

# 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ッコイドフォームとの反応性

<sup>1</sup>杏林大学医学部感染症学, <sup>2</sup>耳鼻咽喉科学

神谷 茂<sup>1)</sup> 山口 博之<sup>1)</sup> 大崎 敬子<sup>1)</sup>  
 豊田 篤<sup>2)</sup> 田口 晴彦<sup>1)</sup>

(平成 13 年 10 月 3 日受付)

(平成 14 年 3 月 5 日受理)

---

Key words : *Helicobacter pylori*, stool, coccoid form

---

### 要 旨

糞便中 *Helicobacter pylori* 抗原検出キット (HpSA) の基礎的評価を行った。 *H. pylori* 10 菌株および類縁菌 *H. mustelae* を含む他細菌 16 菌種 18 菌株を用いて本キットの特異性を調べた結果, *H. pylori* 菌株のみが陽性反応を示した。また, *H. pylori* の coccoid form は helical form と同様, 10 菌株全てが本試験にて陽性所見を示した。本 HpSA 試験が陽性となる最少 *H. pylori* 菌数は  $7.0 \times 10^3$  cfu であった。普通マウスおよび無菌マウスの糞便は HpSA 試験の反応性を軽度低下させたが, 糞便の凍結融解によりこの低下は部分的に回復した。一方, *H. pylori* 菌体と糞便を混和後, 凍結融解させた場合, HpSA 試験の感度は低下したが, coccoid form は helical form に比べ強い反応性を有していた。これらの結果により, HpSA キットは糞便中 *H. pylori* 抗原を検出するための簡便かつ感度・特異度に優れた検査法であることが明らかにされた。

[感染症誌 76 : 378 ~ 384, 2002]

### 序 文

*Helicobacter pylori* は胃炎を惹起するとともに, 非ステロイド性抗炎症剤 (NSAID) が関与しない胃十二指腸潰瘍の原因となる<sup>1)</sup>。また, 胃癌および胃 MALT (mucosa-associated lymphoid tissue) リンパ腫の発症への関連性が想定されている<sup>2,3)</sup>。

本菌の診断には胃生検材料を用いる侵襲的方法と同材料を用いない非侵襲的方法とがある。前者には組織診断法, 培養法, 迅速ウレアーゼ法, PCR 法などが含まれ, 後者には尿素呼吸テスト (urea breath test : UBT), 血清抗体検査, 尿中抗体検査, 糞便抗原検査などが含まれる。胃内視鏡検査

を必要としない非侵襲的検査法は大きな母集団での疫学的調査や特に内視鏡検査の施行が困難である小児を対象とした場合, 有用であることが知られている<sup>4,5)</sup>。

糞便抗原検査法は糞便内 *H. pylori* を検出するための *H. pylori* 特異的なポリクローナル抗体を固相化した酵素標識免疫吸着法 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) であり, 米国 Meridian 社により開発され, 現在 HpSA (*H. pylori* stool antigen test) キットとして市販されている。本検査法は胃生検材料を用いず糞便中の *H. pylori* 菌体抗原を検出するため, 抗体検査と異なり感染状況の直接評価が可能であるという長所をもつ。他の検査法と比較した場合の感度, 特異度より本

試験が優れたものであることが臨床的に報告されている<sup>6)-9)</sup>。本研究では HpSA キットの基礎的評価を行い細菌学的にその感度、特異性について検討を加えた。H. pylori は嫌気下の大腸内ではらせん状菌から球状菌(cocccoid form)に形態変化を行うため<sup>10)</sup>、H. pylori の cocccoid form の本キットにおける反応性について調べた。また、マウス糞便の本 HpSA 試験に及ぼす効果についても検討を加えた。

