

代謝・排出の影響をすべて排除できる。*H. pylori*陽性例の胃内腔¹³CO₂は10~15,000‰と、呼気よりも著しく高値であり、*H. pylori*陰性例との鑑別は容易であった。

一方、尿素と口腔内細菌との接触を避けるために、尿素をカプセルあるいは錠剤として飲用させる方法が試みられ、効果をあげている^{8)~9)}。われわれも、粉末の尿素をオブラートに包んで飲用させるオブラート法を試みたところ、この単純な工夫で、口腔内細菌の影響は大きく軽減された。

内視鏡を用いた方法では、*H. pylori*陰性例の胃内腔においても、1~9‰程度の¹³CO₂発生がみられる場合があった。これは、内視鏡先端に口腔内細菌が付着して、胃内腔へ入り込み胃内腔で¹³CO₂を発生させる場合、あるいは口腔内から食物とともに流入して胃内腔に長時間存在する口腔内細菌による可能性が考えられる。つまり、内視鏡を用いて呼気試験をおこなっても、口腔内細菌の影響を完全に除去することは困難と思われた。

3. 呼気採取経路の変更

上記のような基礎的検討から、口腔内で発生した¹³CO₂ガスが呼気に混入することが、口腔内細菌が呼気試験に影響を与えるお主な機序と考えられた。この場合、投与経路を変更するよりも、採取経路を変更できれば、口腔内での¹³CO₂の発生にかかわらず、口腔内細菌の影響を軽減できる可能性がある。図4に示すように、*H. pylori*陰性例では口腔内だけに¹³CO₂が存在し、*H. pylori*陽性例では口腔内に加え、胃内腔で発生した¹³CO₂が肺へ到達して呼気に排出されるため、鼻腔内も¹³CO₂が存在することになる。そこで、経鼻的に呼気を採取すると、口腔内で発生する¹³CO₂が呼気検体へ混入することは、きわめて少量になるものと考えられる。

われわれは鏡検で*H. pylori*感染が診断された*H. pylori*陽性42例、陰性85例について、尿素100mg溶解液100mlを飲用後に、経鼻的および経口的に呼気を経時的に採取し検討した。経口的に採取する通常のUBTでは*H. pylori*陰性例においても10分値までは平均3‰以上であり、*H.*

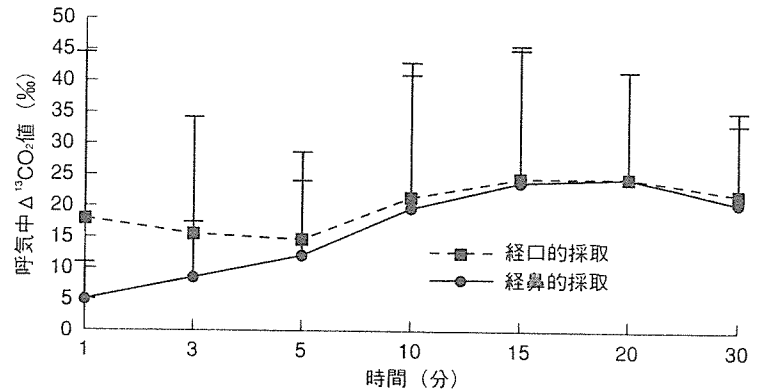


図8. *H. pylori*陽性例における経口的採取と経鼻的採取による呼気中¹³CO₂濃度の違い

(筆者作成)

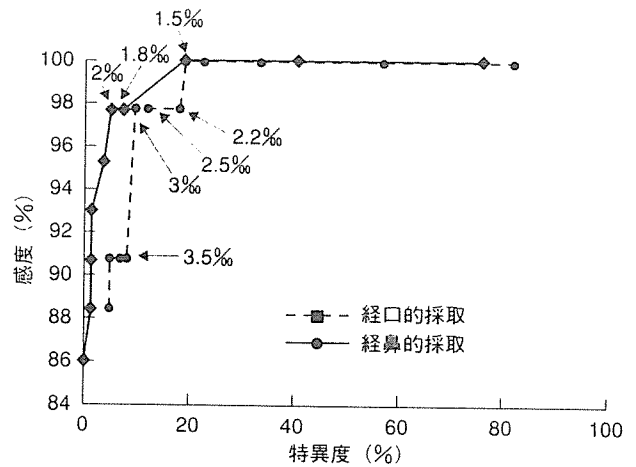


図9. 呼気15分値でのカットオフ値

経口的採取では3‰、経鼻的採取では2‰であった。

(筆者作成)

*pylori*感染診断は15分以降でなければならないことがわかる(図5)。また、経口的採取法と経鼻的採取法では15分で差はなくなった(図6)。一方、経鼻的呼気採取法では1分後から*H. pylori*陽性例で有意に呼気中¹³CO₂が高値となっていた(図7)。また、*H. pylori*陽性例においても、尿素飲用早期には経口的採取法では高値となり、15分後で経鼻的採取法と同等となっていた(図8)。

4. カットオフ値への影響

以上から鏡検をgold standardとして、receiver operating characteristic (ROC) 曲線を作成してUBTのカットオフ値を15分値で検討した。経口的採取法ではカットオフ値3‰が最適であり、感度97.7%、特異度

95.2%であった。経鼻的採取法では2%で感度97.7%、特異度90.5%であった(図9)。

おわりに

UBT早期の呼気中¹³CO₂上昇は、口腔内で発生した¹³CO₂が、経口的に採取される呼気中に混入することが主因である。投与方法を変更しても飲用時に口腔内細菌が胃内へ流入する可能性は否定できず、また内視鏡を用いても挿入の際に口腔内細菌が付着する可能性も否定できない。しかし、呼気採取経路を経鼻的に変更するだけで、その影響はきわめてわずかとなった。



文献

- 1) Ohara S, Kato M, Asaka M *et al* : Studies of ¹³C-urea breath test for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in Japan. *J Gastroenterol* 33 : 6-13, 1998
- 2) Savarino V, Vigneri S, Celle G : ¹³C-urea breath test in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 45 : 118-122, 1999
- 3) Perri F, Ricciardi R, Merla A *et al* : Appropriateness of urea breath test : a prospective observational study based on Maastricht 2000 guideline. *Aliment Pharmacol Ther* 16 : 1443-1447, 2002
- 4) Marshall BJ, Plankey MW, Hoffman SR A *et al* : A 20-minute breath test for *Helicobacter pylori*. *Am J Gastroenterol* 86 : 438-445, 1991
- 5) Suto H, Azuma T, Ito S *et al* : A trial of ¹³C-urea breath test combined with endoscopic phenol red test for detection of *Helicobacter pylori* infection. *Dig Endosc* 9 : 283-289, 1997
- 6) Isomoto H, Inoue K, Shikuwa S *et al* : Five minute endoscopic urea breath test with 25 mg of ¹³C-urea in the management of *Helicobacter pylori* infection. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 14 : 1093-1100, 2002
- 7) Urita Y, Miki K : Endoscopic ¹³C-urea breath test. *Dig Endosc* 12 : 29-32, 2000
- 8) Hamlet A, Stage L, Lonroth H *et al* : A novel tablet-based ¹³C-urea breath test for *Helicobacter pylori* with enhanced performance during acid suppression therapy. *Scand J Gastroenterol* 34 : 367-374, 1999
- 9) Wong WM, Lam SK, Lai KC *et al* : A rapid-release 50-mg tablet-based ¹³C-urea breath test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther* 17 : 253-257, 2003

ポスターセッション

食餌摂取による呼気中水素・メタンガス濃度の変動

東邦大学 大森病院 消化器内科

瓜田純久，日毛和男，鳥居尚隆
 菊池由宣，神田映子，倉形秀則
 笹島雅彦，松崎浩司，三木一正

〔緒言〕

呼気中水素・メタンガス濃度は消化管発酵反応の指標として多くの報告がある^{1,2,3)}。ラクチュロース負荷により呼気中水素ガスを測定する方法⁴⁾が一般的であるが、空腹時における呼気中水素・メタンガスも消化管における気体発生を反映する重要な指標と考えられている¹⁾。呼気中水素ガス濃度は食餌の影響を受けるが、メタンガス濃度は食餌の影響を受けないと報告されている^{3,5)}。そこで、今回空腹時の水素ガス濃度の再現性、および食餌負荷によるメタンガス濃度の再現性について検討した。

〔対象と方法〕

1. 空腹時呼気中水素・メタンガスの再現性

健常ボランティア34例（年齢 38.0 ± 12.9 才，男女比11：23）について早朝空腹時に呼気を15分間隔で2度採取し、呼気中水素・メタンガスの変化を検討した。15分間は坐位を保ち、歩行も禁止した。

2. 同一人における呼気中水素メタンガス濃度の変化

健常ボランティア9例について、1～2週間隔で早朝空腹時に呼気を6度採取し、水素・メタンガスの変化を検討した。

3. 内視鏡検査による変化

抗コリン剤筋注後、プロナーゼ、ガスコンドロップ服用後、咽頭麻酔下で上部内視鏡検査を施行した519例（年齢 62.0 ± 15.2 才，男女比

208：311）について、内視鏡施行前後で呼気を採取し、水素・メタンガスの変化を検討した。

4. 糖負荷による変化

75g糖負荷試験を行った糖尿病患者24例について、75g糖負荷前、5分、10分、15分、20分、30分、40分、50分、60分、70分、80分、90分、100分、110分、120分後に呼気を採取し、水素・メタンガス濃度の変化を検討した。

5. 液状試験食による変化

200kcal (200ml)の流動食を飲用した34例について、流動食飲用前、飲用後5分、10分、15分、20分、30分、40分、50分、60分、75分、90分、105分、120分、135分、150分、165分、180分、

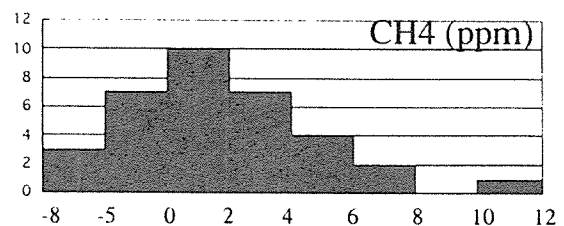
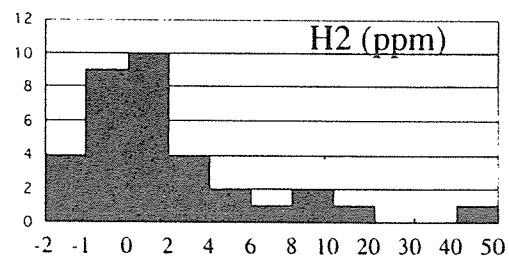


