

糞便中の *H. pylori* 抗原検査

H. pylori stool antigen test

た なか あき ふみ たか はし しん いち
田 中 昭 文 : 高 橋 信 一
Akifumi TANAKA Shin'ichi TAKAHASHI

はじめに

近年、新しい非侵襲的な *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) 感染診断法として便中 *H. pylori* 抗原測定法 (*H. pylori* stool antigen test : HpSA) が開発された。米国の Meridian Bioscience 社により最初に開発された Premier Platinum HpSA は、1998 年に米国で *H. pylori* の感染診断および除菌判定法として米国食品医薬品局 (Food and Drug Administration : FDA) で認可されている。また、2000 年 9 月に European *Helicobacter pylori* Study Group (EHPG) より作成されたマーストリヒト 2-2000 コンセンサスレポートにおいて、HpSA は *H. pylori* 感染診断において尿素呼気試験 (urea breath test : UBT) と同じく推奨され、除菌判定においては UBT の代替法として推奨されている¹⁾。

HpSA は欧米で高い評価を得ているが、2000 年 6 月に日本ヘリコバクター学会より発表された *H. pylori* 感染の診断と治療のガイドライン²⁾ においてその精度は検討中とされ、同年 11 月より胃・十二指腸潰瘍に対する *H. pylori* の感染診断と除菌治療が保険適用となった際にも HpSA は保険適用とならなかった。しかし、2003 年 2 月に発表された *H. pylori* 感染の診断と治療のガイドライン 2003 年改訂版³⁾ において HpSA は診断法の 1 つとして加えられ、同年 11 月よりついに HpSA は保険適用となり、Premier Platinum HpSA (日本商品名 : メリディアン HpSA ELISA) とわが国のわかもと製薬が開発したモノクローナル抗体を用いた HpSA キットであるテストメイトピロリ抗原 EIA⁴⁾ が認可された。

本稿では、便中 *H. pylori* 抗原測定法として世界的に最も広く用いられ精度が検討されている Premier Platinum HpSA とわが国で開発されたテストメイトピロリ抗原 EIA について述べる。

I. Premier Platinum HpSA

(日本商品名 : メリディアン HpSA ELISA)

製造 : Meridian Bioscience, 輸入販売 : テイエフビー)

(a) 測定原理と基礎性能

米国の Meridian Bioscience 社により最初に開発された *H. pylori* 便中抗原測定キットである Premier Platinum HpSA は、世界中で最も広く用いられ精度が検討されており、基礎的、臨床的論文が多数発表されている。現在、単に HpSA と言うとこのキットを指すことが多い。

1) 測定原理 (図 1)

希釈糞便中の *H. pylori* 抗原をアフィニティ精製したポリクローナル抗体で捕捉、酵素反応による基質の発色により検出するサンドイッチ ELISA 法である。抗体には *H. pylori* ATCC43504 株を免疫し、アフィニティ精製して得たウサギポリクローナル抗体を用いており、単一ではなく広範に抗原を認識している。

2) 測定方法

便少量を検体希釈液に加え攪拌する。希釈した検体 50 μ l とペルオキシダーゼ標識抗 *H. pylori* ポリクローナル抗体 1 滴をマイクロウエルに加えて室温 (22 ~ 27 $^{\circ}$ C) で 1 時間反応後、5 回洗浄を行い未反応物質を除去する。基質液 2 滴を加え室温で 10 分

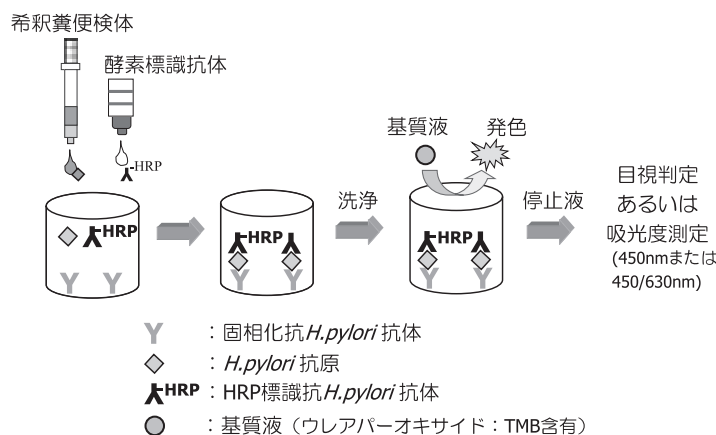


図1 Premier Platinum HpSA の測定原理 (ELISA 法)

