

風疹 HI 法の抗体価は EIA 法でどのくらいか

川崎医科大学小児科

寺田 喜平 井上 美佳 若林 時生
萩田 聡子 尾内 一信

(平成 20 年 8 月 25 日受付)

(平成 20 年 10 月 22 日受理)

Key words: rubella, hemagglutination inhibition, enzyme immuno assay, antibody

要 旨

厚生労働省研究班は女性に対し風疹 HI 法 16 倍以下をワクチンの接種対象とするように勧告したが、EIA 法ではどのくらいの抗体価となるか不明であった。そのため、HI 法と EIA 法による抗体価を比較検討した。対象は入学時抗体検査で風疹 HI 抗体 64 倍以下の 520 検体において、HI 抗体価とデンカ生研およびエンザイグノストのキットによる EIA-IgG 抗体価を比較した。HI 法と比べたデンカ生研 EIA 法の陰性的中率は 91.3%、陽性的中率は 99.8%、エンザイグノスト EIA 法の陰性的中率は 93.4%、陽性を 15IU/mL あるいは 10IU/mL 以上とすると、陽性的中率はそれぞれ 97.9%、98.1% であった。HI 抗体価とデンカ生研 EIA-IgG 抗体価との相関係数は 0.715 ($p < 0.0001$)、エンザイグノスト EIA-IgG 抗体価との相関係数は 0.610 ($p < 0.0001$) であった。デンカ生研とエンザイグノストの EIA-IgG 抗体価同士の相関係数は 0.753 ($p < 0.0001$) であった。HI 法 16 倍以下は、およそデンカ生研キットでは 9.0 未満、エンザイグノストキットでは 30IU/dL 未満に相当した。WHO や米国では 10IU/mL 以上が protective antibody (防御抗体) であるとしているので、接種対象を HI 法 16 倍以下とするわが国の勧告はその 3 倍高い。わが国では女性の再感染を防止する目的であるがその基準は高すぎると考えられた。またわが国の EIA 法のキットは国際基準が使用できるためにも早急に国際単位 (IU/mL) で表示すべきであると思われた。

〔感染症誌 83: 26~30, 2009〕

序 文

風疹再感染による先天性風疹症候群の発生は稀ではあるが、牛田らは報告例をまとめてわが国で 23 例あると報告した¹⁾。また、わが国において風疹の流行に伴い先天性風疹症候群の児が 2004 年に 10 例発生した。そのため、厚労省研究班「風疹流行にともなう母児感染の予防対策構築に関する研究」(平原班)により、風疹再感染による先天性風疹症候群の発生を防止するために、女性に対して赤血球凝集抑制(hemagglutination inhibition; HI) 法 8 倍未満の陰性者だけでなく低抗体価 16 倍以下の者にも風疹ワクチン接種を勧告した²⁾。その後低抗体価の妊婦において、産褥後に風疹ワクチンが積極的に接種されはじめた。また院内感染対策として職員や学生の風疹抗体が測定され、予防接種が実施されている。我々の病院では、HI 法で測定し、男女区別せず 16 倍以下を対象に接種してい

る。HI 法は安価であるため多くの病院では HI 法が選択されているが、酵素免疫 (enzyme immunoassay; EIA) 法による測定が自動化されている病院では EIA 法が選択される。今回、風疹 HI 抗体 16 倍が EIA-IgG 抗体価でどのくらいの値となるか報告がなく不明であったため、HI 法と市販の 2 種類の EIA 法キットとの比較検討を行った。

対象と方法

川崎医科大学倫理委員会の了解を得て、医療系大学の入学時抗体検査で、風疹 HI 抗体 64 倍以下であった 520 検体を対象にした。対象の HI 抗体価の分布は Table 1 に示した。

その同検体を用いて、EIA 法のルベラ IgG (II)-EIA 「生研」(デンカ生研) とエンザイグノスト風疹/IgG (デイドベリング社) のキットで測定した。HI 法とデンカ生研の EIA-IgG 抗体は(株)SRL で、デイドベリング社の EIA-IgG 抗体は我々が測定した。HI 法による抗体価は 8 倍未満が陰性とされている。EIA 法