Figure1 空腹時呼気中水素・メタンガス濃度の再現性

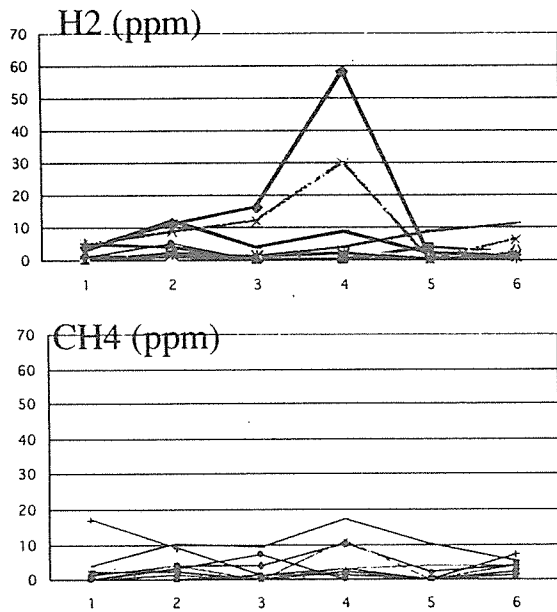


Figure 2 同一人物における空腹時呼気中水素・メタンガス濃度の変化

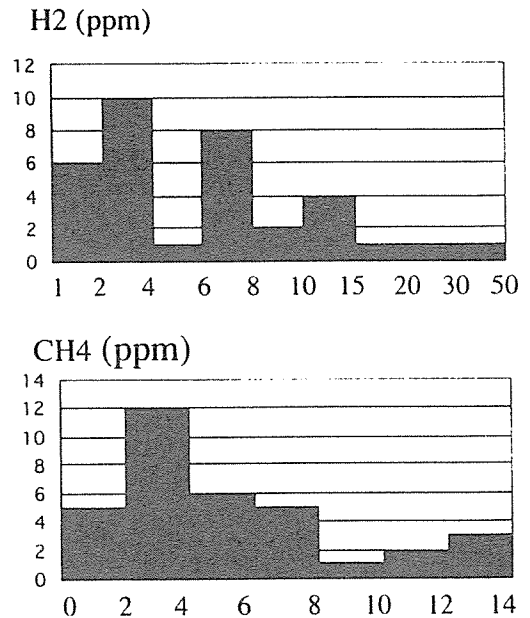


Figure 4 液状食摂取による呼気中水素・メタンガス濃度の変化

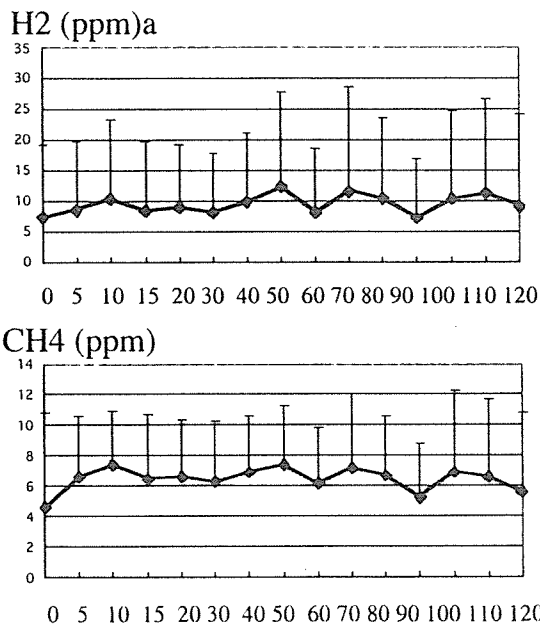


Figure 3 75gブドウ糖負荷による呼気中水素・メタンガス濃度の変化

210分、240分に呼気を採取し、呼気中水素・メタンガス濃度の変化を検討した。

【結果】

1. 空腹時呼気中水素・メタンガスの再現性 (Figure1)

15分間隔で呼気中水素ガスが±3ppm以上変化したのは11例(32%)、メタンガス17例(50%)

であり、最大差は水素42ppm、メタン11ppmであった。

2. 同一人における呼気中水素・メタンガス濃度の変化 (Figure2)

1~2週間隔で6回採取した呼気において、水素ガスは2~57ppm、メタンガス1~17ppmの変化がみられた。

3. 内視鏡検査による変化

内視鏡検査後、呼気中水素ガス濃度が3ppm以上増加したのは5例(1%)、メタンガス61例(12%)、3ppm以上減少したのは水素ガス90例(17%)、メタンガス44例(8%)であった。

4. 糖負荷による変化 (Figure3)

75g糖負荷後、メタンガス 5.9 ± 4.2 ppm (4~26ppm)、水素ガス 8.8 ± 12.9 ppm (0~61ppm)上昇した。減少例はなかった。

5. 液状食摂取による変化 (Figure4)

200kcal (200ml)の液状食負荷後、呼気中メタンガス 5.6 ± 3.6 ppm (1~14ppm)、呼気中水素ガス 7.7 ± 8.1 ppm (1~42ppm)上昇した。

【考案】

呼気中水素ガス濃度は水素産生菌と水素を消費する細菌とのバランスにより変化することが

知られている^{6,7)}。メタン産生菌が発酵反応によりメタンを産生する際、水素を消費するため、呼気中水素・メタンガス濃度は負の相関があることが報告されている⁸⁾。一方、水素ガス濃度は食餌摂取により大きく変化するが、メタンガス濃度はほとんど変化しないと考えられていた。しかし、H₂-producing bacteriaが食餌摂取により多量の水素を産生した場合、H₂-consuming bacteriaであるメタン産生菌はその水素からメタンを産生する可能性が大きい。即ち、メタンも食餌摂取によりある程度変化すると思われたが、今回の結果ではブドウ糖負荷、液状食負荷により、最大26ppm上昇した。

空腹時水素・メタンガス濃度の15分間隔での再現性、1-2週間隔での再現性は低く、腸管内容物のわずかな移動、前日の食餌が大きく影響するものと考えられる。基質を投与せずに腸管に物理的刺激を与える内視鏡検査後でも3ppm以上の増加は水素5例(1%)、メタン61例(12%)であり、投与した基質が腸管へ到達する前にも水素ガスが産生される可能性が示唆され、前日の食事内容が影響するものと考えられた。呼気中水素・メタンガスを測定する各種呼気試験は、炭水化物や糖質の消化吸収障害やbacterial overgrowthの診断に用いられている。その際、前値や早期の変動が必ずしも負荷食の消化吸収障害を反映していない可能性もあり、注意が必要と思われた。

〔文 献〕

- 1) Perman JA, Modler S, Barr RG, et al. Fasting breath hydrogen concentration: normal values and clinical application. *Gastroenterology* 1984;87:1358-63.
- 2) Bond JH, Levitt MD. Use of pulmonary hydrogen (H₂) measurements to quantitate carbohydrate absorption. *J Clin Invest* 1972; 51: 1219-25.
- 3) Bond JH, Engel RR, Levitt MD. Factors influencing pulmonary methane excretion in man. *J Exp Med* 1971; 133: 572-88.
- 4) Rhodes JM, Middleton P, Jewell DP. The lactulose hydrogen breath test as a diagnostic test for small-bowel bacterial overgrowth. *Scand J Gastroenterol* 1979; 14: 333-6.
- 5) Pitt P, De Bruijck KM, Beeching MF, et al. Studies on breath methane: the effect of ethnic origins and lactulose. *Gut* 1980; 21: 941-9.
- 6) Strocchi A, Levitt MD. Factors affecting hydrogen production and consumption by human fecal flora. The critical roles of hydrogen tension and methanogenesis. *J Clin Invest* 1992; 89: 1304-11.
- 7) Levitt MD, Berggren T, Hastings J, et al. Hydrogen (H₂) catabolism in the colon of the rat. *J Lab Clin Med* 1974; 84: 163-7.
- 8) Corazza GR, Strocchi A, Sorge M, et al. Prevalence and consistency of low breath H₂ excretion following lactulose ingestion. Possible implications for the clinical use of H₂ breath test. *Dig Dis Sci* 1993; 38: 2010-6.

Reproducibility of fasting breath hydrogen and methane concentrations and factors affecting their values.

Yoshihisa Urita, Kazuo Hike, Naotaka Torii, Yoshinori Kikuchi,
Eiko Kanda, Hidenori Kurakata, Masahiko Sasajima,
Hiroshi Matsuzaki, Kazumasa Miki.

*Division of Gastroenterology and Hepatology, Toho University School of Medicine,
Omori Hospital, Tokyo.*

Abstract

Breath hydrogen (H₂) and methane (CH₄) measurements are widely used to detect carbohydrate malabsorption and bacterial overgrowth. As the volume of H₂ available for excretion represents the balance between H₂-producing and H₂-consuming bacterial reaction, several studies reported a negative correlation between breath H₂ and negative correlation between breath H₂ and CH₄ excretion. The aim of this study is to evaluate the reproducibility of fasting breath hydrogen and methane concentrations and factors affecting their values. When collecting breath samples at 15-minute intervals, H₂ levels changed more than 3 ppm in 32% and CH₄ levels changed markedly following endoscopy and ingestion of 75g glucose and liquid test meals. These results suggested that various factors, such as meals of the day before the test, may affect fasting breath CH₄ levels as well as H₂ levels. We have to take the influence of meals on the breath H₂ and CH₄ levels into consideration when H₂ or CH₄ breath tests are carried out.

萎縮性胃炎の進展と牛乳摂取

瓜田 純久 日毛 和男 鳥居 尚隆
 菊池 由宣 倉形 秀則 笹島 雅彦
 神田 映子 三木 一正

東邦大学大森病院消化器内科

要旨：*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) 除菌治療の有効率は80%程度であり、副作用を減らし治療効果を上げるために、抗*H. pylori*作用を有するprobioticsの併用が試みられている。これまで、牛乳成分のラクトフェリンや κ カゼインには*H. pylori*発育阻止効果、接着阻止効果が知られている。そこで、萎縮性胃炎の進展、*H. pylori*感染と牛乳摂取との関連について検討した。各年齢層とも血清*H. pylori*抗体陽性率は牛乳摂取の有無により差はなかったが、喫煙群で感染率が60歳代で有意に高率であった。しかし、60歳代の喫煙者では牛乳摂取群と非摂取群とで*H. pylori*抗体陽性率に差はなかった。喫煙者、飲酒者では49歳以下において牛乳摂取群が血清PG 1/2比高値傾向を示した。1日200cc程度の牛乳摂取では、*H. pylori*感染および萎縮性胃炎の進展を抑制する効果は明らかではなかった。

Key words 牛乳, *Helicobacter pylori* 感染, 萎縮性胃炎

はじめに

萎縮性胃炎の大部分が*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) 感染が原因であることが明らかとなったが、*H. pylori*感染例においても萎縮が腸上皮化生へと進む症例と萎縮が加齢によってもほとんど進展しない症例がある¹⁾。菌株による違い、あるいは食生活、生活環境など他の要因が関与していることが示唆される。以前より疫学的検討において、牛乳摂取者に*H. pylori*感染が少なく^{2,3)}、さらに胃癌発生も少ないことが報告されている⁴⁾。そこで、今回われわれは牛乳摂取と*H. pylori*感染、さらに萎縮性胃炎との関連について検討した。

I. 対象と方法

血清抗*H. pylori* IgG抗体(ELISA: HM-CAP)を測定した40歳以上の3,232例を対象に、牛乳摂取の習慣、飲酒歴、喫煙歴についてアンケート調査を行った。1日200cc以上の牛乳を飲む場

合を牛乳摂取群、1日日本酒換算で1台以上を飲酒群、1日15本以上喫煙する場合を喫煙群とし、禁煙者および1日15本未満の喫煙者は対象から除外した。

さらに血清抗体が陽性であった2,322例中1,966例では血清ペプシノゲン(PG) 1, PG 2を測定し、萎縮性胃炎の程度を評価した。なお、血清抗体判定保留例は対象から除外した。

II. 結果

1. 本邦における牛乳摂取の習慣

牛乳摂取者は49歳以下225/694(32.4%)、50歳代288/770(37.4%)、60歳代348/865(40.2%)、70歳以上351/901(39.0%)と各年齢層で差はなかった(図1)。即ち、牛乳摂取の習慣はほぼ生涯を通じて継続していると思われる。