間反応させ、反応停止液を1滴加える。検体中に*H. pylori*抗原が存在する場合には、ポリクローナル抗体-*H. pylori*抗原-ペルオキシダーゼ標識抗*H. pylori*ポリクローナル抗体の免疫複合体が形成され、発色する。判定はマイクロプレートリーダーにより吸光度(450/630nmまたは450nm)を測定をする。また、キットに添付されている色見本を用いて目視判定も可能である。

3) 判定

①吸光度450nmの場合：陽性 ≥ 0.160 , $0.160 >$ 判定保留 ≥ 0.140 , 陰性 < 0.140

②吸光度450/630nmの場合：陽性 ≥ 0.120 , $0.120 >$ 判定保留 ≥ 0.100 , 陰性 < 0.100

保留域は繰り返し測定すべきであり、再度保留であれば新しい検体を採取することが望ましい。

4) 検出感度

製造元データでは184ng*H. pylori*蛋白/ml(糞便検体)、伊藤ら⁵⁾は*H. pylori*超音波破碎抗原で120ng/mlから、神谷ら⁶⁾は菌数で $10^3 \sim 10^4$ cfu程度から陽性を示すと報告している。HpSAはhelical formと同様に、糞便内の主な存在状態と考えられるcoccoid formにおいても検出可能であることが報告されている⁶⁾。

5) 特異性

製造元における各種細菌およびウイルス株との交差反応性の検討では、*H. mustelae*に陽性反応を認めたと報告している。神谷ら⁶⁾は類縁菌*H. mustelae*, *C. jejuni*, *C. coli*を含む16菌種18菌株に反応せず、用いた*H. pylori*10菌株すべてに陽性反応を示したと報告している。また、HpSAはhelical formと同様に、糞便内の主な存在状態と考えられるcoccoid

formにおいても検出可能であることを報告した。

6) 糞便検体の安定性

添付文書には糞便検体は2~8℃で72時間保存可能としている。また、すぐに検査できない場合は-20℃以下で凍結保存としている。伊藤ら⁵⁾は4℃以下の保存では安定であり、25℃では数日間安定、35℃の高温では数日間で抗原性が失われることを報告している。

7) 薬剤による影響

Bravoら⁷⁾はHpSAはプロトンポンプ阻害剤(proton pump inhibitor:PPI)、ビスマス製剤内服によりUBT同様に偽陰性となること、内服終了2週間後で影響がなくなることを報告している。製造元の説明書は、PPI、ビスマス製剤のほか抗菌薬服用後は2週間以上空けて検査するように注意している。

(b) 診断精度

これまでに海外および国内で多数の論文報告がある。これらのうち主な報告を除菌前の感染診断、除菌判定別にそれぞれ表1, 2に示した。

1) 感染診断 (表1)

これまでの主な論文報告を表1に示す。Vaira⁸⁾らは501例を対象としたヨーロッパの多施設検討において、培養、組織鏡検法、迅速ウレアーゼ試験をgold standardとしてHpSAは感度94%、特異度92%と良好な成績を報告した。他の報告者も同様に有用性を報告している^{5, 8~14)}。また、Vairaら¹⁵⁾は1999~2000年におけるPremier Platinum HpSAを用いた19の研究(合計2924例)を加算平均し、*H. pylori*感染診断においてHpSAは感度は93.1%、特

異度 92.8%と良好な成績を報告している。

我々も 136 例を対象として培養法, 組織鏡検法, 迅速ウレアーゼ試験に基づく *H. pylori* 感染診断と比較検討を行い, HpSA は感度 98.3%, 特異度 95.0%, 一致率 97.8%と良好な成績であった¹⁶⁾ (表 3)。

2) 除菌判定 (表 2)

これまでの主な論文報告を表 2 に示す。Vaira ら¹⁷⁾ は Europe における prospective multicenter study において除菌治療 4 週後に 162 例を対象に培養法, 組織鏡検法, 迅速ウレアーゼ試験を対照とし HpSA は感度 93.8%, 特異度 96.9%, 235 名を対象に¹³C-UBT を対照とし HpSA は感度 95.6%, 特異度 94.7%と良好な成績を報告している。その他多くの報告が HpSA の除菌判定における有用性を報告している^{14, 18~22)}。

我々も 54 例を対象に除菌 6~10 週後の判定において, 培養法, 組織鏡検法, 迅速ウレアーゼ試験, ¹³C-UBT に基づく診断と比較して HpSA は感度 90.0%, 特異度 97.7%, 一致率 96.3%と良好な成績であった¹⁶⁾ (表 3)。