### 材料および方法

#### 1. 使用菌株

H. pylori 標準株 NCTC 11638 および臨床分離株 9 株 (TK 1025 ,TK 1027 ,TK 1028 ,TK 1029 ,TK 1036 ,TK 1046 ,TK 1047 ,TK 1054 ,および TK 1104) を用いた。他のヘリコバクター属細菌として H. mustelae NCTC 12032 株を用いた。ヘリコバクター属以外の細菌として *Campylobacter jejuni* ATCC 33560 株, *Campylobacter coli* NCTC 11366 株, *Escherichia coli* O-55 株, O4 : H6 株, *Salmonella* Enteritidis 11654 株, *Enterobacter* spp. 111 株, *Klebsiella pneumoniae* 7 29 09 株, *Proteus mirabilis* No. 1 株, *Citrobacter freundii* No. 1 株, *Streptococcus pyogenes* V80 14 株, *Streptococcus agalactiae* No. 1 株, *Staphylococcus aureus* 0040 株 (メチシリン耐性 : MRSA), *S. aureus* 1769 株 (メチシリン感受性 : MSSA), *Enterococcus faecalis* No. 1 株, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 株, *Clostridium butyricum* M588 株, *Clostridium difficile* VPI 10463 株の計 15 菌種 17 菌株を用いた。*Helicobacter*, *Campylobacter* の培養には 5% ウマ血液加ブレインハートインフュージョン (BHI) 寒天培地を用いて 37 3 日間微好気培養を行った<sup>11)</sup>。本培養には微好気ガス(O<sub>2</sub> 5%, CO<sub>2</sub> 10%, N<sub>2</sub> 85%)と、カンピロインキュベーター (平沢製作所, 大阪) を使用した。*Escherichia*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Citrobacter*, *Bacillus* についてはハートインフュージョン寒天培地を用いて, 37 1 夜好気培養を行った。*Streptococcus*, *Staphylococcus* については 5% ウマ血液加ハートインフュージョン寒天培地を用いて, 37 2 日間好気培養を行った。*Clostridium* については GAM 寒天培地を用いて,

37 2 日間嫌気培養を行った。本培養には嫌気ガス(H<sub>2</sub> 10%, CO<sub>2</sub> 10%, N<sub>2</sub> 80%)と嫌気グローブボックス (平沢製作所) を使用した。全ての使用菌液は濁度により約 10<sup>8</sup>cfu/ml に調整して HpSA 試験に供した。

#### 2. cocccoid form の調整

Yamaguchi ら<sup>12)</sup>の方法に従い H. pylori の cocccoid form を調整した。H. pylori 菌株を 5% ウマ血液加 BHI 寒天培地にて 37 4 日間微好気培養した。続いて本菌の発育した同培地を嫌気状態で 37 7 日間培養を続けた。本培養法により殆ど全ての H. pylori は形態的には球状化し, viable count は検出以下となった (データ未提示)。

#### 3. HpSA 試験

Premier Platinum HpSA キット (Meridian 社, 国内発売元テイエフビー社) を用い, キット内使用説明書に従って検査を行った。被験菌液 50μl を ELISA プレートに添加し, 引き続き西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗 H. pylori 抗原ポリクローナル抗体 (キット備品) 50μl を滴下した。30 秒間振盪後, 1 時間室温にてインキュベートした。20 倍希釈洗浄液 (キット備品) にて 5 回ウェルを洗浄した。基質 100μl (キット備品) を滴下し 30 秒間振盪させ, 10 分間室温にてインキュベートした。各ウェルに反応停止液 50μl を加え, 15 分以内にプレートリーダーにて OD<sub>450</sub> を測定した。判定は OD<sub>450</sub> 0.160 を陽性, OD<sub>450</sub> < 0.140 を陰性, 0.140 < OD<sub>450</sub> < 0.160 を保留とした。

#### 4. マウス糞便の HpSA 試験への影響

普通マウス (ICR 系, 雄, 10 週令 : 日本クレア) および無菌マウス (IQI/JIC 系, 雄, 10 週令 : 日本クレア) の糞便 1 ペレット (約 20mg) と H. pylori TK1029 株菌液 1ml とを混和し, その 50μl を上記の如く HpSA 試験に供した。また上記糞便を凍結融解した後, 同様に H. pylori TK1029 株菌液と混和し, その影響を調べた。更に, H. pylori TK1029 株菌液 (helical form および cocccoid form) の凍結融解後の HpSA 反応性を調べるために, H. pylori 菌液と上記糞便とを混和後, 凍結融解させ HpSA 試験に供した。本実験において, cocccoid form の菌数は嫌気培養前の helical form の菌数