2. 牛乳摂取と*H. pylori*感染

各年齢層とも血清*H. pylori*抗体陽性率は牛乳摂取の有無により差はなかった(図2)。

3. 喫煙と*H. pylori*感染

喫煙と*H. pylori*感染については、各年齢層と

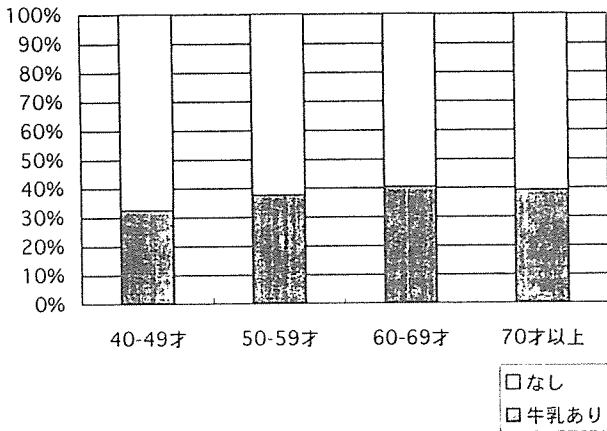


図1 各年齢層における牛乳摂取の習慣

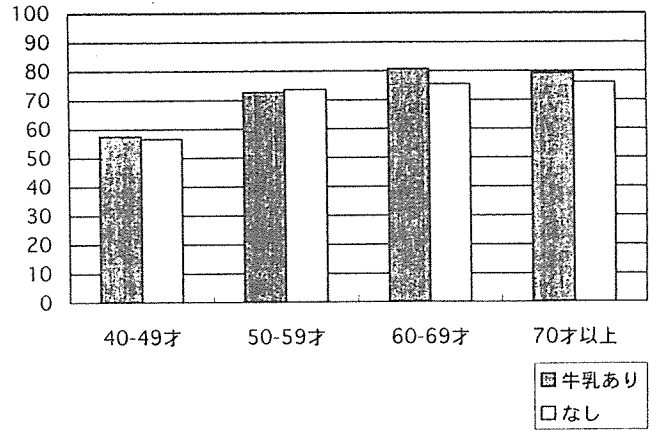


図2 各年齢層における牛乳摂取の有無と血清 *H. pylori* 抗体陽性率

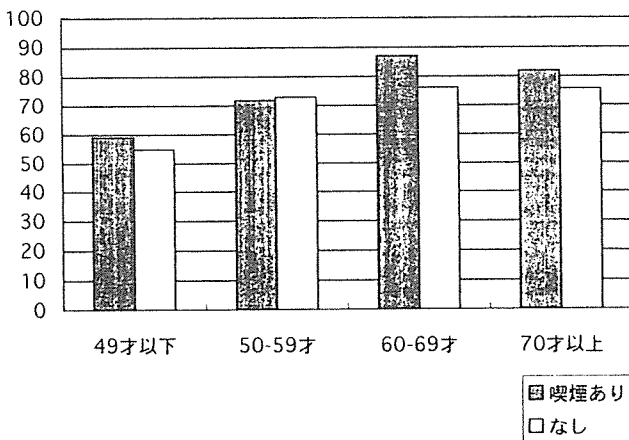


図3 各年齢層における喫煙の有無と血清 *H. pylori* 抗体陽性率

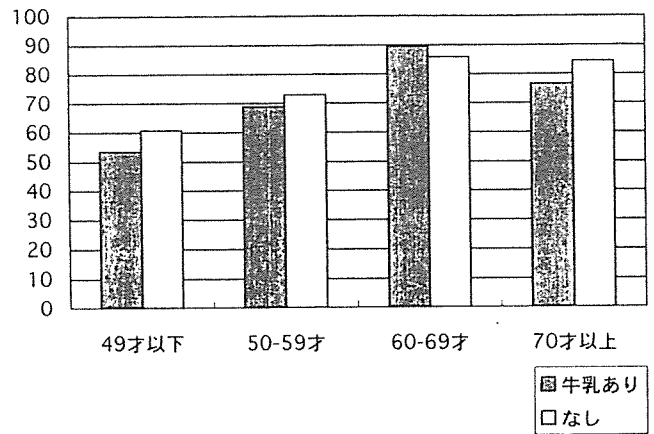


図4 喫煙者における牛乳摂取の有無と血清抗 *H. pylori* 抗体陽性率

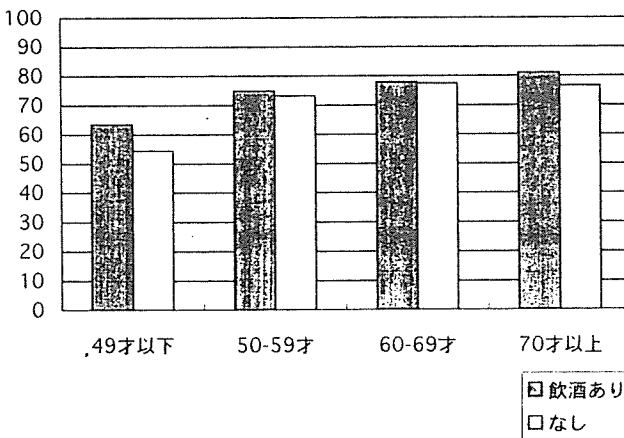


図5 各年齢層における飲酒歴と血清抗 *H. pylori* 抗体陽性率

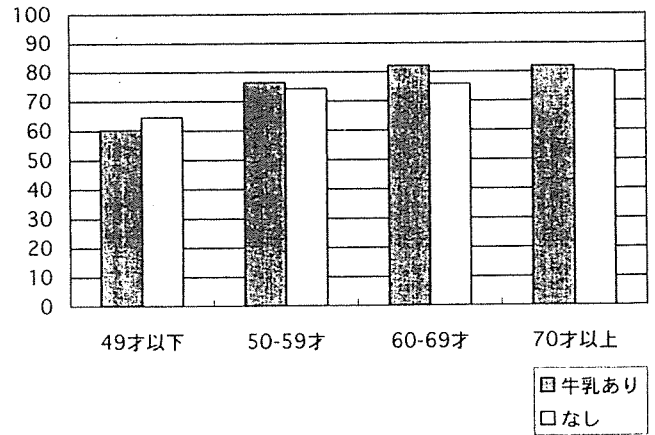


図6 飲酒習慣のある症例における牛乳摂取習慣と血清抗 *H. pylori* 抗体陽性率

も喫煙群で感染率が高く、60歳代で有意差 ($p=0.007$) がみられた (図3)。しかし、喫煙者を牛乳摂取の有無で分類し、*H. pylori* 感染陽性率を検

討すると、60歳代においても有意差はみられなかった ($p=0.58$) (図4)。

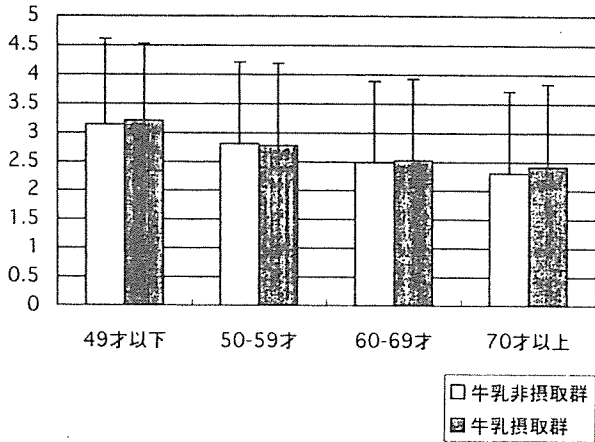


図7 *H. pylori* 陽性例における牛乳摂取の有無と血清 PG 1/2 比

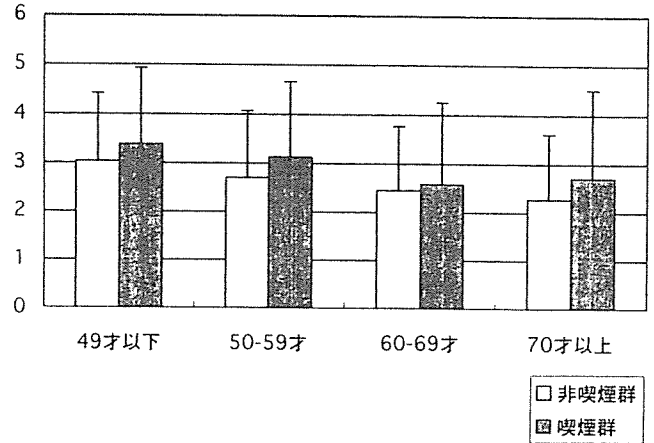


図8 *H. pylori* 陽性例における喫煙の有無と血清 PG 1/2 比

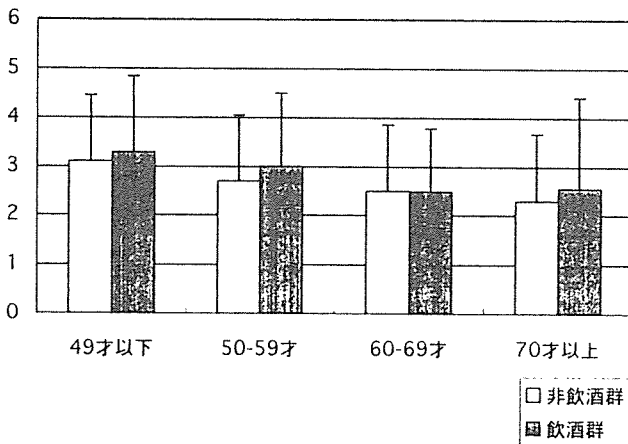


図9 *H. pylori* 陽性例における飲酒習慣の有無と血清 PG 1/2 比

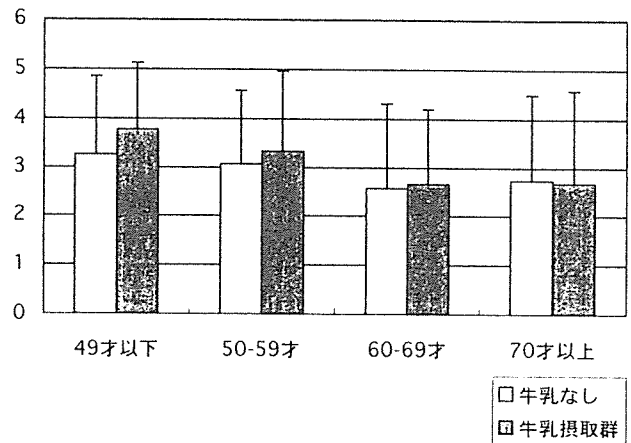


図10 喫煙者における牛乳摂取の有無と血清 PG 1/2 比

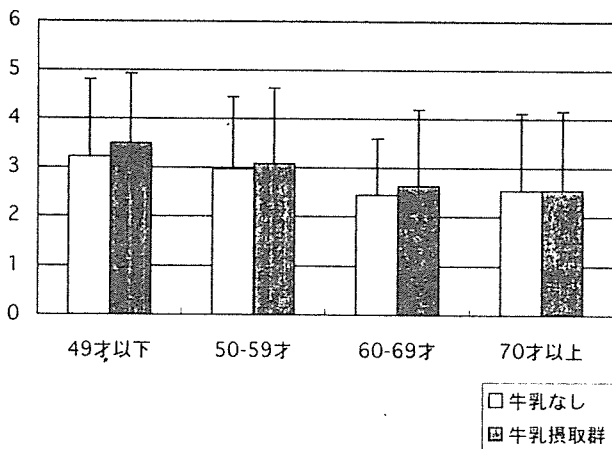


図11 飲酒者における牛乳摂取の有無と血清 PG 1/2 比

4. 飲酒と *H. pylori* 感染

各年齢層において飲酒の習慣の有無で検討したが、血清抗体陽性率に差はなく(図5)、飲酒群に

おいて牛乳摂取習慣と *H. pylori* 感染率に差はみられなかった(図6)。

5. 生活習慣と萎縮性胃炎

萎縮性胃炎の程度を血清 PG 1/2 比で評価し、牛乳摂取、喫煙、飲酒の習慣との関連について検討した(図7~9)。生活習慣の有無にかかわらず加齢とともに血清 PG 1/2 比は低下したが、牛乳摂取、喫煙、飲酒の習慣により差はなかった。