別刷請求先: (〒701-0192) 倉敷市松島 577

川崎医科大学小児科

寺田 喜平

による抗体価は、デンカ生研キットでは抗体指数、エンザイグノストでは国際単位 (IU/mL) で表示されており、前者では 2.0 未満を陰性、4.0 以上を陽性、後者では 4.0IU/mL を陰性、添付文書上に参考値として 15IU/mL 以上を感染防御可 (陽性) としていた。しかし、1995 年に米国 National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) がカットオフ値を 15 IU/mL から 10IU/mL に下げている³⁾ので、10IU/mL でも評価した。その後 NCCLS が Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) に組織換えとなった。そのまま踏襲されている。

Table 1 HI assay distribution

HI assay	Subjects (no)
< 1:8	81
1:8	32
1:16	96
1:32	196
1:64	115
Total	520

成 績

1. EIA 法と HI 法との比較

デンカ生研の EIA-IgG 抗体価と HI 法の抗体価との相関係数は、EIA 法陰性 2.0 未満を 1.0、HI 抗体価を 2 の何乗の指数として表示し、8 倍未満を 2 とすると、0.715 ($p < 0.0001$)、95% 信頼区間は 0.713~0.788 であった。また Table 2 に示すように、デンカ生研の EIA 法陰性 (2.0 未満) の HI 抗体陰性的中率は 91.3% (74/81 名)、EIA 法陽性 (4.0 以上) の HI 抗体陽性的中率は 99.8% (406/407 名) であった。

一方、エンザイグノスト EIA-IgG 抗体価と HI 法の抗体価との相関係数は、IgG 抗体価を IU/mL、HI 抗体を指数で表示し、HI 抗体価 8 倍未満を 2 とすると、0.610 ($p < 0.0001$)、95% 信頼区間は 0.553~0.661 であった。また Table 3 に示すように、エンザイグノストの EIA 法陰性 (4.0IU/mL 未満) の HI 抗体陰性的中率は 93.4% (71/76 名)、15IU/mL 以上を陽性とする EIA 法の HI 抗体陽性的中率は 97.9% (372/380 名)、10IU/mL 以上を陽性とする EIA 法の HI 抗体陽性的中率は 98.1% (412/420 名) であった。

Table 2 HI assay levels and EIA-IgG titers using Denka kit

EIA (Denka Seiken Co.)	HI < 1:8	HI 1:8	HI 1:16	HI 1:32	HI 1:64
< 2.0	74	4	3		
< 4.0	6	19	7		
< 6.0		2	30	5	
< 8.0		2	27	28	
< 10.0		2	13	31	1
< 12.0		2	3	42	6
< 14.0			4	24	12
< 16.0			2	19	9
< 18.0	1	1	1	12	9
< 20.0			2	7	18
< 22.0			2	9	10
< 24.0			2	4	13
< 26.0				4	10
< 28.0				4	6
< 30.0				2	3
< 32.0					6
< 34.0				4	1
< 36.0					2
< 38.0					3
< 40.0					2
< 42.0					2
< 44.0					1
< 46.0				1	0
< 48.0					2
< 50.0					
< 52.0				2	
< 54.0					
< 56.0					
< 58.0					1
計	81	32	96	198	117

This kit defines < 2.0 titers as negative and > 4.0 as positive. The coefficient index was 0.715 ($p < 0.0001$) between them.

Table 3 HI assay levels and EIA-IgG titers using Dade kit

EIA (Dade Behring Co.)	HI < 1 : 8	HI 1 : 8	HI 1 : 16	HI 1 : 32	HI 1 : 64
< 4	71	2	2	1	
< 10	2	12	5	5	
< 15	0	9	22	8	1
< 25	5	6	28	42	8
< 35	1	2	18	43	9
< 45	1	0	8	23	16
< 55	0	0	4	20	17
< 65	1	1	4	21	15
< 75			3	8	10
< 85			1	3	14
< 95			0	10	6
< 105			0	6	3
< 115			1	3	6
< 125				0	3
< 135				0	2
< 145				1	2
< 155				0	0
< 165				0	1
< 175				0	0
< 185				0	0
< 195				0	1
< 205				1	0
< 215				1	0
< 225					0
< 235					0
< 245					1
計	81	32	96	196	115

This kit defines < 4.0 IU/mL titers as negative. The coefficient index was 0.610 ($p < 0.0001$) between them.

