

豚熱 ELISA 検査における中和試験 1 倍のカットオフ値の検討

東部家畜保健衛生所 柏倉将斗

【はじめに】

現在、北海道を除く 46 都府県で飼養豚に対する豚熱ワクチン接種が行われており、その免疫付与状況を確認するための検査として、豚熱に関する特定家畜伝染病防疫指針（以下、「指針」という。）では次のことを定めている。

(1) ワクチン接種から少なくとも 40 日以上経過した個体の血清を用いて、抗体検査（原則として ELISA 検査）を実施すること。(2) ELISA 検査で陰性の個体について、可能な限り中和試験を実施し、中和抗体価 1 倍以上を陽性と判定すること。(3) これらの検査において、抗体陽性率が 8 割に満たない豚舎又は接種群は、国と協議の上、原則としてワクチンの追加接種を行うこと。

ELISA 検査は比較的簡単な検査で、短時間で結果が出るが感度に乏しく、ELISA 検査で陰性でも中和試験では陽性となる個体が一定割合存在する（【図 1】）。一方で中和試験は精密であるが手技が難しく、また判定までに時間を要する。

ELISAと中和試験について

	ELISA検査	中和試験
手技	簡単	難しい
検査時間	100分程度	10日～2週間
検査結果	簡易的。ELISA陰性でも中和試験陽性個体が一定割合存在	精密。ELISAで検出可能な抗体価も検出可能

参考：豚熱エライザキットIIの製品ページ（ニッポンジーンHP）

		中和抗体価									
		<1	1	2	4	8	16	32	64	…	2048
ELISA結果	陽性	0	2	2	9	10	26	36	82	…	8
	疑陽性	1	5	2	4	2	0	0	0	…	0
	陰性	455	9	6	0	1	0	0	0	…	0

ELISA陰性でも、中和抗体価（1倍～8倍）を有している個体がいる

【図 1】ELISA と中和試験について

実際に検査において ELISA 検査で抗体陽性率が 6 割程度であることは時々あり、そのような場合には大きく 2 つの対応が考えられる。

一つ目は直ちにワクチンの追加接種を行う場合で、速やかに免疫が付与されるため、豚熱発症のリスクは下げられる一方で、接種にかかるコストや労力の負担が生じる。また、中和試験の結果次第では追加接種が不要となることもある。

二つ目に、追加接種の前に中和試験を行うという選択肢がある。ただし、結果判定までに時間を要するため、中和試験の結果免疫付与率 8 割に満たなかった場合は感染リスクが高い状態を長期化させることになってしまい、どちらの選択肢を取るか、判断は難しいと言える。

今回、養豚農家にとってより良い選択肢を提供できるよう、ELISA 検査の結果から中和試験の結果を推測するための判断基準を検討したため、報告する。

【材料と方法】

調査対象は、令和 4 年 10 月から令和 5 年 9 月までの豚熱免疫付与状況確認検査において、ELISA 検査で陰性となり中和試験を実施した県内農場の肥育豚全検体（n=1173）とした。中和抗体価は 1 倍未満、1 倍、2 倍、4 倍以上のいずれかで判定し、指針に則って中和抗体価 1 倍以上を陽性とした。

なお、すべての解析と有意差検定には統計ソフト「EZR」を利用し、有意差検定は、 $p < 0.05$ で有意差ありとした。

(1) カットオフ値について (【図2】)

今回の検討では、カットオフ値を、「中和試験陽性を真の陽性とした場合に、感度と特異度を最適にする値」と定義した。つまり ELISA 検査 S/P 値 (以下「S/P 値」) がこの値以上なら陽性、未満なら陰性と判定する、境目の値ということになる。感度は中和試験陽性の個体を「陽性」と正しく判定する確率、特異度は中和試験陰性の個体を「陰性」と正しく判定する確率である。

S/P 値とカットオフ値により中和試験陽性と判定される検体のうち、実際には中和試験陰性のものを「偽陽性」、反対に S/P 値とカットオフ値により中和試験陰性と判定される検体のうち、実際には中和試験陽性のものを「偽陰性」と表す。