次に喫煙群、飲酒群において牛乳摂取の有無により血清 PG 1/2 比に変化があるかを検討した。喫煙者の49歳以下において牛乳摂取群が血清 PG 1/2 比高値傾向($p=0.13$)を示したが、高齢者では差はなかった(図10)。飲酒者においても同様の傾向を示した(図11)。

III. 考 察

本邦で認められているPPI+アモキシシリン+クラリスロマイシンによる*H. pylori*除菌治療の成功率は約80%であり、残りの症例は感染が持続する。2次除菌を行っても10%程度は感染が持続する⁵⁾。治療効果を上げるには薬物の投与量、種類を増やすことが必要であるが、逆に副作用も増加することになる。そこで副作用を増加させずに治療効果を上げることを目的として、probioticsなどの併用が報告されている^{6,7)}。

牛乳の成分ではラクトフェリンが*H. pylori*の発育を阻害すること^{8,9)}、 κ カゼインが*H. pylori*の胃粘膜への接着を阻害すること^{10,11)}が報告されている。しかし、今回の検討では牛乳摂取群と非摂取群で、*H. pylori*感染率に差はなかった。喫煙および飲酒期間が長い高齢者において、牛乳摂取による萎縮性胃炎の進展防止効果が期待されたが、萎縮性胃炎の程度を反映するとされる¹²⁾血清PG 1/2比に有意差はみられなかった。1日200cc程度の牛乳摂取では、*H. pylori*感染および萎縮性胃炎の進展に及ぼす影響は少なかった。

文 献

- 1) Kuipers EJ, Uytterlinde AM, Pena AS, et al : Long-term sequelae of *Helicobacter pylori* gastritis. *Lancet* 345 : 1525-1528, 1995
- 2) Goodman KJ, Correa P, Tengana AHJ, et al : Nutritional factors and *Helicobacter pylori* infection in Colombian children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 25 : 507-515, 1997
- 3) Russo A, Eboli M, Pizzetti P, et al : Determination of *Helicobacter pylori* seroprevalence among Italian blood donors. *Eur J Gastroenterol* 11 : 867-873, 1999
- 4) Alonso-Amelot ME, Avendano M : Possible association between gastric cancer and bracken fern in Venezuela : an epidemiologic study. *Int J Cancer* 15 : 252-259, 2001
- 5) Lee JM, Breslin NP, Hyde DK, et al : Treatment options for *Helicobacter pylori* infection when proton pump inhibitor-based triple therapy fails in clinical practice. *Aliment Pharmacol Ther* 13 : 489-496, 1999
- 6) Di Mario F, Aragona G, Dal Bo N, et al : Use of bovine lactoferrin for *Helicobacter pylori* eradication. *Dig Liver Dis* 35 : 706-710, 2003
- 7) Armuzzi A, Cremonini F, Bartolozzi F, et al : The effect of oral administration of *Lactobacillus GG* on antibiotic-associated gastrointestinal side-effects during *Helicobacter pylori* eradication therapy. *Aliment Pharmacol Ther* 15 : 163-169, 2001
- 8) Nakao K, Imoto I, Ikemura N, et al : Relation of lactoferrin levels in gastric mucosa with *Helicobacter pylori* infection and with the degree of gastric inflammation. *Am J Gastroenterol* 92 : 1005-1011, 1997
- 9) Diel EJ, Hall LR, Serna H, et al : Antibiotic properties of bovine lactoferrin on *Helicobacter pylori*. *Dig Dis Sci* 43 : 2750-2756, 1998
- 10) Hata Y, Kita T, Murakami M : Bovine milk inhibits both adhesion of *Helicobacter pylori* to sulfatide and *Helicobacter pylori*-induced vacuolation of vero cells. *Dig Dis Sci* 44 : 1696-1702, 1999
- 11) Hamosh M : Prospective function of proteins and lipids in human milk. *Biol Neonate* 74 : 163-176, 1998
- 12) Urita Y, Hike K, Torii N, et al : Serum pepsinogens as a predictor of the topography of intestinal metaplasia in patients with atrophic gastritis. *Dig Dis Sci* 49 : 795-801, 2004

特集I 呼気テストによる消化器疾患の病態診断

呼気試験による慢性胃炎の解析*

瓜田純久** 日毛和男**
鳥居尚隆** 菊池由宣**
倉形秀則** 神田映子**
笹島雅彦** 三木一正**

Key Words : atrophic gastritis, breath test, bacterial overgrowth, fermentation

萎縮性胃炎と消化管 bacterial overgrowth

はじめに

消化管内腔には多数の気体が存在し、その一部は吸収されて血液循環を介し、肺へ到達して呼気中へ排出される。呼気中に出現するガス成分は200種類以上にのぼる¹⁾が、消化管内腔で同定されている気体は少なく²⁾、ごく一部であると言わざるをえない。

消化管内腔のガスの起源をまとめると、図1のように大きく分類することができる。嚥下とともに内腔へ流入するとされる窒素(N₂)および酸素(O₂)、腸内細菌や口腔内細菌による発酵反応により生成される水素(H₂)、メタン(CH₄)、二酸化炭素(CO₂)、酸化還元反応によるCO₂、一酸化窒素(NO)、酵素反応によるCO₂、アンモニア(NH₃)、一酸化炭素(CO)などがあげられる。これらの気体が消化器疾患あるいは腹部症状の発症に関与しているかは明らかではない。慢性胃炎はdyspepsia症状を有する場合があり、今回、慢性胃炎症例について、呼気および消化管内腔の気体を解析し、慢性胃炎をとりまく消化管環境の変化について述べる。

Helicobacter pylori (*H. pylori*)が発見される前から、酸分泌の低下した症例では多くの細菌が胃内に存在することが報告されている³⁾⁴⁾。胃酸は胃および小腸での細菌増殖に防御的に作用しているため、萎縮性胃炎では酸分泌が低下し、上部消化管においてbacterial overgrowthが起こっている可能性が高い⁵⁾⁶⁾。増殖した細菌は嫌氣的に発酵反応により生命維持に必要なエネルギーを獲得する機会が多い。いかなる発酵反応においても水素、二酸化炭素が生成されるため、呼気中水素ガスは全消化管の発酵反応の指標と考えられ、空腹時の呼気中水素ガス濃度からもある程度、腸管でのbacterial overgrowthの有無を推定できる⁷⁾。しかし、呼気中水素ガスが消化管のどの部位から発生したのか同定することはできない。

ラクチュロース負荷による発酵部位の同定(図2)

大腸内視鏡検査を行った連続50例(平均年齢63.6 ± 10.1歳, 男女比26/24)を対象とし、腸管洗浄液ニフレック®2,000mlにラクチュロース12gを混入して2時間で飲用させ、15分間隔で4時間後まで呼気を採取し、呼気中水素濃度を呼気分析装

* Breath tests for the study on chronic gastritis.

** Yoshihisa URITA, M.D., Kazuo HIKE, M.D., Naotaka TORII, M.D., Yoshinori KIKUCHI, M.D., Hidenori KURAKATA, M.D., Eiko KANDA, M.D., Masahiko SASAJIMA, M.D. & Kazumasa MIKI, M.D.: 東邦大学医学部大森病院消化器内科[〒143-8541 東京都大田区大森西6-11-1]; Division of Gastroenterology and Hepatology, Toho University School of Medicine, Omori Hospital, Tokyo 143-8541, JAPAN

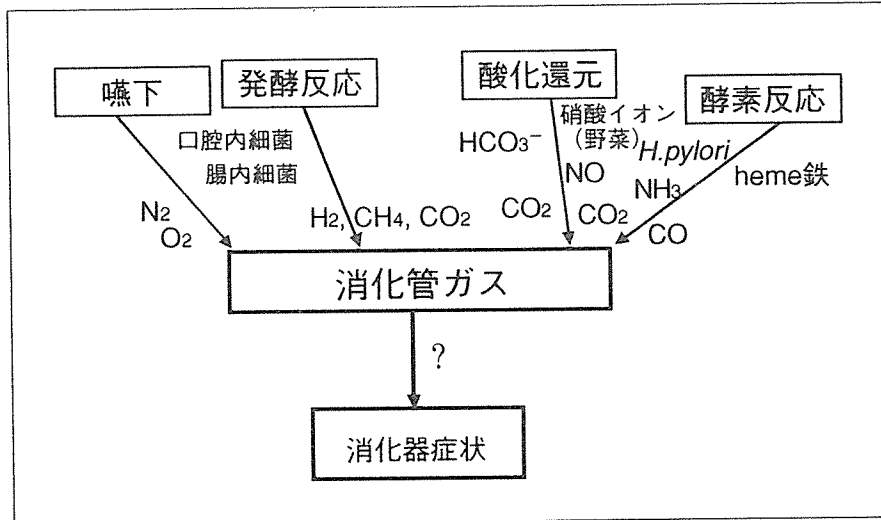


図1 消化管ガスの起源

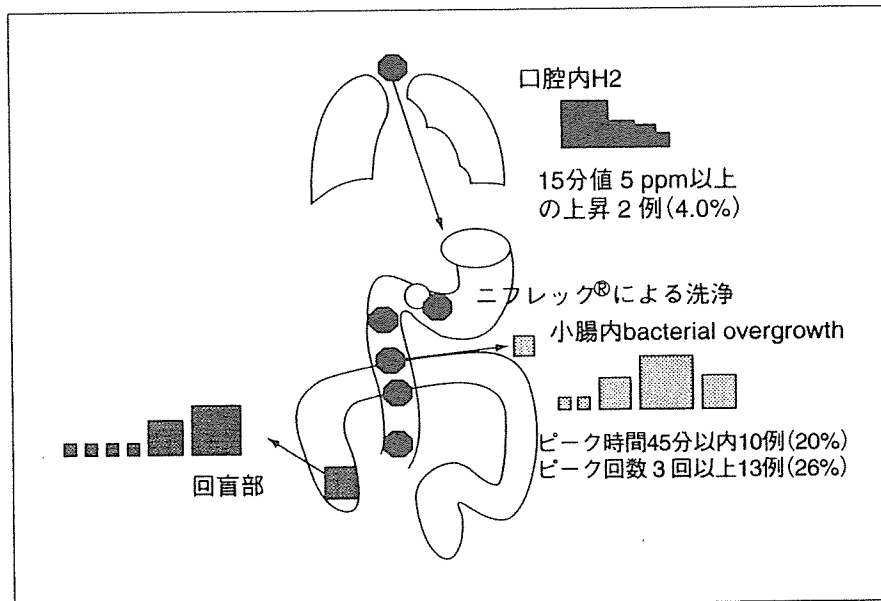


図2 ラクチュロース飲用後の呼気中水素ガス上昇

置TGA-2000(テラメックス社)で測定した⁸⁾。

呼気中水素ガス濃度がPEG飲用後5 ppm以上上昇した時間は、45分以内が8例(16%)あり、これらの症例では回盲部にPEGが到達する前に水素ガスが発生したものと考えられ、小腸でのbacterial overgrowthが示唆された。飲用後15分以内に呼気中水素ガスが5 ppm以上上昇した症例が2例(4%)存在し、口腔内細菌による水素産生が疑われた。また、呼気中水素ガス濃度のピークが3回以上出現した症例が13例(26%)あり、小腸でのbacterial overgrowthと考えられた。さらに発酵部位同定が困難な症例には、¹³C-acetate呼気試験を同時に施行すると、胃排出時間との