Table 1 Specificity of stool antigen test (HpSA kit) for *Helicobacter pylori*

Strains tested	OD <sub>450</sub>
<i>H. pylori</i> ( 10 strains ) <sup>a)</sup>	1.288 ~ 2.351
<i>H. mustelae</i>	0.038
<i>C. jejuni</i>	0.024
<i>C. coli</i>	0.02
<i>E. coli</i> ( 2 strains )	0.015 , 0.019
<i>Salmonella</i> Enteritidis	0.096
<i>Enterobacter</i> sp.	0.016
<i>K. pneumoniae</i>	0.011
<i>P. mirabilis</i>	0.011
<i>C. freundii</i>	0.011
<i>S. pyogenes</i>	0.039
<i>S. agalactiae</i>	<0.010
<i>S. aureus</i> ( 2 strains )	<0.010
<i>E. faecalis</i>	0.056
<i>B. subtilis</i>	<0.010
<i>C. butyricum</i>	<0.010
<i>C. difficile</i>	0.052

a) helical form

(cfu) と定めた。

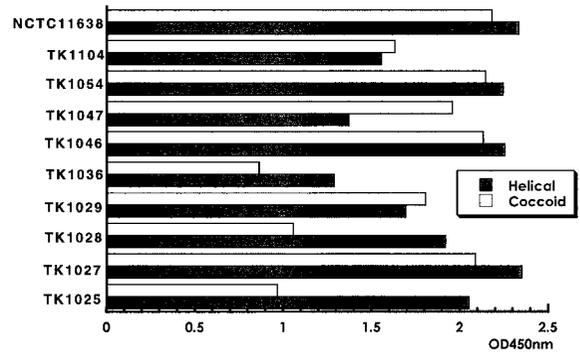
## 成績

### 1. HpSA キットの特異性

HpSA キットの特異性を *H. pylori* 10 菌株および *H. pylori* 以外の細菌 16 菌種 18 菌株を用いて調べた ( Table 1 ) . *H. pylori* 10 菌株 ( らせん状菌 ) は全て強陽性を示し, その OD<sub>450</sub> 値の範囲は 1.288 ~ 2.351 であった. ヘリコバクター属細菌である *H. mustelae* , *H. pylori* と同じ微好気性細菌である *C. jejuni* , *C. coli* の OD<sub>450</sub> 値はそれぞれ 0.038 , 0.024 , 0.020 であり全て陰性結果であった. 他の腸内細菌科細菌, *Streptococcus* , *Staphylococcus* , *Enterococcus* , *Bacillus* , *Clostridium* などの細菌も HpSA 試験での反応性は全て陰性であった. *Salmonella* Enteritidis は OD<sub>450</sub> 値 0.096 を示したが, 判定基準から陰性と判定された. これらの結果は HpSA キットが *H. pylori* に対して特異的であることを示している.

### 2. HpSA キットの *H. pylori* coccoid form との反応性

糞便内 *H. pylori* はその殆どが coccoid form に変化しているものと考えられるため, 本菌 coccoid

Fig. 1 Reactivity of helical and coccoid forms of *Helicobacter pylori* in stool antigen ( HpSA ) test.

form の HpSA 試験における反応性を調べた ( Fig. 1 ) . 被験 10 菌株の *H. pylori* の全てが coccoid form , helical form いずれの形態でも HpSA 試験にて陽性所見を示した. helical form 10 菌株の平均 OD<sub>450</sub> 値は, 1.90 ( 範囲 1.372 ~ 2.351 ) であり, coccoid form 10 菌株の平均 OD<sub>450</sub> 値 1.683 ( 範囲 0.864 ~ 2.183 ) より高値であった. HpSA 試験における OD<sub>450</sub> 値が, helical form の方が高かった菌株は, 10 菌株中 7 株 ( TK 1025 , TK 1027 , TK 1028 , TK 1036 , TK 1046 , TK 1054 , NCTC 11638 ) であった.

### 3. HpSA 試験の感度およびマウス糞便の HpSA 試験に及ぼす効果

糞便中に HpSA 試験を阻害もしくは促進する因子が存在するかどうかを検討するための基礎的実験として, 普通マウスおよび無菌マウス糞便を用いて HpSA 試験を行った ( Table 2 ) .

マウス糞便を添加しない状態で *H. pylori* ( helical form ) の菌数と HpSA 試験との結果を比較した. 本試験が陽性となる最少菌数は  $7.0 \times 10^3$  cfu であった.  $7 \times 10^4$  cfu の *H. pylori* を使用した場合, 普通マウス糞便 ( CV-feces ) および無菌マウス糞便 ( GF-feces ) の添加により OD<sub>450</sub> 値の低下 ( 対照値の 42.5% および 44.4% ) が認められた. 一方, CV-feces および GF-feces を凍結融解してから HpSA 試験を行った場合には, OD<sub>450</sub> 値は対照値の 64.6% および 66.8% であった.  $7.0 \times 10^3$  cfu の *H. pylori* を使用した場合にも同様の結果が得られた.