2. HI 抗体価 16 倍以下は EIA 法でどのくらいかの検討

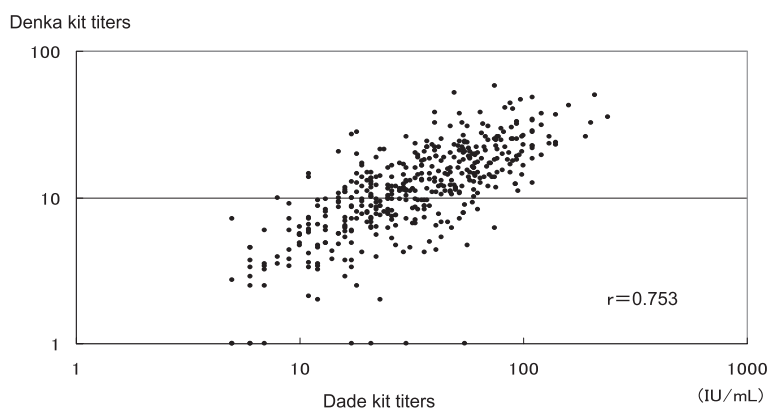
どの EIA-IgG 抗体価の値が HI 抗体価の 16 倍と 32 倍をもっとも区別することができるかを調べた。HI 法 16 倍と 32 倍の中で、デンカ生研 EIA-IgG 抗体価のある値未満の検体が占める割合を出し、HI 法 16 倍が多く 32 倍が最も少なく含まれる、すなわち、その差がもっとも大きい EIA-IgG 抗体価がよく区別できることになる。たとえば、EIA-IgG 抗体価 8.0 未満が HI 法 16 倍の 69.8% (67/96 名)、32 倍の 16.7% (33/198 名) に含まれ、その差が 53.1% であった。次に 9.0 未満で調べると、HI 法 16 倍の 79.2%、32 倍の 23.7% に含まれ、その差が 55.5% であった。その前後 EIA-IgG 抗体価 1.0 ごとに比較すると、この差がもっとも大きく、デンカ生研の EIA-IgG 抗体価 9.0 が HI 抗体 16 倍と 32 倍を区別するのにおよそ適切と思われた。一方、エンザイグノストによるキットでは、5.0IU/mL ごとに同様に検討した結果、30IU/mL 未満が HI 法 16 倍の 75.0%、32 倍の 41.3% が含まれ、その差が 33.7% ともっとも大きく、30IU/mL がおよそ適切と思われた。

3. EIA-IgG 抗体同士の比較

デンカ生研とエンザイグノストの EIA-IgG 抗体価を Fig. 1 に示した。その相関係数は、デンカ生研 EIA 法陰性 2.0 未満を 1.0 とし、エンザイグノスト IgG 抗体価を IU/mL で表示すると、0.753 ($p < 0.0001$)、95% 信頼区間は 0.713~0.788 であった。

EIA 法抗体価同士の比較では、デンカ生研キットを基準にすると陰性的中率は 88.9% (72/81 名) であった。陽性的中率はエンザイグノストキット 10IU/mL 以上を陽性とする と 93.9% (388/413 名)、15IU/mL 以上を陽性とする と 97.1% (365/376 名) であった。エンザイグノスト 10IU/mL と 15IU/mL がデンカ生研 EIA 法のどの値で区別できるか検討したところ、デンカ生研の抗体価 4.0 未満が、エンザイグノスト 10 IU/mL 未満の 88% を、10IU/mL 以上は 5% を占め、その差は 83%、また 5.0 未満が、エンザイグノスト 10 IU/mL 未満の 93% を、10IU/mL 以上は 9% を占め、その差は 84% であった。その結果、10IU/mL では抗体価 4.0~5.0 がもっとも適切と考えられた。さらに 15 IU/mL で同様に検討するとデンカ生研の抗体価 6.0 未満がエンザイグノスト 15IU/mL 未満の 84% を、15 IU/mL 以上は 8% を占め、その差は 76%、また 7.0 未満がエンザイグノスト 15IU/mL 未満の 90% を、15

Fig. 1 EIA-IgG titers using Denka and Dade kits
The coefficient index was 0.753 ($p < 0.0001$).