関連から同定が容易となる⁹⁾。

内視鏡を用いた発酵部位の同定

生体での水素ガスは発酵反応が唯一の起源であると考えられている¹⁰⁾。すなわち、胃内腔に水素発酵菌が存在する場合、食餌中の炭水化物を気質として発酵が生じ、水素ガスが生成されることになる。同様に上部小腸でbacterial overgrowthが起こった場合、十二指腸内腔の水素ガスが上昇することが推測される。そこで、内視鏡を用いて消化管内腔の気体を採取し、水素ガス濃度を測定し、発酵部位の同定を試みた。

萎縮性胃炎の指標を内視鏡的萎縮境界で示す

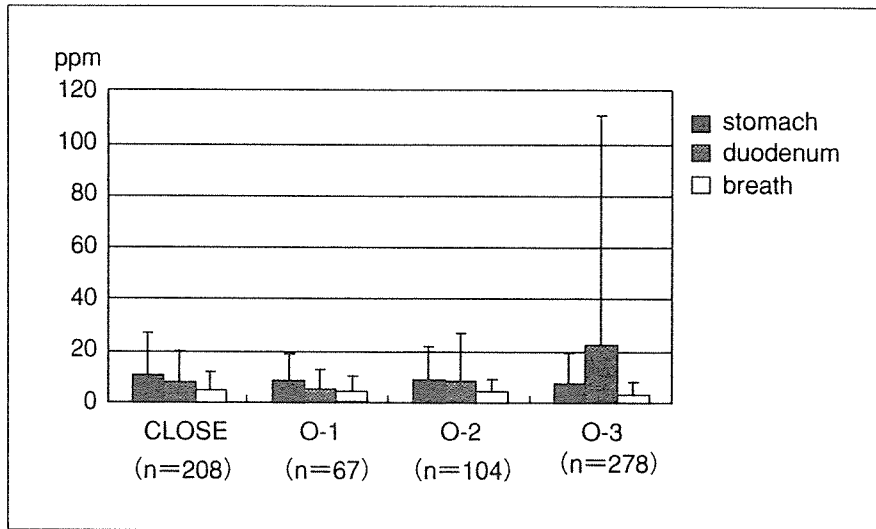


図3 萎縮性胃炎の進展と消化管内腔・呼気中水素ガスの変化

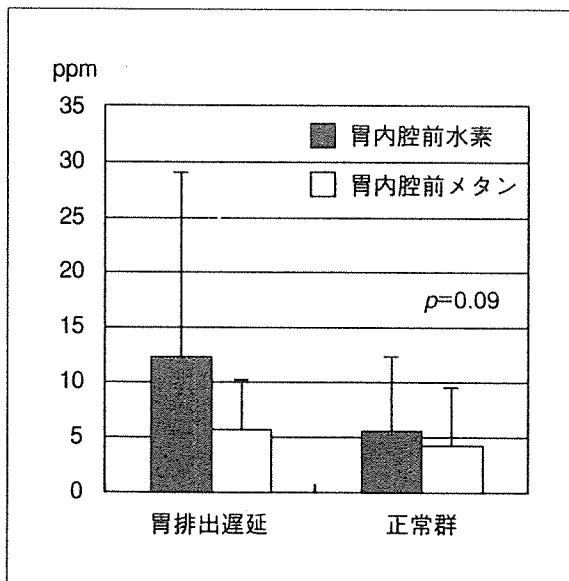


図4 胃排出速度と胃内腔水素・メタンガス濃度

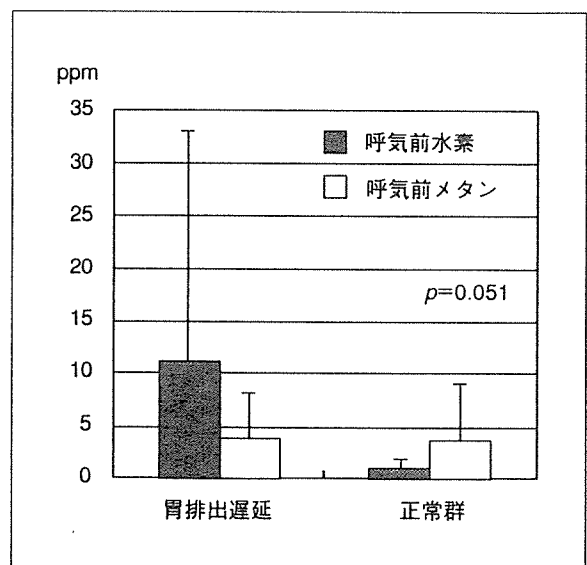


図5 胃排出速度と呼気中水素・メタンガス濃度

と、図3のように萎縮の進展したO-3型の症例で十二指腸内腔の水素ガスが高値であった。胃内腔および呼気中水素ガス濃度は萎縮の程度と差はなかった。以上から、萎縮性胃炎においては、胃内腔よりも小腸でのbacterial overgrowthが高率に起こっていると考えられる。

消化管運動とbacterial overgrowth

胃粘膜萎縮性変化のほかに、細菌と発酵気質(食餌)との接触時間が延長した場合、水素ガス発生が亢進すると予想される。¹³C-acetate呼気試験にて胃排出遅延群と正常群に分類し、胃内腔の水素・メタンガス濃度を比較すると、図4、図5

のように胃内腔および呼気中水素ガス濃度が胃排出遅延群で高値であった。すなわち、胃排出が遅延した場合、胃内腔での発酵反応が亢進するのみならず、全消化管において亢進していると考えられた。

食後の消化管ガス発生

消化管内腔におけるガス発生は、細菌が食餌中の発酵基質を発酵に利用することによる。そこで空腹時に消化管ガスが少ない症例でも、食後に大量のガスが発生して腹部膨満感を生じる場合が予想される。そこで、胃内腔に基質を供給し、水素ガスがどの程度発生するかを検討した¹¹⁾。

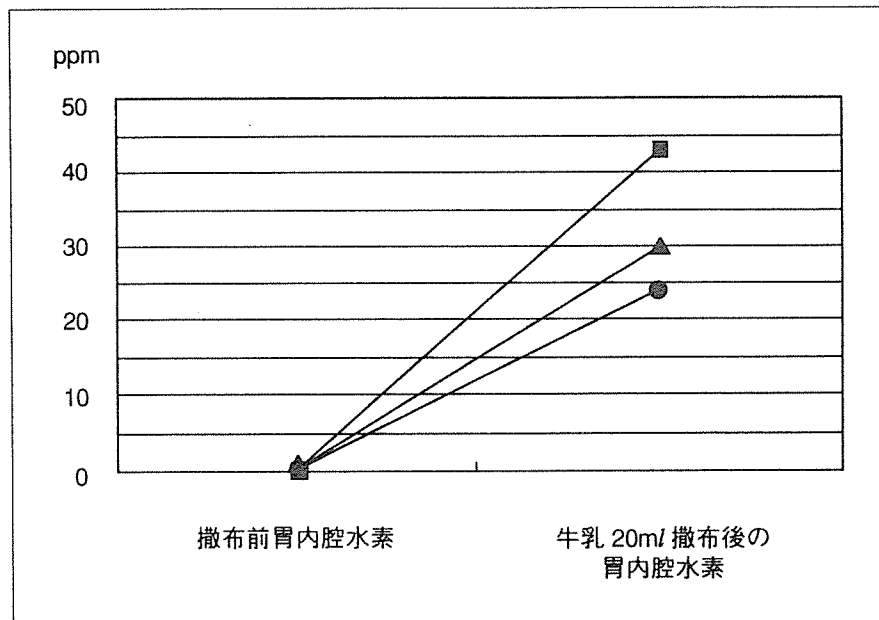


図6 普通牛乳散布による胃内腔水素ガス濃度上昇例

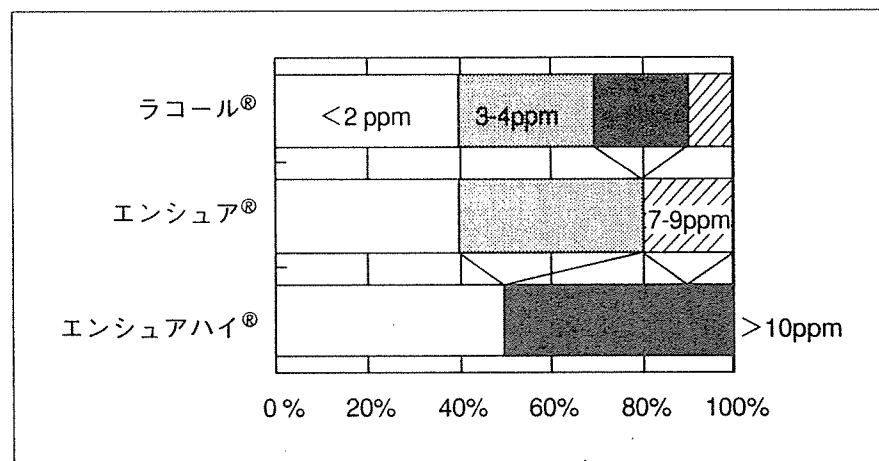


図7 液状食飲用後の呼気中水素ガス濃度の変化

内視鏡下にラクチュロース 6g を散布し、10～15秒後に胃内腔の気体を採取し、その中に含まれる水素ガス濃度の変化を検討した。256例中10例(3.9%)で 3 ppm 以上の上昇がみられた。また、カロリーメイト 20ml (20kcal, 糖質 3.3g, 脂質 0.44g, 蛋白質 0.67g, 繊維 0.2g) を散布した場合、91例中 9例(9.9%)、普通牛乳 20ml (13kcal, 糖質 0.9g, 脂質 0.67g, 蛋白質 0.6g, 繊維 0) では 55例中 3例(5.5%)で水素ガスの上昇がみられた(図6)。

食餌摂取による腸管内でのガス発生

胃内腔では通常の食餌をわずか 20ml 投与しただけでも、10%前後の症例で水素ガスが発生した。細菌の多い腸管内ではさらに高率にガスが

発生する可能性が高い。そこで、200ccの液状食を飲用後、経時的に240分まで呼気中水素ガス濃度を測定したところ、半数以上の症例で 3 ppm 以上の上昇がみられた(図7)。