しかし, 一部では除菌前に比べ除菌後の特異度,

および感度が劣るとする報告^{9, 13, 23)}もある。Vaira ら¹⁵⁾ は 1999~2000 年における Premier Platinum HpSA を用いた 10 の研究 (合計 945 例) を加算平均し, *H. pylori* 除菌判定において HpSA は感度 89%, 特異度 88.5%と報告している。gold standard として, 2つの方法を使用した3つの研究 (n=332) において HpSA は感度 92%, 特異度 88%, UBT のみを用いた7つの研究 (n=613) において HpSA は感度 88%, 特異度 88%であり, HpSA の除菌判定精度の報告に相違がみられるのは, gold standard に問題があるかもしれないと指摘している¹⁵⁾。

HpSA の偽陰性は, 除菌後 *H. pylori* 菌量低下によるものが考えられる。われわれも, *H. pylori* の菌量低下による HpSA 偽陰性と考えられる症例を 1 例経験した¹⁶⁾。Vaira ら²⁰⁾, Odaka ら²²⁾ は除菌終了後 1 週おきに HpSA を測定し, Vaira らは 5 週目, Odaka らは 8 週目で感度が 100%となり, 偽陰性例を認めない成績となった。判定時期を遅らせれば, より確実に判定することが可能であることを示している。

表 1 HpSA の感染診断精度

報告者	国	例数	基準法	感度 (%)	特異度 (%)
Vaira et al. ⁸⁾	Europe	501	RUT, H, C	94.1	91.8
Trevisani et al. ⁹⁾	Italy	146	RUT, H	94	90
Vakil et al. ¹⁰⁾	USA	108	RUT	86	91
Oderda et al. ^{*11)}	Italy	203	RUT, H	100	93
Ohkura et al. ¹²⁾	日本	309	RUT, H, UBT	93.9	95.7
伊藤ら ⁵⁾	日本	87	H, C	99	100
石塚ら ¹³⁾	日本	68	RUT, H, C, UBT	96.7	87.5
福田ら ¹⁴⁾	日本	201	RUT, H, C, UBT	96.6	98.2
Tanaka et al. ¹⁶⁾	日本	136	RUT, H, C	98.3	95

RUT: 迅速ウレアーゼ試験, H: 組織鏡検法, C: 培養法, UBT: 尿素呼気試験, *小児

表 2 HpSA の除菌判定精度

報告者	国	例数	除菌判定時期 (日)	基準法	感度 (%)	特異度 (%)
Vaira et al. ¹⁷⁾	Europe	162	28	RUT, H, C	93.8	96.9
Vaira et al. ¹⁷⁾	Europe	235	28	UBT	95.6	94.7
Braden et al. ^{*18)}	Germany	115	>28	UBT	91.3	94.6
Trevisani et al. ⁹⁾	Italy	116	56	RUT, H, UBT	93	82
Forne et al. ²³⁾	Spain	142	42	UBT	70.4	81.6
Costa et al. ¹⁹⁾	Italy	155	30	UBT	92	82
Costa et al. ¹⁹⁾	Italy	153	90	UBT	96	97
Vaira et al. ²⁰⁾	Eu & US	81	35	RUT, H, C	94	97
Ishihara et al. ²¹⁾	日本	112	28	UBT	90	98
Odaka et al. ²²⁾	日本	43	28	RUT, H, UBT	88.9	94.1
福田ら ¹⁴⁾	日本	69	28	RUT, H, C, UBT	80	96.8
Tanaka et al. ¹⁶⁾	日本	54	>42	RUT, H, C, UBT	90	97.7

RUT: 迅速ウレアーゼ試験, H: 組織鏡検法, C: 培養法, UBT: 尿素呼気試験, *小児

表3 *H. pylori* 感染診断, 除菌判定 (6-10 週後) における HpSA の評価 (Tanaka et al.¹⁶⁾)

<i>H. pylori</i>	感染診断		除菌判定	
	+	-	+	-
HpSA				
+	114	1	9	1
-	2	19	1	43
計	116	20	10	44
精度 (95%信頼区間)				
感度	98.3% (95.9-100)		90.0% (55.5-99.7)	
特異度	95.0% (75.1-99.9)		97.7% (93.3-100)	
一致率	97.8% (95.3-100)		96.3% (91.3-100)	
陽性反応適中率	99.1% (97.4-100)		90.0% (55.5-99.7)	
陰性反応適中率	90.5% (69.6-98.8)		97.7% (93.3-100)	

