

# ランピースキン病の抗体検査方法に関する検証

中央家畜保健衛生所 ○佐藤 俊介

## 1 背景と目的

2024年11月、福岡県で国内初となるランピースキン病 (LSD) の発生が確認された。

発生は県内19例におよび、緊急的なワクチン接種 (Bovilis Lumpyvax-E、MSD Animal Health社) を行った。国内においてLSDの抗体検査は未検証であるため、LSD発症牛及びワクチン接種牛血清を用いて、海外の文献を参考にELISAと中和試験 (VNT)、免疫ペルオキシダーゼ単層アッセイ (IPMA) の検証を実施した[1-5]。

## 2 材料

(1) LSD発症牛：32頭の発症時血清と内9頭の回復期 (約30日経過後) 血清 (図1)。

(2) LSDワクチン接種牛 (ホルスタイン種)：成牛10頭 (接種前と接種後8、15、21、27、35、118、153、183、218、253、287日) の血清。

(3) LSDワクチン接種牛 (黒毛和種)：成牛13頭 (A群、接種後114、147日) 及び成牛10頭 (B群、接種後32日) の血清。

## 3 方法

(1) ELISA：ID Screen Capripox Double Antigen Multi-species (Innovative Diagnostics) を使用。判定はキットの添付文書通り、S/P%30以上を陽性とした。

(2) VNT：被検血清を2倍階段希釈し、指示ウイルスとしてNeethling株を用いた (MDBK細胞の同時接種)。判定はCPEを指標に中和抗体価 (NT価) を算出し、NT価2倍以上を陽性とした。判定基準はCPE10個未満までを抗体陽性と設定し、最高希釈倍数をNT価とした (図2)。

(3) IPMA：Neethling株を感染させた牛鼻甲介 (BoTu) 細胞をホルマリン固定した後、メタノール過酸化水素混合液で処理し、反応プレートを作製。被検血清は50、300倍希釈で供試し、二次抗体は抗ウシIgG (全分子) ペルオキシダーゼウサギ宿主抗体 (Sigma Aldrich)、基質液はImmPACT AMEC Red Peroxidase Substrate (VEC) を用いた (図3、図4)。

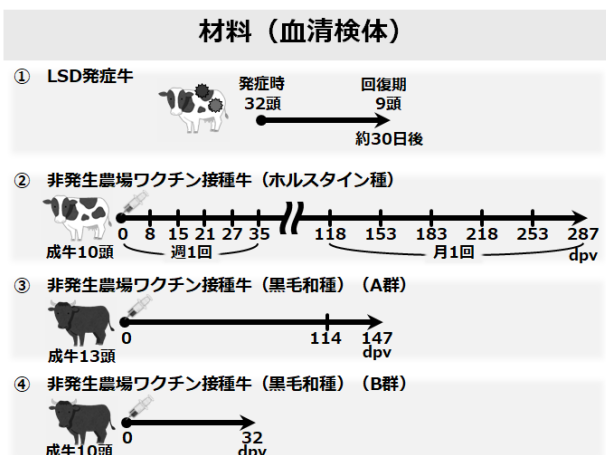


図1 材料 (血清検体)

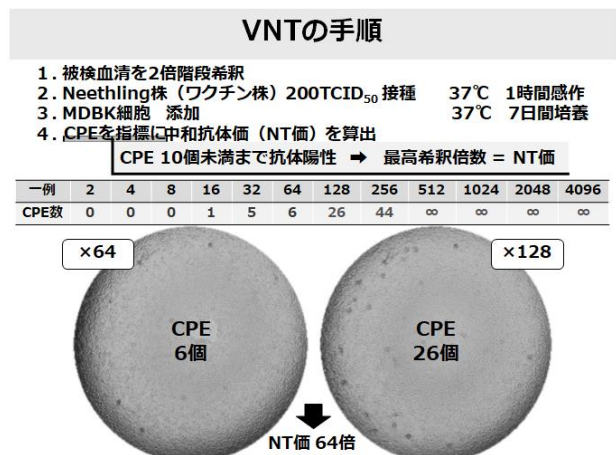


図2 VNTの手順

#### 4 結果

(1) LSD 発症牛：ELISA、VNT、IPMA の陽性率は発症時血清でそれぞれ 9.4%、50%、100%であり、回復期血清ではいずれも 100%であった。陽性牛中和抗体価の幾何平均値(GM値)とS/P%は発症時血清で6.7と12.9、回復期血清で174.2と171.8であった(図5)。

