

資料

豚熱エライザ S/P 値による中和抗体価推定表の作成

小 林 憲一郎

(長野県佐久家畜保健衛生所)

Kobayashi, K. (2022). Estimation of classical swine fever neutralizing antibody titer by ELISA S/P value

Proc. Jpn. Pig Vet. Soc. 80, 12-16.

キーワード：豚熱，エライザ，中和抗体価，Receiver operating characteristic analysis，推定表

2018年9月、岐阜県において国内で26年ぶりとなる豚熱が発生した。その後、愛知県、長野県、大阪府、滋賀県、三重県、福井県及び埼玉県の養豚場で豚熱が連続発生を受けて、長野県では2019年10月から豚熱ワクチンの接種を開始した。しかし、全国的な豚熱発生状況を見ると、豚熱ワクチン接種農場において豚熱の発生が継続している⁹⁾。農場の初回ワクチン接種以前に生まれた繁殖豚（第1世代）と、ワクチン接種から30日以上経過してから生まれた繁殖豚（第2世代以降）では、抗体の保有状況が異なっており、第2世代では抗体分布のばらつきが大きく、抗体価の低い個体も増加していることが報告されている⁷⁾。第1世代と第2世代が混在している農場では、子豚の移行抗体の保有状況のばらつきが大きくなり、ワクチン接種適齢期の幅が広がると推測される。豚熱ワクチンは生ワクチンであるため、ワクチンテイク（テイク）は移行抗体の影響を受ける¹¹⁾。ワクチン接種時の移行抗体が中和抗体価16倍以下であれば、全ての個体がワクチンによる免疫を獲得することが示されている¹¹⁾。また、野外応用試験において、ワクチン接種時の移行抗体が128倍以下であれば、高率に免疫を獲得することが示されている¹¹⁾。繁殖豚の世代交代が進んでいる農場においては、繁殖豚の抗体保有状況を考慮し、ワクチン接種時期についてより柔軟に対応することが求められる⁷⁾。

「豚熱に関する特定家畜伝染病防疫指針」（指針）の基準である⁸⁾、8割のテイク率を実現するには、移行抗体がテイクを見込める値まで減少してからワクチン接種をしなければならない。しかし、移行抗体が減少するにつれて、子豚群の免疫も低下する。子豚群の免疫を維持しながら8割のテイクを達成するためには、限

られた接種適齢期にワクチンを接種することが必要である。現在のように、農場によって繁殖豚の抗体分布が異なる状況では、子豚のワクチン接種は農場ごとの子豚の移行抗体保有状況に応じて、適切な時期に行うことが重要である⁷⁾。そのためには、各農場における子豚の移行抗体保有状況を調査することが必要である。

指針では、豚熱の抗体検査方法として、中和試験（NT）とエライザ法が示されている⁸⁾。エライザ法は多検体処理に適した方法で簡便なことから、ワクチン接種農場における免疫付与状況等確認検査（確認検査）などに広く活用されているが、抗体量は測定できない。一方で、NTは作業が煩雑で検査に時間を要するが、抗体量を測定できることから、ワクチン接種適齢期の推定に活用されている。

ワクチン接種を実施している全ての農場の移行抗体の保有状況を知るため、NTを行うことは多大な労力を要する。中根らは、市販の豚熱エライザキット（エライザキット）のS/P値と中和抗体価との間に相関関係があることを報告している¹⁰⁾。そこで、筆者は豚熱ワクチンの接種適齢期をより簡易的に判定するため、エライザ法のS/P値から中和抗体価を推定するための表（推定表）を作成した。推定表は、野外の検体について行ったエライザ法のS/P値と、NTの中和抗体価をもとに作成した。推定表は中和抗体価とS/P値の単回帰分析、4係数のロジスティック曲線による非線形回帰分析⁶⁾及びReceiver operating characteristic analysis（ROC解析）により作成した⁵⁾。また、3つの方法により作成した推定表を用いてエライザ法のS/P値から推定した中和抗体価（推定値）と実際のNTによる測定結果（実測値）の一致度について κ 係数を求めて比較し、推定表が接種適齢期の推定に利用可能か検討した。