消化管発酵生成物の消化管機能への影響

発酵反応では水素、二酸化炭素、短鎖脂肪酸が生成される。この短鎖脂肪酸には食後の一過性LES弛緩の増加、胃排出抑制などの作用があり、逆流性食道炎を惹起する可能性が報告されている¹²⁾。われわれの検討でも、逆流性食道炎群で呼気中水素あるいはメタンガスが 10ppm 以上の症例が、非食道炎群よりも有意に多かった(図8)。逆流性食道炎の発症には酸分泌、胃食道協調運動

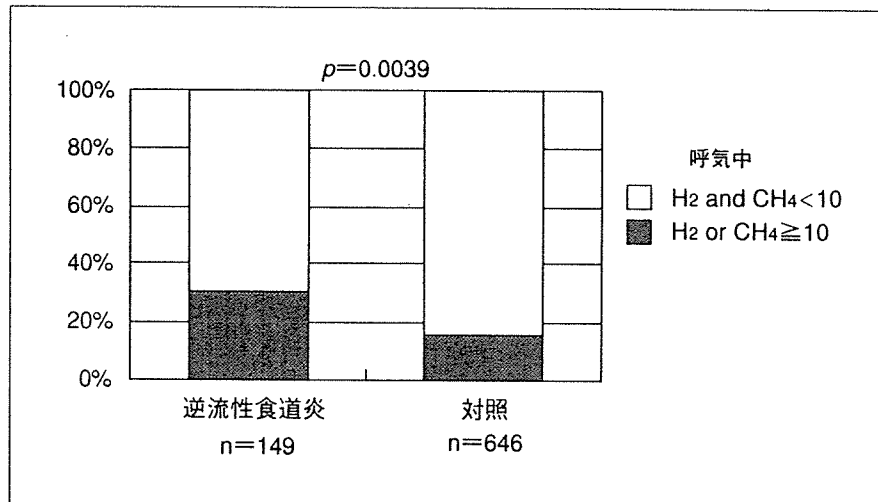


図8 逆流性食道炎と呼気中水素・メタンガス濃度

障害が重要であるが、一部の逆流性食道炎症例では消化管発酵が関与している可能性もある。

おわりに

慢性胃炎を取り巻く消化管環境の変化について、消化管発酵反応を中心に述べた。消化管内腔の細菌は*H. pylori*のように粘膜に接着して増殖しなければ病原性はほとんどないと考えられてきた。しかし、発酵生成物が消化管機能に影響を及ぼす可能性があり、胃内腔に持続的に流入する口腔内細菌など、いわゆる胃内通過菌においても消化器症状を惹起する可能性がある。萎縮性胃炎と消化器症状との関連は明らかではないが、発酵亢進例については、抗菌剤投与や食事指導など発酵反応を抑える治療も選択肢のひとつと考えられる。

文 献

- Phillips M, Herrera J, Krishnan S, et al. Variation in volatile organic compounds in the breath of normal humans. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1999 ; 729 : 7.
- 高木高明, 森下芳行. 発酵と腐敗. In: 島崎順雄, ほか・編. 病気の生化学13B, 消化器. 東京: 中山書店; 1976. p. 31.
- Gray JD, Shiner M. Influence of gastric pH on gastric and jejunal flora. *Gut* 1967 ; 8 : 574.
- Drasar BH, Shiner M, McLeod GM. Studies on the intestinal flora ; The bacterial flora of the gastrointestinal tract in healthy and achlorhydric persons. *Gastroenterology* 1969 ; 56 : 71.
- Holt P. Clinical significance of bacterial overgrowth in elderly people. *Age Ageing* 1992 ; 21 : 1.
- Howden CW, Hunt RH. Relationship between gastric secretion and infection (progress report). *Gut* 1987 ; 28 : 96.
- Perman JA, Modler S, Barr RG, et al. Fasting breath hydrogen concentration : normal values and clinical application. *Gastroenterology* 1984 ; 87 : 1358.
- 瓜田純久, 日毛和男, 鳥居尚隆, ほか. 大腸内視鏡前処置中の呼気中水素ガス測定による消化管 bacterial overgrowth の評価. *Progress Dig Endosc* 2003 ; 63 : 60.
- Urita Y, Hike K, Torii N, et al. Efficacy of lactulose plus ¹³C-acetate breath test in the diagnosis of gastrointestinal motility disorders. *J Gastroenterol* 2002 ; 37 : 442.
- Romagnuolo J, Schiller D, Bailey RJ. Using breath tests wisely in a gastroenterology practice : An evidence-based review of indications and pitfalls in interpretation. *Am J Gastroenterol* 2002 ; 97 : 1113.
- 瓜田純久, 菊池由宣, 日毛和男, ほか. 内視鏡下検査食負荷後の呼気・消化管内腔の気体分析による消化吸収試験. *消化と吸収* 2001 ; 24 : 20.
- Piche T, des Varannes SB, Sacher-Huvelin S, et al. Colonic fermentation influences lower esophageal sphincter function in gastroesophageal reflux disease. *Gastroenterology* 2003 ; 124 : 894.

High Levels of Aberrant DNA Methylation in *Helicobacter pylori*-Infected Gastric Mucosae and its Possible Association with Gastric Cancer Risk

Takao Maekita,^{1,3} Kazuyuki Nakazawa,³ Mami Mihara,¹ Takeshi Nakajima,^{1,2} Kimihiko Yanaoka,³ Mikitaka Iguchi,³ Kenji Arai,³ Atsushi Kaneda,¹ Tetsuya Tsukamoto,⁴ Masae Tatematsu,⁴ Gen Tamura,⁵ Daizo Saito,² Takashi Sugimura,¹ Masao Ichinose,³ and Toshikazu Ushijima¹

Abstract **Introduction:** Risk prediction of gastric cancers is important to implement appropriate screening procedures. Although aberrant DNA methylation is deeply involved in gastric carcinogenesis, its induction by *Helicobacter pylori*, a strong gastric carcinogen, is unclear. Here, we analyzed the effect of *H. pylori* infection on the quantity of methylated DNA molecules in noncancerous gastric mucosae and examined its association with gastric cancer risk.

Experimental Design: Gastric mucosae were collected from 154 healthy volunteers (56 *H. pylori* negative and 98 *H. pylori* positive) and 72 cases with differentiated-type gastric cancers (29 *H. pylori* negative and 43 *H. pylori* positive) by endoscopy. The numbers of DNA molecules methylated and unmethylated for eight regions of seven CpG islands (CGI) were quantified by quantitative PCR after bisulfite modification, and fractions of methylated molecules (methylation levels) were calculated.

Results: Among healthy volunteers, methylation levels of all the eight regions were 5.4- to 303-fold higher in *H. pylori* positives than in *H. pylori* negatives ($P < 0.0001$). Methylation levels of the *LOX*, *HAND1*, and *THBD* promoter CGIs and *p41ARC* exonic CGI were as high as 7.4% or more in *H. pylori*-positive individuals. Among *H. pylori*-negative individuals, methylation levels of all the eight regions were 2.2- to 32-fold higher in gastric cancer cases than in age-matched healthy volunteers ($P \leq 0.01$). Among *H. pylori*-positive individuals, methylation levels were highly variable, and that of only *HAND1* was significantly increased in gastric cancer cases (1.4-fold, $P = 0.02$).

Conclusions: It was indicated that *H. pylori* infection potently induces methylation of CGIs to various degrees. Methylation levels of specific CGIs seemed to reflect gastric cancer risk in *H. pylori*-negative individuals.

Gastric cancer is one of the most common malignancies worldwide and remains a leading cause of cancer death in Asia and some European countries (1). To reduce its mortality, early detection by endoscopy and curative resection

are important (2). However, considering the potential risk and costs of early detection by endoscopic examination, implementation reflecting an individual's risk for developing a gastric cancer would be ideal. Also, endoscopic mucosal resection, which conserves the noncancerous gastric mucosae, is becoming popular, and the problem of metachronous gastric cancer recurrence is being recognized (3). Again, if the future risk of developing metachronous cancers in a specific case can be estimated, the information will be useful in the decision on either surgical resection or endoscopic mucosal resection for the case.

The major etiologic risk factor for gastric cancers is *Helicobacter pylori* infection, which increases gastric cancer risk 2.2- to 21-fold (4-6). In an animal model with Mongolian gerbil chronic infection with *H. pylori* rarely induces gastric cancers by itself, but markedly enhances their incidences after initiation with a mutagen, such as *N*-methyl-*N*-nitrosourea (7). This promoting effect of *H. pylori* has been attributed to the induction of chronic inflammation and cell proliferation (8). Cell proliferation increases a chance for initiated cells to escape growth suppression and undergo further mutations. Other risk factors for gastric cancers include high salt intake and smoking (9), and a cancer risk marker incorporating these factors is awaited.

Authors' Affiliation: ¹Carcinogenesis Division, National Cancer Center Research Institute; ²Endoscopy Division, National Cancer Center Hospital, Tokyo, Japan; ³Second Department of Internal Medicine, Wakayama Medical University, Wakayama, Japan; ⁴Division of Oncological Pathology, Aichi Cancer Center Research Institute, Nagoya, Japan; and ⁵Department of Pathology, Yamagata University School of Medicine, Yamagata, Japan
Received 9/26/05; revised 11/11/05; accepted 11/21/05.

Grant support: Research Resident Fellowships from the Foundation for Promotion of Cancer Research (T. Maekita and K. Nakazawa); Grant-in-Aid for Cancer Research from the Ministry of Health, Labour, and Welfare; and a Special Coordination Fund for Promoting Science and Technology from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology, Japan.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Note: Supplementary data for this article are available at Clinical Cancer Research Online (<http://clincancerres.aacrjournals.org/>).

Requests for reprints: Toshikazu Ushijima, Carcinogenesis Division, National Cancer Center Research Institute, 5-1-1 Tsukiji, Chuo-ku, 104-0045 Tokyo, Japan. Phone: 81-3-3547-5240; Fax: 81-3-5565-1753; E-mail: tushijim@ncc.go.jp.

© 2006 American Association for Cancer Research.

doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-2096

As an additional mechanism of gastric cancer induction by *H. pylori* infection, induction of aberrant methylation was suggested by Chan et al. (10). They observed that *E-cadherin* methylation was more frequent in the gastric mucosae of dyspepsia cases with *H. pylori* infection than those without. In contrast, Kang et al. (11) did not observe a difference in the number of methylated genes in gastric mucosae with and without *H. pylori* infection. The discrepancy could be due to the lack of quantification of aberrantly methylated DNA molecules. Aberrant methylation in noncancerous tissues occurs only in a fraction of cells, which is expected to be highly variable, and qualitative analysis of methylation does not seem suitable. Also, different CpG islands (CGI) and, even within a CGI, different regions show different susceptibility to aberrant DNA methylation (12), and analysis considering the different susceptibility has not been done. Most importantly, there is no former study regarding the relationship between the level of aberrant methylation in gastric mucosae and risks of gastric cancer development. It seems possible that levels of aberrant methylation could reflect past exposure to *H. pylori* and other carcinogens, and that the methylation levels could be used as a cancer risk marker.

In this study, we aimed to clarify the effects of *H. pylori* infection on the induction of aberrant methylation by quantifying methylation levels of multiple CGIs and regions in healthy volunteers with and without *H. pylori* infection. Then, to clarify whether accumulated levels of aberrant DNA methylation are associated with a risk of gastric cancer development, we quantified methylation levels in gastric mucosae of healthy volunteers and noncancerous gastric mucosae of gastric cancer cases, which are known to have an elevated risk of gastric cancers (13, 14).