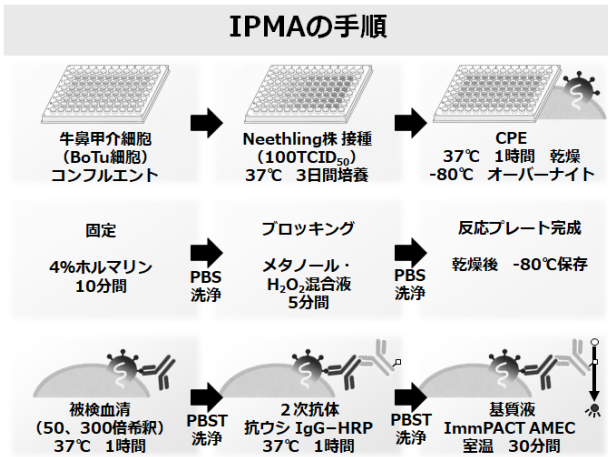


図3 IPMAの手順

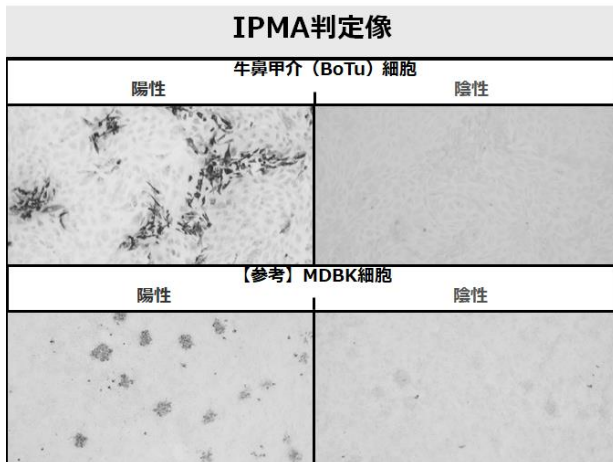


図4 IPMA 判定像

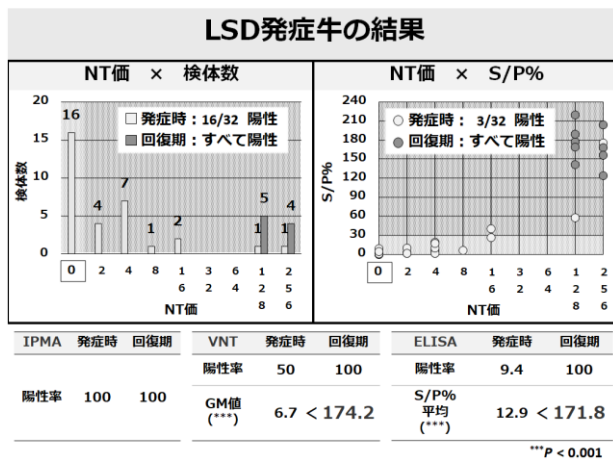


図5 LSD 発症牛の結果

(2) LSD ワクチン接種牛 (ホルスタイン種)：抗体検出時期は IPMA が最も早く、8 日から検出されており、その後 VNT、ELISA と続き、すべての検査で全頭抗体陽性となった。ピークは GM 値が 27 日 36.8 であり、S/P% は 118 日 155.5 であった (図6)。

(3) LSD ワクチン接種牛 (黒毛和種)：ELISA、VNT、IPMA の陽性率はそれぞれ、A 群 46.2%、46.2%、100%、B 群 0%、50%、90%であった。GM 値は A 群で 3.6 および 4.0、B 群で 3.5 であった。S/P% は A 群で 29.8 および 29.7、B 群で 1.3 であった (図7)。