IU/mL 以上は 13% を占め、その差は 77% のため、6.0~7.0 がもっとも適切と考えられた。

考 察

HI 法と EIA 法の抗体価の相関は、一方が連続値で一方は不連続値であるが、HI 抗体価とデンカ生研 EIA-IgG 抗体価との相関係数は 0.715、エンザイグノスト EIA-IgG 抗体価との相関係数は 0.610 であった。また HI 法と比べたデンカ生研 EIA 法の陰性的中率は 91.3%、陽性的中率は 99.8% であった。HI 法と比べたエンザイグノスト EIA 法の陰性的中率は 93.4%、15 IU/mL 以上を陽性とするとき陽性的中率は 97.9%、10 IU/mL 以上を陽性とするとき 98.1% であった。陰性的中率は 91~93% と少し悪く、EIA 法が陰性であっても HI 法では陽性が 7~9% あることを示していた。しかし、陽性的中率はほぼ 100% であり、HI 法と EIA 法の感度は同等であると考えられた。

外国における陽性カットオフ値について調べてみると、1985 年に米国 NCCLS の Rubella Subcommittee は 15IU/mL 以上を免疫ありとしたが、1992 年に 10 IU/mL を暫定的なカットオフ値とした。そして、3 年間の暫定期間に protective antibody (防御抗体)、すなわち罹患を防御できる抗体として問題のないことを確認した後、1995 年にこれを正式なカットオフ値と決定した³⁾。また WHO の報告書や主要論文でも、風疹 EIA-IgG 値の 10IU/mL が防御抗体として報告されている⁴⁾⁵⁾。なお、WHO ではロベルトコッホ研究所が今回で使用したデイドベアリング社のエンザイグノストキットを使ってパネル血清を作成している⁴⁾。

米国 NCCLS は疫学的検討や報告をもとにカットオフ値を 15 から 10IU/mL に下げても大多数 (vast majority) において罹患を防御できるとした³⁾。その理由として、EIA-IgG 15IU/mL 未満の低抗体価者にワクチン接種しても IgM 抗体は陰性であったこと⁶⁾。また 15IU/mL 未満の低抗体価のボランティアにワクチン

株を鼻腔内接種しても 1/19 名しかウイルス血症を起こさず、低抗体価でも多くはウイルス血症をブロックできたと推定されたこと⁷⁾。低抗体価者において再感染による先天性風疹症候群の報告があるが 15IU/mL 以上でも少数の報告^{8)~10)}があり、抗体価が高値であっても必ずしも再感染を防御できるは限らないこと¹¹⁾。またさらに米国の検査会社が 10IU/mL に下げても再感染率の増加なかったとしている³⁾。

今回、我々の研究目的は HI 法 16 倍がどの EIA-IgG 抗体価で区別できるかである。その検討の結果、デンカ生研では 9.0 が、エンザイグノストでは 30IU/mL が妥当であった。しかし、これは多くの国で使用されている基準の 10IU/mL の 3 倍も高かった。そのため、不必要な接種対象数の増加があると思われる。今回の検討でも接種対象を HI 法 8 倍未満から 16 倍以下にすると対象者数が 2.6 倍に増加した。

エンザイグノストの 10 あるいは 15IU/mL は HI 法でどの値に相当するであろうか。Skendezel は 15IU/mL は HI 抗体の 8~10 倍に相当するとしている³⁾。今回の検討でも、HI 法の 8 倍はエンザイグノストのおよそ 15IU/mL に近似した。15IU/mL 未満の血清は HI 抗体 8 倍未満の 90%、8 倍の 72%、16 倍の 30%、32 倍の 7%、64 倍の 0.8% が、一方、10IU/mL 未満の血清は HI 抗体 8 倍未満の 90%、8 倍の 44%、16 倍の 7%、32 倍の 3%、64 倍の 0% が含まれており、10 IU/mL は HI 抗体価 8 倍未満により近似していた。エンザイグノストキットの EIA-IgG 抗体価 10IU/mL はデンカ生研の EIA-IgG 抗体価 4.0~5.0 で、15IU/mL では 6.0~7.0 に相当しており、デンカ生研 IgG 抗体価は 4.0 以上を陽性としているので、世界の基準と大きくかけ離れていなかった。しかし、わが国でもっともよく使用されているデンカ生研による抗体価は国際単位 (IU/mL) でなく、容易に国際的な比較ができない。そのため、グローバルスタンダードを用いること