Materials and Methods

Cases, tissue samples, and DNA extraction. Healthy volunteers (82 males and 72 females) with an average age of 54.2 (range, 23-98) were recruited with informed consents on the occasion of a gastric cancer screening program under the approval of institutional review boards. Cases with well-differentiated gastric cancers (60 males and 12 females) with an average age of 67.2 (range, 37-85) were recruited with informed consents and under the approval of institutional review boards. To obtain a group of healthy volunteers whose average age was matched to the cancer cases, the same number of volunteers as cancer cases was randomly selected from each age group. The age-matched group (35 males and 37 females) had an average age of 64.4 (range 39-91;

Table 1). *H. pylori* infection status was analyzed by a serum anti-*H. pylori* IgG antibody test (SBS, Kanagawa, Japan), rapid urease test (Otsuka, Tokushima, Japan), or culture test (Eiken, Tokyo, Japan). The sensitivities of the serum anti-*H. pylori* IgG antibody test and rapid urease test are $\geq 90\%$ of the culture test (15, 16).

Gastric mucosae were obtained by endoscopic biopsy of two standard sites, the upper corpus and antral regions in the lesser curvature, with sterilized biopsy forceps (Olympus, Tokyo, Japan). Gastric cancer cases that had cancers in either of the two standard sites were excluded from the analysis. Histologic analysis of selected biopsied materials showed that these samples contain 40% to 80% of epithelial tissues. The samples were frozen and stored at -80°C . High molecular weight DNA was extracted by the phenol/chloroform method.

Sodium bisulfite modification and quantitative methylation-specific PCR. Bisulfite treatment was done using 500 ng genomic DNA, digested with *Bam*HI, as previously described (17), and the treated DNA was suspended in 40 μL of TE buffer. An aliquot of 2 μL was used for real-time PCR with a primer set specific to methylated or unmethylated sequences. Using DNA from gastric mucosae from a young individual without *H. pylori* infection and DNA methylated with *Sss*I methylase (New England Biolabs, Beverly, MA), an annealing temperature specific for a primer set was determined. Real-time PCR was done using SYBR Green PCR Core Reagents (PE Biosystems, Warrington, United Kingdom) and an iCycler Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Standard DNA was prepared by cloning PCR products into the pGEM-T Easy vector (Promega, Madison, WI). The number of molecules in a test sample was determined by comparing its amplification with those of samples containing a known number of molecules ($10\text{-}10^5$ molecules). The number of molecules methylated and unmethylated for a genomic region in a sample was measured separately, and the methylation level was calculated as the fraction of methylated molecules in the total number of DNA molecules (number of methylated molecules + number of unmethylated molecules). The primer sequences and PCR conditions are shown in Supplementary Table S1, and standard DNA for real-time methylation-specific PCR is available upon request.

Statistical analysis. The differences of mean methylation levels were analyzed by using the *t* test Welch method (both sided). Association between the age and methylation level was analyzed by calculating correlation coefficients and t_0 values.

Results

Quantification of methylation levels and reproducibility. We analyzed methylation levels of two regions of the *p16* promoter CGI and one region of six genes (*LOX*, *FLNC*, *HRASLS*, *HAND1*, *THBD*, and *p41ARC*; Fig. 1A), which could be methylated in human gastric cancers (18, 19). The two regions of *p16* promoter CGIs were selected because one region (core region)

Table 1. Characteristics of the individuals analyzed

	All cases		Age matched	
	n (male:female)	Mean age (range)	n (male:female)	Mean age (range)
Healthy volunteers				
<i>HP</i> (-)	56 (30:26)	51 (25-91)	29 (14:15)	63 (48-91)
<i>HP</i> (+)	98 (52:46)	56 (23-98)	43 (21:22)	64 (39-86)
Gastric cancer cases				
<i>HP</i> (-)	29 (24:5)	69 (52-85)	n/a	n/a
<i>HP</i> (+)	43 (36:7)	67 (37-85)	n/a	n/a

Abbreviations: *HP* (-), *H. pylori* negative; *HP* (+), *H. pylori* positive; n/a, not applicable.

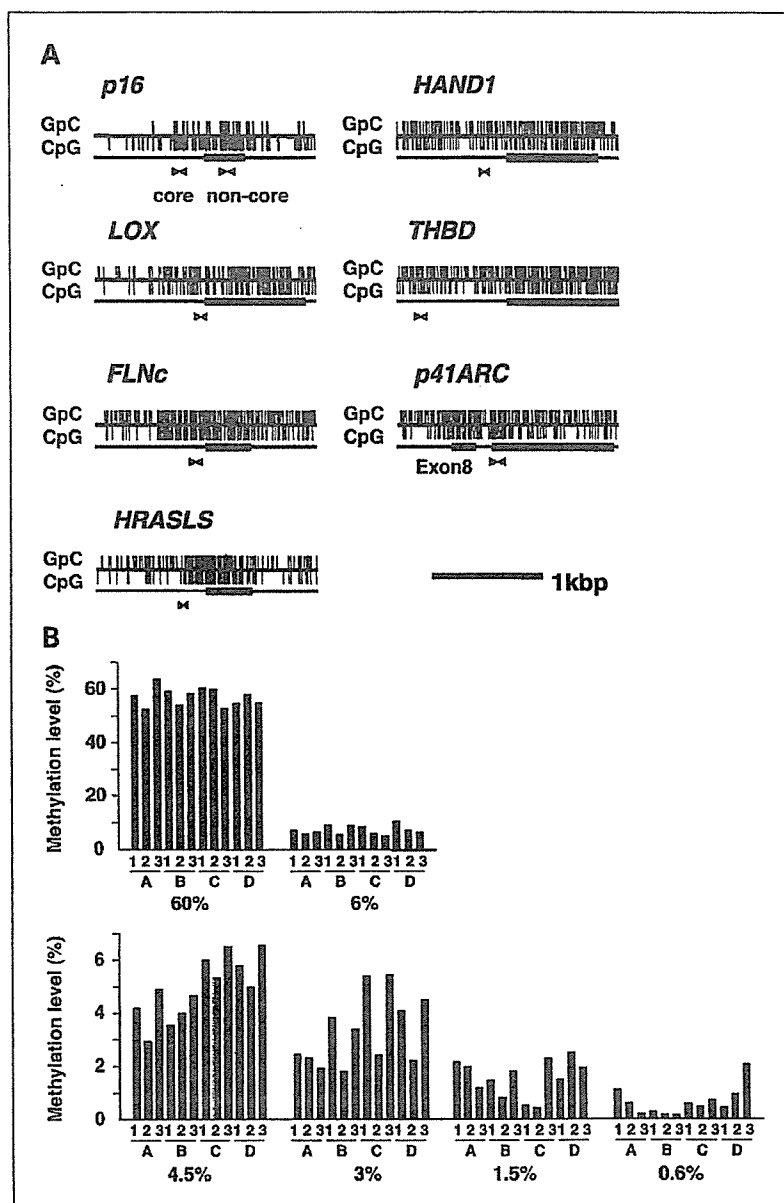


Fig. 1. Locations of regions analyzed and reproducibility of methylation levels. **A**, CGIs and regions analyzed. **B**, reproducibility of methylation levels. Two independent bisulfite modifications (**A** and **B**; **C** and **D**) were done and four independent quantitative PCRs were done in triplicate. The methylation levels obtained were highly reproducible.

was known to be critical for *p16* silencing but resistant to methylation and the other region (noncore region) was known to be susceptible to methylation but does not suppress gene expression (12). For *LOX*, *FLNc*, *HRASLS*, and *HAND1*, core regions of their promoter CGIs were analyzed. For *THBD*, noncore region of its promoter CGI was analyzed because the core region was not methylated at all (data not shown). For *p41ARC*, we analyzed its exonic CGI, which was frequently methylated in gastric cancers (19).

The reproducibility of the values obtained by quantitative methylation-specific PCR was analyzed for the *HAND1* CGI. Test DNA samples were prepared by mixing DNA completely methylated by *SssI* methylase and that in which no methylation was detected at the ratios of 60%, 6%, 4.5%, 3%, 1.5%, and 0.7% of methylation. The same DNA was modified by bisulfite on two different dates (groups **A** and **B** on the same date, and groups **C** and **D** on the other date). Each group was analyzed by quantitative PCR on different dates in triplicate. The resultant

12 values (mean \pm SD) for the three samples were as follows: $57.1 \pm 3.5\%$, $7.3 \pm 1.3\%$, $5.0 \pm 1.2\%$, $3.3 \pm 1.3\%$, $1.6 \pm 0.7\%$, and $0.7 \pm 0.5\%$ (Fig. 1B). Therefore, methylation levels obtained here were highly reliable when they were larger than 1.5% to 3%, and were also reliable but more number of measures were necessary when smaller than 1.5% to 3%.

High levels of aberrant methylation in gastric mucosae with *H. pylori*. Methylation levels of the eight regions were analyzed by quantitative methylation-specific PCR in 56 *H. pylori*-negative volunteers and 98 *H. pylori*-positive volunteers (Fig. 2; Table 2). For all the eight CGIs analyzed, methylation levels in the *H. pylori*-positive healthy volunteers were significantly and markedly elevated compared with those in the *H. pylori*-negative healthy volunteers. In the corpus, the mean methylation levels were elevated 303-fold (*p16* core region), 20-fold (*p16* noncore region), 14-fold (*LOX*), 11-fold (*THBD*), 49-fold (*FLNc*), 13-fold (*HRASLS*), 9.3-fold (*HAND1*), and 5.4-fold (*p41ARC*). In the antrum, they were

elevated 54-fold (*p16* core region), 22-fold (*p16* noncore region), 16-fold (*LOX*), 17-fold (*THBD*), 30-fold (*FLNc*), 18-fold (*HRASLS*), 7.8-fold (*HAND1*), and 5.7-fold (*p41ARC*). Especially, methylation levels of *LOX*, *HAND1*, *THBD*, and *p41ARC* were higher than 7.4% in *H. pylori*-positive individuals, and this unequivocal effect of *H. pylori* infection supported the increases in methylation levels of the other CGIs in smaller ranges. This strongly indicated that *H. pylori* infection potently induced aberrant methylation in multiple CGIs. Mean methylation levels were in the same range in the corpus and antrum.

Effect of age and sex on methylation levels. Because age-dependent methylation was reported for various CGIs (20, 21), association between age and methylation levels of antral mucosa was analyzed by calculating correlation coefficients. In the 56 *H. pylori*-negative healthy volunteers, correlation coefficients (*P* values) for *p16* core region, *p16* noncore region,

LOX, *THBD*, *FLNc*, *HRASLS*, *HAND1*, and *p41ARC* were 0.09 (0.51), 0.23 (0.08), 0.18 (0.18), 0.26 (0.05), 0.17 (0.21), 0.34 (0.01), 0.32 (0.02), and 0.29 (0.03), respectively. In the 98 *H. pylori*-positive healthy volunteers, they were 0.18 (0.08), 0.13 (0.20), -0.02 (0.85), 0.08 (0.43), -0.07 (0.49), 0.05 (0.62), 0.18 (0.08), and 0.13 (0.20), respectively. Only *HRASLS*, *HAND1*, and *p41ARC* showed very weak correlation ($0.01 < P < 0.05$) with age in *H. pylori*-negative healthy volunteers.