材料及び方法

推定表の作成：確認検査のため、長野県内の養豚場において2019年10月から2021年3月に採取した豚血清のうち、エライザ法とあわせてNTを実施した656検体のデータを用いた。エライザ法及びNTは、指針の規定に準じて実施した⁸⁾。すなわち、エライザ法は、エライザキット（豚熱エライザキットⅡ、株式会社ニッポンジーン、日本）を用いて、添付の使用説明書に従って実施した。NTは、56℃ 30分間非働化した豚血清を2～2048倍に2倍階段希釈したのち、CPK-NS細胞と豚熱ウイルス GPE⁻株を使用したマイクロプレート法で実施した。検査は長野県松本家畜保健衛生所で行った。

推定表の作成にあたっては、単回帰分析及び4係数ロジスティック回帰曲線による非線形回帰分析により、それぞれモデルとなる方程式を求めて中和抗体価2～2048倍に相当するS/P値を計算した。また、ROC解析により中和抗体価2～2048倍それぞれに対応するS/P値のカットオフ値を求めた⁵⁾。ROC解析のカットオフ値は、中和抗体価2倍の場合、656検体のうち中和抗体価2倍未満を陰性、2倍以上を陽性と判定したときに、感度と特異度の和が最大となるS/P値とした。中和抗体価4～2048倍も同様にカットオフ値を設定した。これら3つの方法により推定表を作成した。

単回帰分析及びROC解析は統計解析ソフトEZR（自治医科大学さいたま医療センター、日本）を用いた⁴⁾。非線形回帰分析は統計解析ソフトR（R Core Team, Austria）を使用した。

一致度の比較：推定表の作成に使用した検体とは別の豚血清252検体を使用して、推定値と実測値の一致度を比較した。2021年4～9月に長野県佐久家畜保健衛生所管内の8養豚場で実施した確認検査のうち、エライザ法とあわせてNTを実施した252検体のデータを用いた。エライザ法及びNTは、推定表の作成と同じ方法により実施した。エライザ法のS/P値をもとに、中和抗体価2倍未満～2048倍以上までの12段階の推定値をそれぞれ求め、実測値との一致度を評価した。全体の一致度については、重み付けκ係数により評価した³⁾。重み付けκ係数の計算はRを用いた。また、中和抗体価2～2048倍それぞれにおける推定値と実測値の一致度を、κ係数を求めて評価した²⁾。実測値と推定値の一致度の計算にあたっては、目的とする中和抗体価±1管までを許容範囲とした。すなわち、中和抗体価4倍の検体の一致度を求める場合は、中和抗体価

2～8倍の検体を一致する検体としてκ係数を計算した。また、それぞれの中和抗体価における推定値の感度及び特異度を求めた。さらに、子豚において豚熱ワクチンのテイクが見込まれる移行抗体量である、中和抗体価2～16倍又は2～128倍の範囲の検体における実測値と推定値の一致度についてκ係数、陽性的中率及び陰性的中率を求めた。陽性的中率と陰性的中率から、検体の8割が中和抗体価2～16倍又は2～128倍となると予想される推定値の割合を求めた。κ係数の計算にはEZRを用いた。また、κ係数の評価はByrtが提唱した基準に従った¹⁾。

結果

推定表の作成：単回帰分析の結果は式1となった。決定係数（R²）は0.85であった（図1）。

$$S/P \text{ 値} = 0.102 \log_2 \text{中和抗体価} - 0.093 \quad (\text{式1})$$

非線形回帰分析の結果は式2となった。

$$S/P \text{ 値} = 1.675 - 1.654 / (1 + (\log_2 \text{中和抗体価} / 8.531)^{2923}) \quad (\text{式2})$$

また、ROC解析により、各中和抗体価に相当するS/P値のカットオフ値を求めた。これらの結果をもとに、推定表を作成した（表1）。

一致度の比較：252検体の実測値ごとの検体数とS/P値の分布、推定値と比較した際の感度、特異度を表2に示す。

全体の一致度は、単回帰分析による推定値がκ = 0.83、非線形回帰分析及びROC解析による推定値がκ = 0.88で、全てVery good agreement（0.81～0.92）の範囲であった¹⁾。

推定値2倍未満～2048倍以上について、各中和抗体価の推定値と実測値の一致度を図2に示す。単回帰分析のκ係数は0.19～0.63、非線形回帰分析のκ係数は0.18～0.79、評価はPoor agreement（0.01～0.20）からGood agreement（0.61～0.80）の範囲であった。これに対して、ROC解析のκ係数は0.22～0.83で、Slight agreement（0.21～0.40）からVery good agreementの範囲であった。中和抗体価1024倍以下に限定すると、単回帰分析のκ係数は0.19～0.63でPoor agreementからGood agreementの範囲であった。非線形回帰分析のκ係数は0.32～0.79で、Slight agree-