HpSA は製造元の Meridian Bioscience 社推奨の判定基準を用いた。

(吸光度 450/630nm: 陽性 ≥ 0.120 , $0.120 >$ 判定保留 ≥ 0.100 , 陰性 < 0.100)

一方, HpSA の偽陽性は, 死菌の排泄遅れによる delayed clearance が原因という指摘がある¹⁹⁾。われわれの検討¹⁶⁾において, 除菌治療後 HpSA は, 除菌成功, 不成功例にかかわらず除菌終了直後に菌量の低下により陰性化すると考えられたが, 同様の成績が Vaira ら²⁰⁾, Odaka ら²²⁾ から報告されている。これらの結果は HpSA の delayed clearance を否定する成績であるが, この現象についてはさらに検討が必要と考えられる。

Trevisani ら⁹⁾ は除菌後特異性が低下すると報告しているが, 偽陽性はカットオフ値を若干上回る値であった。われわれは不十分な洗浄によるバックグラウンドの上昇を経験しており, 偽陽性の原因になると考えられた。この点は Vaira らも指摘している²⁴⁾。カットオフ値近傍の結果は, 再度検査を行うなど判定には注意が必要である。

II. テストメイトピロリ抗原 EIA

(わかもと製薬)

テストメイトピロリ抗原 EIA は, わが国のわかもと製薬が開発したモノクローナル抗体を用いた HpSA キットである。報告例は少ないが良好な結果が報告されている。

(a) 測定原理と基礎性能

1) 測定原理

便中の *H. pylori* 抗原 (native カタラーゼ) に対し特異的に反応するモノクローナル抗体を ELISA 法で検出する方法である。

2) 測定方法

検体希釈液 400 μ l に 5 ~ 6mm 程度の便塊を加え, 試験管ミキサーで 30 秒間よく混和する。抗 *H. pylori* マウスモノクローナル抗体固相化マイクロプレートに糞便検体を滴下し, 酵素標識抗体液を一滴加える。1 時間室温で静置後洗浄を 5 回行い洗浄液を完全に除去した後に基質液を加え室温で 10 分間静置し, 反応停止液を加えて発色をプレートリーダーにて吸光度 450/630nm, または 450nm で測定する。キットに添付されている比色紙を用いて目視判定も可能である。

判定: ①吸光度 450nm: 陽性 ≥ 0.140 , 陰性 < 0.140

②吸光度 450/630nm: 陽性 ≥ 0.100 , 陰性 < 0.100

3) 交差反応性

製造元による *Helicobacter felis*, *hepaticus*, *musterae*, *cinaedi*, *Campylobacter jejuni*, *Bacteroides vulgatus*, *Escherichia coli*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium breve* の標準菌株の菌体破砕物における検討においてはいずれも陰性を示した。

(b) 診断精度

福田ら²⁵⁾ は 79 例を対象に内視鏡的検査, UBT, 抗体検査を用いた判定を基準にしてテストメイトピロリ抗原 EIA は感度, 特異度ともに 100% と報告している。

おわりに

新しく保険適用となった便中 *H. pylori* 抗原測定

法は *H. pylori* 感染診断の精度は高く、除菌判定においても、除菌治療後4週を超える間隔をあけて判定すること、カットオフ値近傍の結果は再度検査を行うなどの注意をすることによって、より確実な判定結果を得ることが可能と考えられた。HpSAは患者負担が少なく、小児にも適した検査と考えられ、小児における検討も進んでおり、有用性が報告されている^{11, 18, 26)}。

また、イムノクロマト法を用いた迅速HpSAキットであるImmuno Card STAT! HpSA (Meridian Bioscience Europe), およびテストメイトラピッドピロリ抗原(わかもと製薬)も開発され、精度が検討されており、今後臨床応用が期待される。