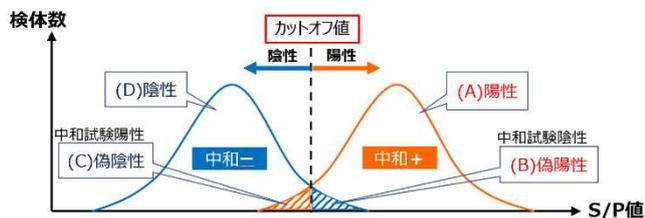
(2) κ (カッパ) の係数について (【図3】)

κ の係数は、2つの検査の結果がどの程度一致しているかを示す係数で、1に近いほど一致度が高いと判断される。今回の検討では「設定したカットオフ値による判定と中和試験の結果がどの程度一致しているか」を表している。

カットオフ値とは？

カットオフ値 =
中和試験陽性を真の陽性とし、感度と特異度を最適にする値
(今回の調査では抗体陽性・陰性の境目となる S/P 値)

- ・感度：中和試験陽性個体を「陽性」と判定する確率 (能力)
- ・特異度：中和試験陰性個体を「陰性」と判定する確率 (能力)



【図2】カットオフ値について

κ (カッパ) の係数とは？

- ・2つの検査の結果がどの程度一致しているかを示す係数
- ・偶然一致している確率を考慮して、一致具合を評価
- ・「設定したカットオフ値による判定と中和試験の結果がどの程度一致しているか」

K係数	判断の目安
0~0.2	わずかな一致
0.2~0.4	やや一致
0.4~0.6	中程度に一致
0.6~0.8	かなり一致
0.8~1.0	ほぼ完全に一致

【図3】カッパの係数について

(3) ROC 曲線について

ROC 曲線は、カットオフ値を変えながらそれぞれの値における感度と特異度をプロットした曲線で、感度と特異度を最適にするカットオフ値を算出することができる。

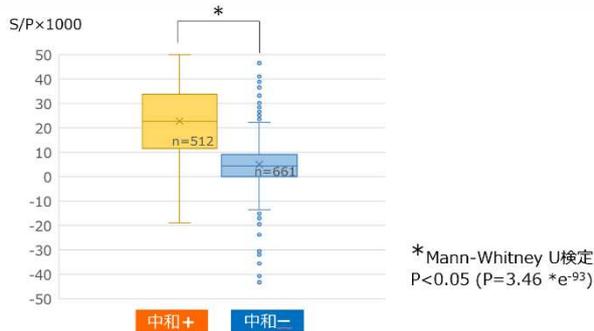
【検証結果のまとめと今後の課題】

中和試験陽性群と陰性群を比較したところ、中和試験陽性群の S/P 値は、陰性群よりも有意に高い結果となった (【図4】)。

今回調査した全検体について、ROC 曲線を作成しカットオフ値を算出したところ、中和抗体価 1 倍のカットオフ値は 0.010773、 κ の係数は 0.58 となった。(【図5】)