*H. pylori* 菌体 ( helical form および coccoid fo-

Table 2 Effect of mouse feces on stool antigen test( HpSA kit )for *Helicobacter pylori*

No. of <i>H. pylori</i> tested( CFU )	OD <sub>450</sub> in HpSA test when added with				
	None	GF-feces <sup>a)</sup>	GV-feces <sup>b)</sup>	GF-feces( FT ) <sup>c)</sup>	GV-feces( FT ) <sup>d)</sup>
7.0 × 10 <sup>5</sup>	> 2.500	> 2.500	> 2.500	> 2.500	> 2.500
7.0 × 10 <sup>4</sup>	1.957	0.868	0.832	1.264	1.309
7.0 × 10 <sup>3</sup>	0.325	0.106	0.082	0.165	0.186
7.0 × 10 <sup>2</sup>	0.042	0.032	0.021	0.029	0.02
7.0 × 10 <sup>1</sup>	0.019	0.007	0.013	0.018	0.001
7.0 × 10 <sup>0</sup>	0.021	0.004	0.011	0.011	0.004

- a )feces of germ free mouse
- b )afes of conventional mouse
- c )reeze-thawed faces of germ free mouse
- d )reeze-thawed faces of conventional mouse

Table 3 Effect of freeze-thawing on the reactivity of helical and coccoid forms of *Helicobacter pylori* in stool antigen tes( HpSA kit )

No. of <i>H. pylori</i> tested( CFU )	OD <sub>450</sub> of freeze-thawed samples containing			
	helical form		coccoid form	
	GF-feces <sup>a)</sup>	CV-feces <sup>b)</sup>	GF-feces	CV-feces
6.0 × 10 <sup>6</sup>	2.098	> 2.500	2.399	2.270
6.0 × 10 <sup>5</sup>	2.493	> 2.500	> 2.500	> 2.500
6.0 × 10 <sup>4</sup>	0.312	0.322	1.360	0.890
6.0 × 10 <sup>3</sup>	0.063	0.128	0.099	0.084
6.0 × 10 <sup>2</sup>	0.014	0.039	0.023	0.011
6.0 × 10 <sup>1</sup>	0.013	0.074	0.005	0.044
6.0 × 10 <sup>0</sup>	0.012	0.046	0.002	0.048

- a )feces of germ free mouse
- b )afes of conventional mouse

rm ) を CV-feces および GF-feces とともに凍結融解させ、HpSA 試験における反応性を調べた( Table 3 ) . 6.0 × 10<sup>4</sup> cfu の helical form を用いた場合、OD<sub>450</sub> は 0.312 と陽性を示した . この値は糞便のみを凍結融解させ、helical form を加えた場合 ( Table 2 ) に比べ低値であったことより、*H. pylori* を含む糞便を凍結融解することにより、HpSA 反応性が低下することが示された . 一方、6.0 × 10<sup>4</sup> 個の coccoid form を糞便と混和後、凍結融解させた場合の OD<sub>450</sub> は 1.360 と高値であった . これは coccoid form が凍結融解後も HpSA 試験において強い反応性を有することを示している .

平成14年 5月20日

## 考 察

*H. pylori* 感染診断のための新しい非侵襲的検査法である糞便抗原検査( HpSA 試験 )は内視鏡検査が不要であるため、廉価でかつ実施が簡便な診断法である<sup>6)-9)</sup> . HpSA 試験の臨床的評価が欧州へリコバクター研究グループの多施設調査により行なわれた<sup>7)</sup> . 侵襲的診断法を gold standard ( 培養陽性または組織診断陽性かつ迅速ウレアーゼテスト陽性 ) とした場合の HpSA 試験の感度、特異度はそれぞれ 93.8% ,96.9% であった . 優れた非侵襲的検査であると考えられている尿素呼気試験の感度、特異度が同じレポートにおいて 90.6% , 99.2% であったことにより、HpSA 試験はきわめて有用な検査法であると言える .

血清抗体検査は、*H. pylori* 感染の有無を調べる大量スクリーニング試験に頻用されてきた<sup>13)14)</sup> . HpSA 試験と同様、廉価で比較的簡便に施行できるという長所をもつが、抗体検査法であるため感染直後では偽陽性を示し、除菌から 12 カ月以内では偽陽性化しやすい欠点をもつ . HpSA 試験は *H. pylori* 抗原検出試験であるため、このような欠点はみられず、除菌治療後の除菌判定に尿素呼気試験とともに使用されることが期待される .