文 献

- Malfertheiner P., et al.: Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection - The Maastricht 2-2000 Consensus Report. *Aliment Pharmacol Ther* **16** : 167-180, 2002.
- 日本ヘリコバクター学会ガイドライン作成委員会: *H. pylori* 感染の診断と治療のガイドライン. *日本ヘリコバクター学会誌* 2 (Suppl) : 1-12, 2000.
- 日本ヘリコバクター学会ガイドライン作成委員会: *H. pylori* 感染の診断と治療のガイドライン 2003年改訂版. *日本ヘリコバクター学会誌* 4 (Suppl) : 1-16, 2003.
- Suzuki N., et al.: Production and application of new monoclonal antibodies specific for a fecal *Helicobacter pylori* antigen. *Clin Diagn Lab Immunol* **9** : 75-78, 2002.
- 伊藤喜久ほか: *Helicobacter pylori* 便中抗原測定キット (HpSA) の有用性について. *医学と薬学* **44** : 137-142, 2000.
- 神谷茂ほか: 糞便中 *Helicobacter pylori* 抗原検出キット (HpSA) の基礎的評価 - その特異性およびココイドフォームとの反応性. *感染症誌* **76** : 378-384, 2002.
- Bravo L.E., et al.: Effects of Acid suppression and bismuth medications on the performance of diagnostic tests for *Helicobacter pylori* infection. *Am J Gastroenterol* **94** : 2380-2383, 1999.
- Vaira D., et al.: Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection with a new non-invasive antigen-based assay. *Lancet* **354** : 30-33, 1999.
- Trevisani L., et al.: Evaluation of a new enzyme immunoassay for detecting *Helicobacter pylori* in feces: A prospective pilot study. *Am J Gastroenterol* **94** : 1830-1833, 1999.
- Vakil N., et al.: Prospective blinded trial of a fecal antigen test for the detection of *Helicobacter pylori* infection. *Am J Gastroenterol* **95** : 1699-1701, 2000.
- Odera G., et al.: Detection of *Helicobacter pylori* in stool specimens by non-invasive antigen enzyme immunoassay in children: Multicentre Italian study. *Br Med J* **320** : 347-348, 2000.
- Ohkura R., et al.: Usefulness of a novel enzyme immunoassay for the detection of *Helicobacter pylori* in feces. *Scand J Gastroenterol* **35** : 49-53, 2000.
- 石塚 淳ほか: 便中抗原測定キットによる *Helicobacter pylori* 診断および除菌判定の試み. *日消誌* **96** : 1196, 1999.
- 福田能啓ほか: 糞便抗原検出キットによる *H. pylori* 感染診断. *Current Therapy* **18** : 1677-1681, 2000.
- Vaira D., Vakil N.: Blood, urine, stool, breath, money, and *Helicobacter pylori*. *Gut* **48** : 287-289, 2001.
- Tanaka A., et al.: Evaluation of *Helicobacter pylori* stool antigen test before and after eradication therapy. *J Gastroenterol Hepatol* **18** : 732-738, 2003.
- Vaira D., et al.: Noninvasive antigen-based assay for assessing *Helicobacter pylori* eradication. *Am J Gastroenterol* **95** : 925-929, 2000.
- Braden B., et al.: Comparison of new faecal antigen test with ¹³C-urea breath test for detecting *Helicobacter pylori* infection and monitoring eradication treatment: Prospective clinical evaluation. *Br Med J* **320** : 148, 2000.
- Costa F., et al.: Post-treatment diagnostic accuracy of a new enzyme immunoassay to detect *Helicobacter pylori* in stools. *Aliment Pharmacol Ther* **15** : 395-401, 2001.
- Vaira D., et al.: The stool antigen test for detection of *Helicobacter pylori* after eradication therapy. *Ann Intern Med* **136** : 280-287, 2002.
- Ishihara S., et al.: Diagnostic accuracy of a new non-invasive enzyme immunoassay for detecting *Helicobacter pylori* in stools after eradication therapy. *Aliment Pharmacol Ther* **14** : 611-614, 2000.
- Odaka T., et al.: Evaluation of the *Helicobacter pylori* stool antigen test for monitoring eradication therapy. *Am J Gastroenterol* **97** : 594-599, 2002.
- Forne M., et al.: Accuracy of an enzyme immunoassay for the detection of *Helicobacter pylori* in stool specimens in the diagnosis of infection and posttreatment check-up. *Am J Gastroenterol* **95** : 2200-2205, 2000.
- Vaira D., et al.: Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by HpSA test. *Lancet* **354** : 1732, 1999.
- 福田能啓ほか: *Helicobacter pylori* 感染診断における便中 *H. pylori* 抗原検出キット (テストメイトピロリ抗原 EIA) の有用性. 第8回日本ヘリコバクター学会抄録集: 105, 2002.
- Kato S., et al.: Accuracy of the stool antigen test for the diagnosis of childhood *Helicobacter pylori* infection: a multicenter Japanese study. *Am J Gastroenterol* **98** : 296-300, 2003.