これらの結果を踏まえ、ELISA 検査で陰性でも S/P 値が 0.010773 以上であれば、中和試験陽性と判断して良いとの仮説を立てた。

結果① 中和試験陽性（1倍以上）と陰性（1倍未満）の群間で S/P値に有意な差があるか？



中和試験陽性群のS/P値は、陰性群よりも有意に高かった

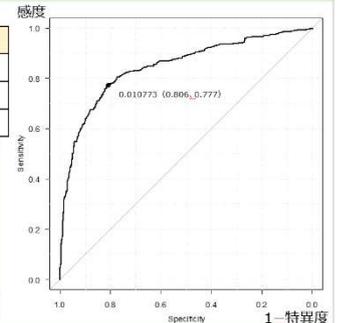
【図4】中和抗体価と S/P 値の相関

結果② 中和抗体価1倍のカットオフ値、κの係数

	中和+	中和-	合計
ELISA+	398	128	526
ELISA-	114	533	647
合計	512	661	1173

感度=77.7%
特異度=80.6%
陽性的中度=75.7%
陰性的中度=82.4%

※それぞれ×100で%表示



中和陽性を1倍以上とした場合、ROC曲線よりカットオフ値は0.010773、κの係数は0.58

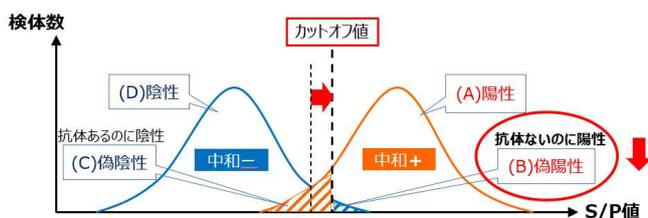
【図5】中和抗体価1倍のカットオフ値、κの係数

一方、豚熱発生予防の観点からは、「偽陽性」個体をできる限り減らす必要がある。このためには、カットオフ値を上げ、特異度を大きくする必要がある。（【図6】）

カットオフ値を上げていった場合の特異度を比較した（【図7】）。カットオフ値を上げていくと感度とκの係数は小さくなるが特異度は大きくなり、カットオフ値を0.020に設定すると特異度が94%と90%を超えた。

最適なカットオフ値の設定

- ・感度：抗体がある個体を「陽性」と判定する確率（能力）
- ・特異度：抗体がない個体を「陰性」と判定する確率（能力）



豚熱発生予防のためには「抗体ないのに陽性」を減らす
→カットオフ値を上げ、特異度を大きくする必要がある！

【図6】最適なカットオフ値の設定

考察① カットオフ値ごとの特異度比較

	カットオフ値0.010773		カットオフ値0.015		カットオフ値0.020	
	中和+	中和-	中和+	中和-	中和+	中和-
ELISA+	398	128	337	75	280	39
ELISA-	114	533	175	586	232	622

カットオフ値	感度	特異度	陽性的中度	陰性的中度	κ係数
0.010773	0.78	0.81	0.76	0.82	0.58
0.015	0.68	0.89	0.82	0.77	0.56
0.020	0.55	0.94	0.88	0.73	0.51

カットオフ値0.020で特異度が90%を上回る

【図7】カットオフ値ごとの特異度比較

調査対象とした全検体について、中和試験陽性検体と陰性検体の分布をヒストグラムを作成して確認したところ、はじめにカットオフ値として算出した0.010付近では中和試験陰性検体が陽性検体よりも多く、0.015付近で同程度、0.020付近で陽性検体が上回る結果となった。（【図8】）

考察② 中和陽性・陰性検体のS/P値分布 (全頭)



- S/P=0.010付近では中和陰性検体数が多い
S/P=0.010~15で同程度
- S/P=0.015~20で陽性検体数が上回る

【図8】中和抗体とS/P値の分布について

考察③ カットオフ値ごとの中和試験陽性的集中度比較

・今回調査対象とした全検体 (n=1173) について、2パターンのカットオフ値を設定した場合の、実際の中和試験陽性度を比較

カットオフ値0.010773

中和陽性	398
中和陰性	128

約24%は抗体ないのに陽性と判定してしまっている・・・

ELISAと中和試験の陽性的集中度：75.7%

カットオフ値0.020

中和陽性	281
中和陰性	39

陰性の見逃しが減った！

ELISAと中和試験の陽性的集中度：87.8%

【図9】カットオフ値ごとの中和陽性率比較

次に、今回調査対象とした全検体について、2通りのカットオフ値を設定した場合に、ELISAと中和試験の陽性的集中度を比較した。(【図9】)

カットオフ値を0.010773とすると的中度は75.7%、つまり約24%の中和試験陰性検体を「陽性」と判定してしまうが、カットオフ値を0.020に上げると的中度は87.8%となり、中和試験陰性検体の見逃しを減らすことができた。

以上の結果から、速やかにワクチンの追加接種を行うか、中和試験を実施するか判断の目安をS/P値0.020とすることとした。

現在本県では、いわゆる第二世代母豚とよばれる中和抗体価が低い母豚の比率が高まっているが、今後母豚の更新に伴い、産まれてくる豚の免疫付与状況も変わっていくことが予想される。そのため、速やかに追加接種を実施するか、中和試験の結果を待ってから対応するかを恒久的に判断する目安にするためには、ELISA検査陰性でS/P値が0.020以上であっても、可能な限り中和試験を実施しデータを集める必要がある。今後検体数を増やしS/P値の分布やカットオフ値を随時検討していく必要があると考えている。

【謝辞】

採血に御協力くださった、東三河食肉流通センター、豊橋市食肉衛生検査所、豊田市食肉衛生検査所、豊田食肉流通センター、JA あいち経済連東三河食肉市場の皆様へ深謝します。