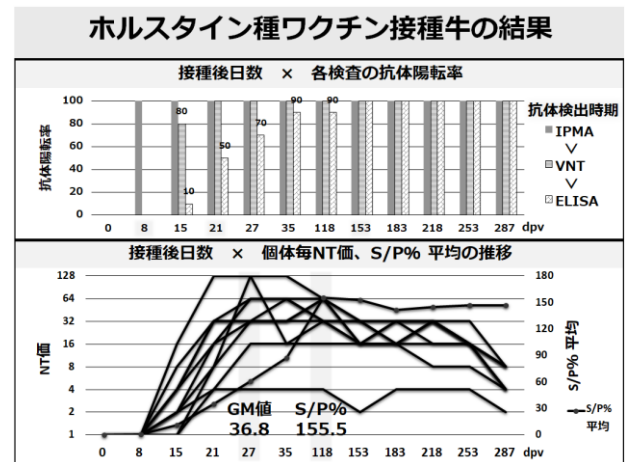


図6 ホルスタイン種ワクチン接種牛の結果

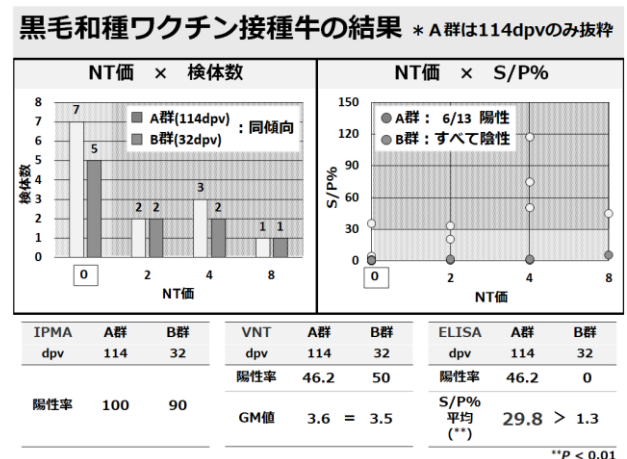


図7 黒毛和種ワクチン接種牛の結果

## 5 まとめ

抗体検出時期は IPMA、VNT、ELISA の順であり、日数に影響を受けるが検出感度も同様であった。潜伏期間は比較的長いが、発症時血清全検体で IPMA 陽性であった。ワクチン接種後の抗体ピークは NT 価 27 日、S/P%155 日であり、287 日経過後も消失はない。IPMA は、品種間で発色の差はあるが、陽性率に大きな差はなかった。ELISA と VNT は品種間で陽性率に差があり、感受性や感染防御との関係について更なる調査が必要である (図 8)。

## 引用文献

- [1] WOAAH : WOAAH Terrestrial Manual 2024、Chapter 3.4.12. Lumpy skin disease
- [2] Andy Haegeman et al. Journal of Virological Methods. 277 (2020)
- [3] SAMOJLOVIC Milena et al. Acta Veterinaria-Beograd. 69 (1) :47-60 (2019)
- [4] Milovan Milovanovic et al. BMC Veterinary Research. 15:80 (2019)
- [5] Nutthakarn Suwankitwat et al. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 99 (2023)

まとめ (品種の差)								
◆ 抗体検出時期 : <b>IPMA</b> > VNT > ELISA								
◆ 抗体検出感度 : <b>IPMA</b> > VNT ≥ ELISA *ピーク日数の違いに注意								
◆ 品種の差 : IPMA 陽性率に大きな差は無し (発色具合に差) VNT・ELISA 陽性率、NT価、S/P%に差								
IPMA	ホルス	黒毛	VNT	ホルス	黒毛	ELISA	ホルス	黒毛
dpv	118	114	dpv	118	114	dpv	118	114
陽性率	<b>100</b>	<b>100</b>	陽性率	100	46.2	陽性率	100	46.2
	濃色	淡色	GM値 (***)	36.8	> 3.6	S/P% 平均 (***)	155.5	> 29.8
***P < 0.001								
抗体検出方法としてIPMAが最も有用								
品種の差 (感受性や感染防御との関係) について更なる調査要								

図 8 まとめ (品種間の差)