本研究では、HpSA キットの基礎的評価を目的とした . 本キットは *H. pylori* 10 菌株全てに陽性反応を示したが、類縁菌 *H. mustelae* , *C. jejuni* , *C. coli* を含む 16 菌種 18 菌株には反応しなかった .

Vaira ら<sup>15</sup>も、本キットの分析特異性を調べ、*H. mustelae*, *H. cinaedi*, *C. jejuni*, *C. coli*, *C. fetus*, *C. lari* を含む 37 菌種 43 菌株の腸内検出菌が全て陰性であったことを報告している。一方、久野ら<sup>16</sup>は糞便から分離される 20 菌種 20 菌株を用いて HpSA 試験の特異性を調べた結果、*C. jejuni* が陽性所見を示すことを明らかにした。*C. jejuni* の菌数と HpSA 試験の相関性を調べたところ、 $1.6 \times 10^8$  cfu/ml で陽性、 $1.6 \times 10^7$  cfu/ml では陰性であり、日常の糞便検査上においては本偽陽性反応は問題にならないとしている。本研究においては約  $10^8$  cfu/ml の *C. jejuni* を用いても HpSA 試験は陰性であったが、*C. jejuni* による偽陽性反応については今後更に検討されるべき課題である。今回の我々の結果からは HpSA 試験に用いられている固相化抗 *H. pylori* ポリクローナル抗体が *H. pylori* に特異的な優れたものであると考えられる。

本研究において HpSA 試験陽性を示す最少菌数が  $10^3 \sim 10^4$  cfu 程度であることが示された。本結果は  $10^3$  cfu 以下の *H. pylori* が糞便内に存在した場合、偽陰性結果を導き出す可能性をも提示している。久野ら<sup>16</sup>も  $3.6 \times 10^4$  cfu/ml の菌液では陰性、 $3.6 \times 10^5$  cfu/ml の菌液では陽性を示すことを報告している。これらの結果より、除菌治療の結果胃内 *H. pylori* 菌数が減少し、ひいては糞便内 *H. pylori* 菌数(殆どが coccoid form である)が、減少した場合、HpSA 試験による除菌判定には一定の限界があることが推測される。一方、HpSA 試験は抗原測定試験であり、たとえ *H. pylori* 菌体が死滅破壊されても、本検出反応は陽性となる。伊藤ら<sup>17</sup>は *H. pylori* 可溶性抗原を用いて HpSA 試験を行い、240ng/ml 以上の抗原液が陽性を示すことを報告した。菌数と可溶性抗原量との比較を行い、本 HpSA 試験の感度が評価されることが望まれる。

*H. pylori* は栄養枯渇、pH 変化、温度変化、嫌気状態、抗菌剤投与など様々な条件下で helical form から coccoid form へと形態変化を起こす。coccoid form は生きているが培養できない“viable but non-culturable (VNC)”菌であり、その菌数の測定は通常困難である。下痢便より *H. pylori* が分離培養できたとの報告があるが<sup>18,19)</sup>、下痢のため下部

消化管(大腸)内での滞留時間が短かったことが分離培養できた一因であると考えられている。また黒川ら<sup>20</sup>は coccoid form の本菌に熱ショック(42-30 秒)を加えた後、ピルビン酸塩を含んだ recovery 培地を用いて分離培養に成功している。

本 HpSA 試験において *H. pylori* 10 菌株の coccoid form は全て陽性所見を示した。糞便内の *H. pylori* は殆ど全て coccoid form となっているため、HpSA 試験は coccoid form である *H. pylori* が、その反応の対象となるものと考えられる。従来、HpSA キットの本菌 coccoid form との反応性についての研究はなされておらず、今回の我々の報告が初めてのものとなる。coccoid form は helical form に比べ HpSA 試験での反応性が平均 OD<sub>450</sub> 値を比較した場合軽度低下するという結果が得られた。*H. pylori* の helical form と coccoid form の菌体表層構造の違いについての詳細な検討はなされていない。Narikawa ら<sup>21</sup>は coccoid form における DNA cleavage による DNA 量の低下と菌体容量の減少を報告した。coccoid form による HpSA 試験の反応性低下は coccoid 化による菌体表層蛋白の変性や修飾によることが推測される。一方、coccoid form は helical form と同じくウレアーゼ活性を保持し、菌体蛋白の SDS-PAGE も同様のパターンを示すことが報告されている<sup>22)</sup>。Catharina ら<sup>23</sup>も *H. pylori* の 24hr および 168hr 培養後の菌体総蛋白量に helical form, coccoid form 間で大差ないことを報告している。これらより、coccoid form の HpSA 試験における反応蛋白は helical form と同程度存在していることが考えられる。