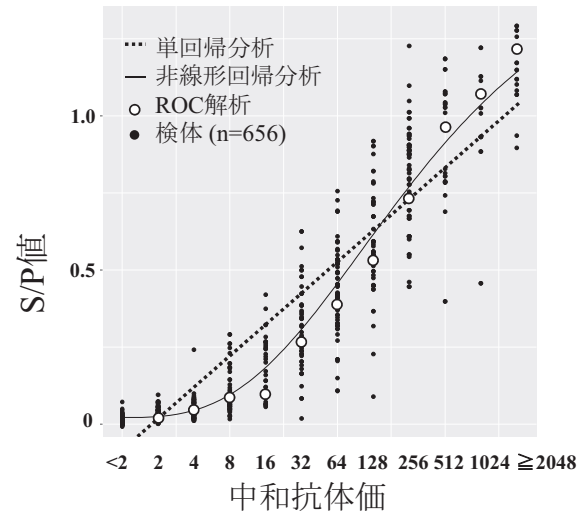


図1 豚熱エライザ S/P 値と中和抗体価の分布

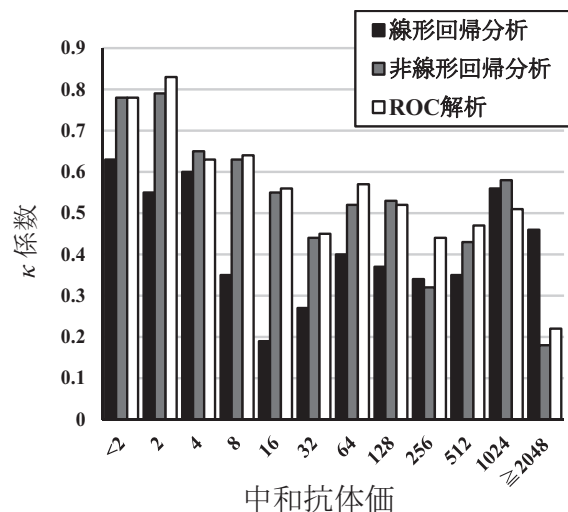


図2 中和抗体価の推定値と実測値の一致度(n =252)

表1 中和抗体価ごとの豚熱エライザS/P値と、S/P値に基づく中和抗体価の推定

中和抗体価	n	平均 ± 標準偏差	単回帰分析	非線形回帰分析	ROC解析
			S/P値	S/P値	S/P値
< 2	118	0.012 ± 0.012	< 0.009	< 0.024	< 0.017
2	77	0.032 ± 0.020	0.009-0.112 ^a	0.024-0.044	0.017-0.047
4	66	0.048 ± 0.034	0.112-0.214	0.044-0.095	0.047-0.083
8	54	0.103 ± 0.074	0.214-0.316	0.095-0.184	0.083-0.099
16	33	0.190 ± 0.099	0.316-0.418	0.184-0.308	0.099-0.271
32	49	0.315 ± 0.137	0.418-0.520	0.308-0.457	0.271-0.394
64	70	0.444 ± 0.138	0.520-0.622	0.457-0.615	0.394-0.536
128	55	0.591 ± 0.173	0.622-0.724	0.615-0.771	0.536-0.726
256	63	0.804 ± 0.162	0.724-0.826	0.771-0.913	0.726-0.969
512	33	0.926 ± 0.196	0.826-0.928	0.913-1.037	0.969-1.082
1024	17	0.962 ± 0.218	0.928-1.030	1.037-1.142	1.082-1.222
≥ 2048	21	1.157 ± 0.109	≥ 1.03	≥ 1.142	≥ 1.222
合計	656				

