. 1996. *Helicobacter pylori* and gastric acid: Biological and therapeutic implication *Gastroenterology.* **110**: 926-938.
32. Unge, P., A. Gad. 1989. Does omeprazole improve antimicrobial therapy directed towards gastric *Campylobacter pylori* in patients with antral gastritis? *Scand. J. Gastroenterol.* **24**: 49-54.
33. Biasco, G., M. Migholi. 1989. Omeprazole, *Helicobacter pylori*, gastritis and duodenal ulcer *Lancet.* **1**: 1403.
34. Beil, W., C. Birkholz, and S. Wagner. 1994. Interaction of *Helicobacter pylori* and its fatty acids parietal cells and gastric H⁺/K⁺-ATPase *Gut.* **35**: 1176-1180.
35. Barry, H., M. C. John. 1984. Review article: Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease *Biochem. J.* **219**: 1-14.
36. Minito, G., S. D. Aust. 1993. Redox cycling of iron and lipid peroxidation *Lipid.* **27**(3): 219-226.
37. Yagi, K. 1976. A simple fluorometric assay for lipid-peroxide in blood plasma *Biochem. Med.* **15**: 212-216.

(Received 16 December 1997)