マウス糞便の HpSA 試験に及ぼす影響を調べた。普通マウスおよび無菌マウスの糞便はいずれも HpSA 試験の反応性を 58% および 56% 低下させた( $7.0 \times 10^4$  cfu 接種時)。普通マウスおよび無菌マウス糞便の間に反応性低下の点で差異は認められなかったことより、この低下現象にはマウス腸内フローラが関与しているものとは考えられない。腸内菌以外の糞便成分に本反応への抑制物質が含まれているものと考えられ、本抑制現象は糞便の凍結融解により部分的に消失することも明ら

かにされた。しかしながら、糞便と *H. pylori* 菌体とを混和させ、凍結融解後の HpSA 試験の感度は低下することより、臨床現場において採取糞便は凍結させることなく、低温保存することが好ましいと考えられる。また、本実験において coccoid form の方が helical form に比べ強い反応性を有していた理由は不明であるが、使用菌株 TK1029 の特異性 (Fig. 1 においても coccoid form の方が強い反応性をもつ) に一因があるとも考えられる。今後、*H. pylori* 非感染ヒト糞便を用いた検討が必要となる。

HpSA 試験の感度、特異性、coccoid form との反応性および糞便の本試験に及ぼす効果について基礎的評価を行った。既に臨床的成績が報告され、HpSA 試験がその簡便性と高い精度から優れた非侵襲性診断法であると評価されているが<sup>(6)~(9)</sup>、本研究においても本試験が高い特異性と感度をもつ有用な検査法であることが基礎的に評価された。

#### 文 献

- 1) Dunn BE, Cohen H, Blaser MJ : *Helicobacter pylori*. Clin Microbiol Rev 1997 ; 10 : 720 41.
- 2) Nomura A, Stemmermann GN, Chyou H, 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.
- 3) Parsonnet J, Hansen S, Rodriguez L, Gelb AB, Warnke RA, Jellum E, et al. : Helicobacter pylori infection and gastric lymphoma. N Engl J Med 1994 ; 330 : 1267 71.
- 4) Versalovic J, Lewandowski K : Helicobacter pylori update. Clin Microbiol Newsletter 1998 ; 20 : 107 13.
- 5) 加藤元嗣, 穂刈 格, 杉山敏郎, 浅香正博 : *H. pylori* 感染症の診断と除菌判定, 臨床医 2001 ; 27 : 28 33.
- 6) Vaira D, Malfertheiner P, Megraud F, Axon ATR, Deltenre M, Hirschl AM, et al. : Diagnosis of Helicobacter pylori infection with a new non-invasive antigen-based assay. Lancet 1999 ; 354 : 30 3.
- 7) Vaira D, Malfertheiner P, Megraud F, Axon ATR, Deltenre M, Gasbarrini G, et al. : Noninvasive antigen-based assay for assessing Helicobacter pylori eradication : a European multicenter study. Am J Gastroenterol 2000 ; 95 : 925 9.
- 8) Ohkura R, Miwa H, Murai T, Nagahara A, Ohta K, Sato K, et al. : Usefulness of a novel enzyme immunoassay for the detection of Helicobacter pylori in feces. Scand J Gastroenterol 2000 ; 35 : 49 53.
- 9) Manes G, Balzano A, Iaquinto G, Ricci C, Piccirillo MM, Giardullo N, et al. : Accuracy of the stool antigen test in the diagnosis of Helicobacter pylori infection before treatment and in patients on omeprazole therapy. Aliment Pharmacol Ther 2001 ; 15 : 73 9.
- 10) Bode G, Mauch F, Malfertheiner P : The coccoid forms of Helicobacter pylori. Criteria for their viability. Epidemiol Infect 1993 ; 111 : 483 90.
- 11) 大崎敬子, 山口博之, 田口晴彦, 神谷 茂 : 臨床検体からの *H. pylori* 培養について, Prog Med 1995 ; 15 : 2668 72.
- 12) Yamaguchi H, Osaki T, Takahashi M, Taguchi H, Kamiya S : Colony formation by Helicobacter pylori after long-term incubation under anaerobic conditions. FEMS Microbiol Lett 1999 ; 175 : 107 11.
- 13) Cutler A, Schubert A, Schubert T : Role of Helicobacter pylori serology in evaluating treatment success. Dig Dis Sci 1993 ; 38 : 2262 6.
- 14) Loy CT, Irwig LM, Katelaris PH, Talley NJ : Do commercial serological kits for Helicobacter pylori infectin differ in accuracy? A meta-analysis. Am J Gastroenterol 1996 ; 91 : 1138 44.
- 15) Vaira D, Malfertheiner P, Megraud F, Axon ATR, Deltenre M, Dixon M, et al. : A novel antigen assay based on stool specimen for Helicobacter pylori (HP) : European multicentre study. Gut 1998 ; 43 ( Suppl 2 ) : A2.
- 16) 久野 豊, 元吉 聡, 立花勇一, 大蔵隆一, 三宅一徳, 猪狩 淳 : 便中 *Helicobacter pylori* 抗原測定の有効性, 医学検査 2000 ; 49 : 828 32.
- 17) 伊藤喜久, 川上 訓, 佐藤貴一, 木平 健, 深澤啓子, 菅野健太郎 : 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 2000 ; 44 : 137 42.
- 18) Thomas JE, Gibson GR, Darboe MK, Kale A, Weaber LT : Isolation of Helicobacter pylori from human feces. Lancet 1992 ; 340 : 1194 5.
- 19) Parsonnet J, Shmueli H, Haggerty T : Fecal and oral shedding of Helicobacter pylori from healthy infected adults. JAMA 1999 ; 282 : 2240 5.
- 20) 黒川 学, 貫名正文, 仲西寿男, 富田周介, 田村俊秀, 下山 孝 : 培養不可能な状態 (VNC) の Helicobacter pylori の培養条件の検討, 感染症誌 1999 ; 73 : 15 9.
- 21) Narikawa S, Kawai S, Aoshima H, Kawamata O, Kawaguchi R, Hikiji K, et al. : Comparison of the