^a 最小値以上-最大値未満

表2 各推定表をもちいて252検体のS/P値から求めた中和抗体価推定値の感度・特異度

中和抗体価	n	S/P値		単回帰分析		非線形回帰分析		ROC解析	
		平均	± 標準偏差	感度	特異度	感度	特異度	感度	特異度
< 2	14	0.007	± 0.005	0.97	0.89	0.86	0.96	0.86	0.96
2	15	0.038	± 0.033	0.96	0.79	0.87	0.95	0.87	0.97
4	16	0.094	± 0.089	0.95	0.78	0.68	0.94	0.54	0.99
8	28	0.163	± 0.136	0.56	0.81	0.76	0.89	0.73	0.91
16	22	0.247	± 0.194	0.36	0.82	0.71	0.84	0.66	0.89
32	36	0.452	± 0.224	0.42	0.84	0.66	0.78	0.70	0.77
64	31	0.510	± 0.210	0.50	0.88	0.69	0.83	0.72	0.84
128	33	0.613	± 0.173	0.46	0.88	0.66	0.86	0.75	0.79
256	25	0.803	± 0.206	0.42	0.89	0.50	0.82	0.69	0.78
512	14	0.947	± 0.301	0.43	0.90	0.51	0.91	0.59	0.89
1024	10	0.975	± 0.128	0.75	0.90	0.66	0.94	0.53	0.95
≥ 2048	8	1.014	± 0.211	0.72	0.91	0.22	0.95	0.22	0.97

表3 子豚の豚熱ワクチンに適した中和抗体価の実測値と推定値の一致率、陽性的中率及び陰性的中率

中和抗体価 (最小値-最大値)	線形回帰分析				非線形回帰分析				ROC解析			
	κ 係数	PPV	NPV	(A)	κ 係数	PPV	NPV	(A)	κ 係数	PPV	NPV	(A)
2-16	0.62	0.64	0.96	1.26	0.71	0.80	0.91	1.01	0.76	0.84	0.92	0.95
2-128	0.59	0.88	0.73	0.87	0.60	0.89	0.70	0.84	0.65	0.91	0.73	0.83

(A): 8割の検体が中和抗体価2-16倍又は2-128倍となると予想される推定値2-16倍又は2-128倍の検体の割合

PPV:陽性的中率、NPV:陰性的中率

ment から Good agreement、ROC 解析の κ 係数は0.44～0.83で Fair agreement から Very good agreement であった。

子豚のワクチンテイクが見込まれる範囲の移行抗体の実測値と推定値の一致度、陽性的中率及び陰性的中率を表3に示す。ROC 解析による推定値と実測値の一致度が、中和抗体価2～16倍の場合 ($\kappa = 0.76$) と、2～128倍の場合 ($\kappa = 0.65$) とともに他の2つの推定表と比較して高く、評価は Good agreement であった。また、ROC 解析による推定表では、推定値2～16倍の割合が0.95となった場合、8割の検体が実測値2～16倍になると予想された。また、推定値2～128倍の割合が0.83となった場合、8割の検体が実測値2～128倍になると予想された。

考察

26年ぶりとなる豚熱の国内発生を受けて、豚熱ワクチンの接種を開始してから2年が経過し、各農場の母豚における抗体保有状況にばらつきがあることがわかってきた⁷⁾。そのような状況において、豚熱ワクチンの子豚へ適切に接種するためには、各農場の子豚の移行抗体の保有状況を調査する必要がある。そこで今回、筆者は多検体処理に適したエライザ法の S/P 値を基に、中和抗体価を簡易的に推定する推定表を作成した。

推定表の作成のため、単回帰分析、非線形回帰分析⁶⁾及び ROC 解析を実施して、各中和抗体価に対応する S/P 値を求めた。推定表は、推定値と実測値との一致度が高いことが求められる。そこで、実測値と3つの方法により求めた推定値を比較したところ、単回帰分析に比べて非線形回帰分析と ROC 解析による推定値の一致度が高かった。また、中和抗体価1024倍以下の ROC 解析による推定値と実測値の一致度は、0.4 (Fair agreement) 以上であったが、他の2つの方法は0.4を下回る一致度が見られたことから、中和抗体価1024倍以下において、ROC 解析による推定表の信頼性が高い

と判断した。とくに、ROC 解析では中和抗体価2倍の κ 係数が0.83であり、Byrt の基準で Very good agreement であったことから、ROC 解析による推定値は、低濃度の中和抗体価の推定に適していると考えられた。しかし、ROC 解析による推定値2倍未満の感度は0.86、特異度は0.96であった。このことは、S/P 値0.017未満の個体の14%は実測値が2倍以上、0.017以上の個体の3%は実測値が2倍未満であったことを示している。このことから、厳密な判断を要する場合などは NT を行う必要があると考察した。