が困難であり、接種基準に関する混乱が生じていると思われる。また HI 法 16 倍以下を接種基準とするのは接種対象者が過大になりすぎると考えられるので、再評価が必要であろうと考えられた。

文 献

- 1) 牛田美幸, 岡田隆滋, 加藤茂孝: 母体の再感染による先天性風疹症候群—自験例と日本における 23 例の検討—. 病原微生物検出情報 2000; 21: 7.
- 2) 国立感染症研究所感染症情報センター. <http://idsc.nih.go.jp/yosoku99/index.html>.
- 3) Skendzel LP: Rubella immunity —Defining the level of protective antibody—. Am J Clin Pathol 1996; 106: 170—4.
- 4) Nardone A, Tischer A, Andrews N, Backhouse J, Theeten H, Gatcheva N, *et al.*: Comparison of rubella seroepidemiology in 17 countries: Progress towards international disease control targets. Bulletin of the World Health Organization 2008; 86: 118—25.
- 5) Amanna IJ, Carlson NE, Slifka MK: Duration of humoral immunity to common viral and vaccine antigens. N Engl J Med 2007; 357: 1903—15.
- 6) Vaananen P, Makela P, Vaheri A: Effect of low level immunity on response to live rubella virus vaccine. Vaccine 1986; 4: 5—8.
- 7) O'Shea S, Best JM, Banatvala JE: Viremia, virus excretion, and antibody responses after challenge in volunteers with low levels of antibody to rubella virus. J Infect Dis 1983; 148: 639—47.
- 8) Braun C, Kampa D, Fressle R, Willke E, Stahl M, Haller O: Congenital rubella syndrome despite repeated vaccination of the mother: A coincidence of vaccine failure with failure to vaccinate. Acta Paediatr 1994; 83: 674—7.
- 9) Hornstein L, Levy U, Ogle A: Clinical rubella with virus transmission to the fetus in a pregnant woman considered to be immune. N Engl J Med 1988; 319: 1415—6.
- 10) Best JM, Banatvala JE, Morgan-Capner P, Miller E: Fetal infection after maternal reinfection with rubella: Criteria for defining reinfection. BMJ 1989; 299: 773—5.
- 11) Partridge JW, Flewett TH, Whitehead JEM: Congenital rubella affecting an infant whose mother had rubella antibodies before conception. BMJ 1981; 282: 187—8.

What EIA Assay Levels Correspond to Rubella Antibody HI Assay Titer?

Kihei TERADA, Mika INOUE, Tokio WAKABAYASHI, Satoko OGITA & Kazunobu OUCHI
Department of Pediatrics, Kawasaki Medical School

In 2004, a Japanese-government-supported research group recommended that women without rubella antibody or with low titers $\leq 1:16$ of HI antibody should be vaccinated to decrease the risk of congenital rubella syndrome. We compared HI antibody titer with EIA-IgG levels in 520 college students with $\leq 1:64$ HI antibody measuring rubella antibodies in the same specimen using HI and EIA assay kits from Denka Seiken Co. (Japan) and Dade Behring Co. (Germany). The positive predictive value of the EIA assay using the kit from Denka Seiken Co. was 99.8% and the negative predictive value 91.3%, respectively, compared to 97.9% (positive $\geq 15\text{IU/mL}$), 98.1% (positive $\geq 10\text{IU/mL}$), and 93.4%, using the kit from Dade Behring Co.. Between HI titers and EIA-IgG measured with the Denka kit, the coefficient index was 0.715 ($p < 0.0001$). Between those measured with the Dade kit, the coefficient index was 0.610 ($p < 0.0001$). Between EIA-IgG levels measured using the two kits, the coefficient index was 0.753 ($p < 0.0001$). The HI value of 1:16 corresponds approximately to 9.0 with the kit (positive ≥ 4.0) from Denka, and to 30IU/mL with the kit from Dade. EIA-IgG levels $\geq 10\text{IU/mL}$ are considered globally as protective antibody titers, meaning that the Japanese recommendation of $\leq 1:16$ for vaccination is too loose. Japanese EIA kit values for the rubella antibody should also be expressed in IU/mL using the global standard.