- nucleic acids of helical and coccoid forms of *Helicobacter pylori*. Clin Diag Lab Immun 1997 ; 4 : 285-90.
- 22) Nilium M, Strohle A, Bode G, Malfertheiner P : Coccoid like forms ( CLF ) of *Helicobacter pylori*. Enzyme activity and antigenicity. Int J Med Microbiol Virol Parasitol Infect Dis 1993 ; 280 : 259-72.
- 23) Lindholm C, Osek J, Svennerholm A-M : Quantification of conserved antigens in *Helicobacter pylori* during different culture conditions. Infect Immun 1997 ; 65 : 5376-80.

Microbiological Evaluation of *Helicobacter pylori* Stool Antigen Detection ( HpSA ) Kit ; Its Specificity and Reactivity with Coccoid form of *H. pylori*

Shigeru KAMIYA<sup>1)</sup>, Hiroyuki YAMAGUCHI<sup>1)</sup>, Takako OSAKI<sup>1)</sup>  
Atsushi TOYODA<sup>2)</sup> & Hiroyuki TAGUCHI<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Infectious Diseases, <sup>2)</sup>Department of Otolaryngology,  
Kyorin University School of Medicine

*Helicobacter pylori* stool antigen detection kit ( HpSA ) was microbiologically evaluated. All of the 10 strains of *H. pylori* showed positive result in HpSA test, but other bacteria of 16 species and 18 strains did not. In addition, the coccoid form of 10 *H. pylori* strains reacted positively with the HpSA kit as well as the helical form, although the OD<sub>450</sub> value was slightly lower than that of helical form in 7 out of 10 strains examined. The minimum number of *H. pylori* showing positive reaction in HpSA test was  $7.0 \times 10^3$  cfu. Feces of both conventional and germ free mice inhibited partially the reaction of *H. pylori* with HpSA kit, but this decrease in the reactivity was recovered by freeze-thawing of the feces. In contrast, freeze-thawing of the mice feces with *H. pylori* decreased the sensitivity in HpSA test, but it was also shown that coccoid form had a stronger reactivity than helical form. These results indicate that the HpSA kit is a rapid and useful diagnostic method for detection of *H. pylori*, particularly its coccoid form, in the fecal specimens.