Because males have a twice as high incidence of gastric cancers as females (2), we also examined the sex differences of methylation levels. However, no significant differences were observed between the 30 males and 26 females among the 56 *H. pylori*-negative healthy volunteers, or between the 52 males and 46 females among the 98 *H. pylori*-positive healthy volunteers.

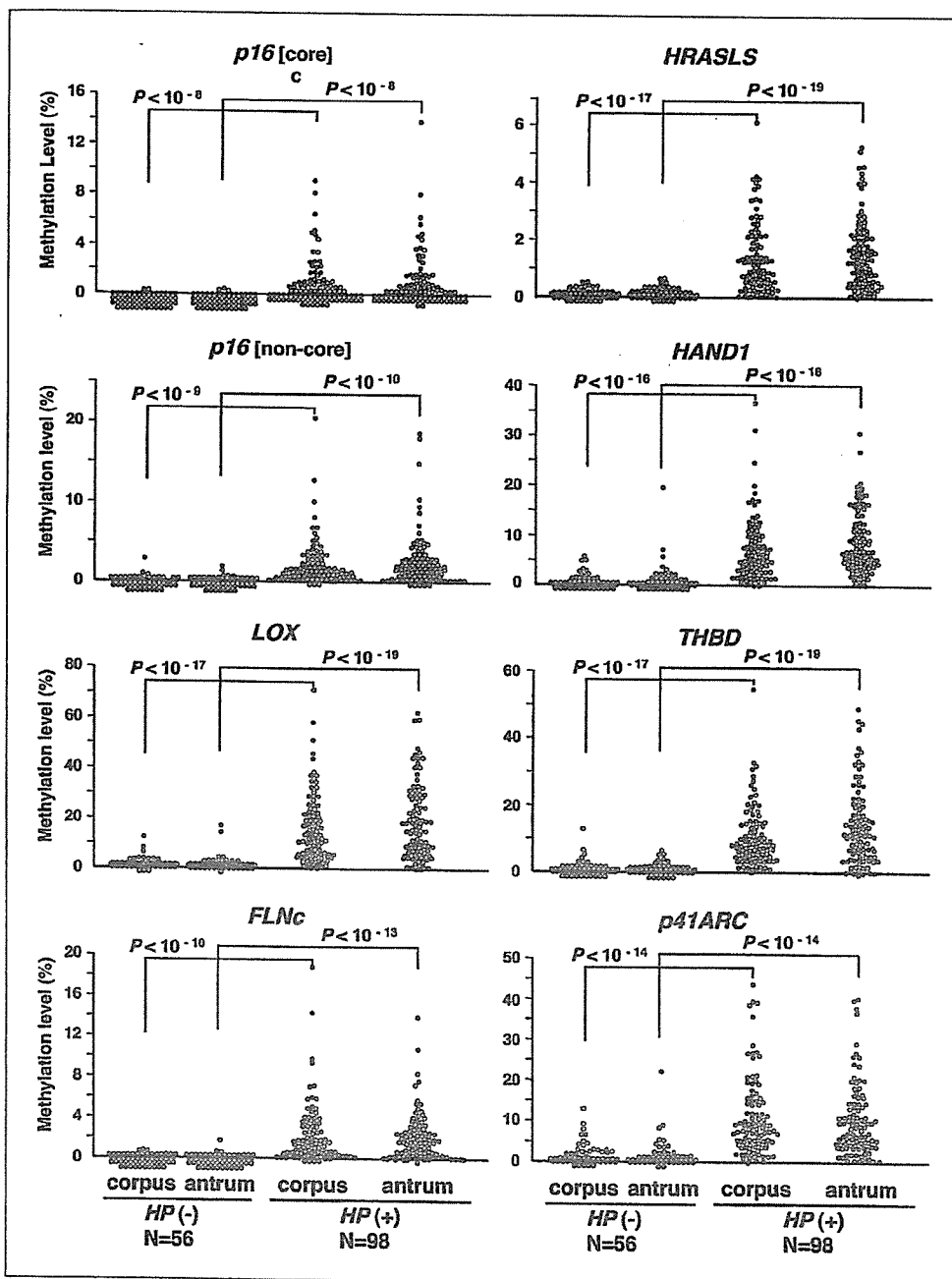


Fig. 2. Higher levels of methylation in gastric mucosae of *H. pylori*-positive volunteers than in those of *H. pylori*-negative volunteers. Methylation levels were measured in the corpus and antrum of 56 *H. pylori*-negative volunteers and 98 *H. pylori*-positive volunteers. All the eight CGIs (core region of *p16*, noncore regions of *p16* and *THBD*; core regions of *LOX*, *HRASLS*, *FLNc*, and *HAND1*; and *p41ARC* exonic CGI) showed significantly elevated methylation levels (5.4- to 303-fold) in the *H. pylori*-positive volunteers. Methylation levels in the corpus were at the same levels as those in the antrum.

Table 2. Methylation levels of the seven CGIs in *H. pylori*-negative and *H. pylori*-positive individuals and in healthy volunteers and gastric cancer cases

	n	Mean age	Corpus							Antrum							
			p16 (core)	p16 (non)	LOX	FLNc	HRASLS	HAND1	THBD	p41ARC (core)	p16 (non)	LOX	FLNc	HRASLS	HAND1	THBD	p41ARC (non)
HV																	
HP(-)	56	51	0.0%	0.1%	1.2%	0.0%	0.1%	0.8%	1.0%	2.1%	0.0%	0.1%	1.2%	0.1%	1.1%	0.8%	1.9%
HP(+)	98	57	0.9%	2.2%	16.0%	2.3%	1.3%	7.4%	10.7%	11.2%	1.1%	2.6%	18.8%	2.2%	1.5%	8.8%	14.2%
P			<10 ⁻⁸	<10 ⁻⁹	<10 ⁻¹⁷	<10 ⁻¹⁰	<10 ⁻¹⁷	<10 ⁻¹⁶	<10 ⁻¹⁷	<10 ⁻¹⁴	<10 ⁻⁸	<10 ⁻¹⁰	<10 ⁻¹⁹	<10 ⁻¹³	<10 ⁻¹⁹	<10 ⁻¹⁸	<10 ⁻¹⁹
GCC																	
HP(-)	29	69	0.2%	0.6%	8.2%	0.6%	0.6%	4.1%	7.1%	6.6%	0.2%	0.5%	4.6%	1.3%	0.4%	7.5%	5.5%
HP(+)	43	67	0.4%	2.0%	12.7%	0.8%	1.2%	8.1%	12.3%	11.5%	0.3%	2.5%	11.2%	1.0%	0.8%	11.3%	10.2%
P			0.07	<0.01	0.02	0.17	<0.01	<0.01	0.01	<0.01	0.28	0.04	<0.01	0.35	0.02	0.05	0.02
HP(-)																	
AM-HV	29	63	0.0%	0.2%	1.7%	0.1%	0.1%	1.0%	1.3%	3.1%	0.0%	0.2%	1.4%	0.1%	0.1%	1.7%	1.1%
GCC	29	69	0.2%	0.6%	8.2%	0.6%	0.6%	4.1%	7.1%	6.6%	0.2%	0.5%	4.6%	1.3%	0.4%	7.5%	5.5%
P			<0.01	0.01	<0.01	<0.01	<0.01	0.01	<0.01	<0.01	0.05	0.02	0.02	0.03	<0.01	<0.01	<0.01
HP(+)																	
AM-HV	43	64	1.0%	1.9%	12.8%	1.4%	1.2%	6.7%	9.4%	9.4%	0.8%	2.1%	13.9%	1.5%	1.2%	7.8%	10.0%
GCC	43	67	0.4%	2.0%	12.7%	0.8%	1.2%	8.1%	12.3%	11.5%	0.3%	2.5%	11.2%	1.0%	0.8%	11.3%	10.3%
P			0.03	0.44	0.48	0.02	0.48	0.13	0.07	0.11	0.07	0.38	0.17	0.09	0.05	0.02	0.45

Abbreviations: HV, healthy volunteers; GCC, gastric cancer cases (noncancerous mucosae); AM-HV, age-matched healthy volunteers; non, noncore.

Association between high methylation levels and gastric cancer development. Finally, we examined whether accumulated levels of aberrant DNA methylation in gastric mucosae are associated with a risk of gastric cancer. Methylation levels in noncancerous gastric mucosae of 72 gastric cancer cases (29 *H. pylori*-negative and 43 *H. pylori*-positive cases) were compared with those of 72 healthy volunteers (29 *H. pylori*-negative and 43 *H. pylori*-positive individuals) that were randomly selected to match the average age and *H. pylori* infection status of gastric cancer cases (Table 2).

When *H. pylori*-negative healthy volunteers and *H. pylori*-negative gastric cancer cases were compared, mean methylation levels of antral mucosae in gastric cancer cases (Fig. 3) were significantly elevated at 4.9-fold (*p16* core region), 2.3-fold (*p16* noncore region), 3.3-fold (*LOX*), 5.1-fold (*THBD*), 10-fold (*FLNc*), 3.9-fold (*HRASLS*), 4.4-fold (*HAND1*), and 2.2-fold (*p41ARC*). The same tendency was observed in the corpus. When *H. pylori*-positive healthy volunteers and *H. pylori*-positive gastric cancer cases were compared, variations within both groups were very large. A possibly significant increase ($P = 0.02$) was observed only for *HAND1* at 1.4-fold.

Discussion

It was shown here that significantly higher levels of aberrant methylation (5.4- to 303-fold) were present in multiple CGIs in the gastric mucosae of healthy volunteers with *H. pylori* infection. This finding strongly indicated that *H. pylori* infection potently induces aberrant methylation in multiple CGIs, although there has been controversy (10, 11). The induction of aberrant methylation by the strong gastric carcinogen *H. pylori* is in a good agreement with the fact that tumor

suppressor genes, like *p16*, *E-cadherin*, and *hMLH1*, are inactivated more frequently by aberrant DNA methylation than by mutations in gastric cancers (2). Aberrant DNA methylation was shown to be present in noncancerous mucosae of ulcerative colitis by pioneering studies (21, 22), and a role of chronic inflammation in methylation induction has been proposed. Because *H. pylori* infection also causes strong chronic inflammation (23), the role of chronic inflammation in induction of aberrant methylation seems very clear.

Methylation levels of all of the eight CGIs were associated with gastric cancer risk in *H. pylori*-negative individuals. It must be noted that clinical tests for *H. pylori* infection detect only current (culture and urease tests) or recent (serum antibody test) status of *H. pylori* infection and cannot detect past exposure to *H. pylori* (4, 16). On the other hand, epidemiologic studies showed that past exposure to *H. pylori*, rather than current exposure, is more closely associated with a risk of gastric cancer development and that a majority of *H. pylori*-negative gastric cancer cases had past exposure to *H. pylori* (5, 24).

However, methylation levels in *H. pylori*-positive individuals were higher than *H. pylori*-negative gastric cancer cases. The high methylation levels in the *H. pylori*-positive individuals are considered to drop down to various degrees when active *H. pylori* infection discontinues as observed in the *H. pylori*-negative gastric cancer cases. This suggests that *H. pylori* infection induces DNA methylation in both stem cells, which will persist, and nonstem cells, which will drop off the gastric mucosae in a few days (25). If the methylation status of stem cells is copied into the cells in the entire gland without active induction, the methylation levels in the gastric mucosae will reflect the fraction of methylated stem cells among the entire