単回帰分析による推定表では、中和抗体価2倍のときの κ 係数が他の2つの方法に比べて低かった。このことは、エライザ法において、中和抗体価2倍は単回帰式に近似しない区間であることが原因と推察した。また、単回帰分析による推定値8～32倍のときの κ 係数が、他の2つの方法に比べて低いのは、単回帰分析のモデルが実際の S/P 値の分布に適合していないことを反映しているためと思われる(図1)。単回帰分析に比べて、非線形回帰分析の重みづけ κ 係数が高いことから、S/P 値と中和抗体価の関係は、単回帰よりもロジスティック曲線に近いものと推察される。

3つの推定表全てにおいて、16倍以上の κ 係数は0.60以下であった。中和抗体価の上昇に伴い、S/P 値の標準偏差は増加している(表1、表2)。近接する中和抗体価の S/P 値の分布に重なりが見られたことから、S/P 値を基準として明確に推定値を判別することが難しいことが、 κ 係数が低下した原因と考えられる。とくに、中和抗体価16倍以上における推定値は、8倍以下よりも一致率が低いことに注意が必要である。しかし、ワクチンテイクが見込まれる中和抗体価2～16倍又は2～128倍の推定値と実測値の κ 係数はともに0.6以上 (Good agreement) であったことから、S/P 値による中和抗体価の推定は、一定の精度を有することが示された。他の2つの推定表よりも一致度が高い、ROC 解析による推定表を使用することで、より NT に近い結果が得られることが期待される。

豚熱ワクチン接種適齢期を推定するにあたり、S/P値と中和抗体価の分布から、推定値をそのまま中和抗体価と見なすことは難しいことが示唆された。しかし、本研究で得られたように、陽性的中率と陰性的中率を用いることで、8割の検体が、ある一定の中和抗体価の範囲内に収まるために必要な、推定値の検体数を求めることができる。このような工夫により、エライザ法のS/P値が子豚のワクチン接種適齢期の推定に利用可能となることが示唆された。

中和抗体価とS/P値の一致状況については検査機関ごとに異なっている可能性があるため、今回作成した推定表が他の検査機関で準用可能かについては、検査機関ごとに検討する必要がある。

本研究では、エライザ法の結果から中和抗体価を推定する推定表を作成した。ROC解析により作成した推定表は、他の方法と比較して実測値との一致度が良好であった。このことから、多検体処理が可能なエライザ法を、移行抗体保有状況の調査に応用可能と考えられた。現在、豚熱ワクチン接種農場で発生している豚熱の多くが、哺乳豚または離乳豚での発生である。本研究の成果を活用することで、より多くの農場で各農場の接種適齢期にあわせた豚熱ワクチン接種が可能となり、農場での豚熱発生リスクが低減されることが期待される。

利益相反状態の有無

著者は開示すべき利益相反はない。

引用文献

- 1) Byrt T (1996) How good is that agreement? Epidemiology, 7: 561.
- 2) Cohen J (1960) A coefficient of agreement for nominal scales. Educ Psychol Meas, 20: 37-46.
- 3) Cohen J (1968) Weighted Kappa. Psychol Bull, 70: 213-220.
- 4) Kanda Y (2013) Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZ' for medical statistics. Bone Marrow Transplant, 48: 452-458.
- 5) 神田善伸 (2015) 定性・定量テストの正確度の評価. EZR でやさしく学ぶ統計学 第2版, p279-292, 中外医学社, 東京.
- 6) Karpinski KF, et al. (1987) Statistical considerations in the quantitation of serum immunoglobulin levels using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). J Immunol Methods, 103: 189-194.
- 7) 農林水産省 (2021) 飼養豚への豚熱ワクチン接種後の免疫付与状況等について https://www.maff.go.jp/j/council/seisaku/eisei/usibuta_sippe/78/attach/pdf/index-7.pdf (2022年3月13日閲覧)
- 8) 農林水産省 (2021) 豚熱に関する特定家畜伝染病防疫指針 (令和3年10月1日一部改訂) https://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/katiku_yobo/k_bousi/ (2022年3月13日閲覧)
- 9) 農林水産省 (2021) 豚熱ワクチン接種農場における豚熱の患畜確認に伴う今後の発生予防対策 (提言) <https://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/csf/attach/pdf/domestic-29.pdf> (2022年3月13日閲覧)
- 10) 中根崇ら (2002) 新たに開発された ELISA キットと中和試験による豚コレラウイルス抗体検出の比較. 日獣会誌, 55: 783-788.
- 11) 豚コレラ防疫史編集委員会 (2009) 豚コレラ防疫史. p88-122, 全国家畜畜産物衛生指導協会・畜産技術協会, 東京.