

## 9. Bunyip Creek ウイルスの分離と浸潤状況調査

家畜衛生試験場 ○丹羽 毅、新田 芳樹  
 北部農林水産振興センター 砂川 真紀

沖縄県では近年、新興アルボウイルスが相次いで分離されてきたが、2008～2009年にかけて八重山圏域で採取された牛血液から、国内で初めて Bunyip Creek (ブニップクリーク)ウイルス(以下、BCV)が分離された。BCVは、チュウザンウイルス(CHUV)やディアギュラウイルス(DAGV)と同じ、オルビウイルス属パリウム血清群に分類され、1975年にオーストラリアでヌカカより初めて分離<sup>1)</sup>された。これまで国内では確認されておらず、病原性についても未だ明らかにされていない。今回、分離ウイルス株の解析ならびに分離株を用いた疫学調査、病性鑑定を実施し、本県におけるBCVの流行状況や異常産等との関連について検討を行ったので報告する。(図1、図2)

### 【材料及び方法】

(1) ウイルス分離と同定：おとり牛の血液について、HmLu-1細胞、BHK-21細胞を用いた。分離株の同定は動物衛生研究所九州支所へ依頼し、各種アルボウイルス抗体を用いたイムノドットブロット法による抗原解析ならびに、RT-PCR法とFLAC法を用いた遺伝子解析を実施した。

(2) 疫学調査：2008年分離株を用い、1998～2009年採材おとり牛血清について、中和試験により抗体保有状況を調べた。なお、夏期は全国サーベイの11月採材血清(2009年は5、7、9月採材も使用)を、また冬期は移行抗体の消失した6ヶ月齢以上の初越夏子牛について、1、3月に採材した血清を調査対象とした。

(3) 牛異常産の病性鑑定：疫学調査によるウイルスの流行時期を元に、牛異常産、新生仔牛の神経症状等について、2008年27例、2009年22例および2010年3例(1月～3月)の計52例についてウイルス学的検査を実施した。

### 【検査成績】

(1) ウイルス分離と同定：2008年11月与那国島、2009年11月石垣島で採材された牛の洗浄血球より、



**Bunyip Creek Virus (BCV)**  
 レオウイルス科 オルビウイルス属 パリウム血清群

【オルビウイルス属のウイルス】  
 補体結合反応等により21血清群に分類。ブルータンゲウイルス血清群、アフリカ馬疫ウイルス血清群、EHDV血清群(イバラキウイルス)などが属する。

【パリウム血清群ウイルス】  
 13種類のウイルスが属する。チュウザンウイルス(CHUV)、ディアギュラウイルス(DAGV)などが含まれる。

図1) BCVの分類

**BCVの分離報告**

1975年	オーストラリア	ヌカカ
1976年	オーストラリア	おとり牛血

以降、1970～80年代にかけて、オーストラリアでは、おとり牛やヌカカから繰り返し分離。

**オーストラリア以外の国での報告なし**

**BCVの病原性について**  
 BCVによる病原性についての報告はなく、未だ不明。  
 (同血清群のCHUV、DAGVはいずれもチュウザン病をおこす)

図2) BCVの分離報告等

**1. ウイルス分離成績**

採材時期	地域	材料	細胞	株名
2008年11月	与那国島	血球	BHK-21	ON-3/E/08株
2009年11月	石垣市	血球	BHK-21	ON-7/E/09株

同時期に沖縄県で牛血液から分離されたウイルス

分離株	分離材料	採取年月日	場所	ウイルス
ON-1/E/08	おとり牛血球	2008.12.11	与那国町	Bunyip Creek
ON-2/P/08	牛血漿	2008.12.11	与那国町	Bunyip Creek
ON-2/E/08	牛血球	2008.12.11	与那国町	Bunyip Creek
ON-1/P/09	牛血漿	2009.11.24	石垣市	Peaton
ON-2/E/09	牛血球	2009.11.18	竹富町	Bunyip Creek
ON-3/E/09	牛血球	2009.11.18	竹富町	Bunyip Creek
ON-4/E/09	牛血球	2009.11.24	石垣市	Bunyip Creek
ON-5/E/09	牛血球	2009.11.18	竹富町	Bunyip Creek
ON-6/E/09	牛血球	2009.11.24	石垣市	Peaton

★2009年には鹿児島県でもBunyip Creekウイルスが分離されている。

図3) ウイルス分離成績

BHK-21 細胞でウイルスが分離された。(図3)

分離ウイルスの同定には、初めに、イムドットブロット法を用いた。本法では、行にウイルス抗原を貼り付け、列にモノあるいはポリクローナル抗体を流し入れた後、二次抗体処理および発色処理を行うことで、抗原解析を行った。分離株は、CHUV のポリクローナル抗体への反応を示した。同抗体は、全てのパリアム血清群ウイルスを検出することから、本法により分離株はパリアム血清群のウイルスであることが同定された。(図4)

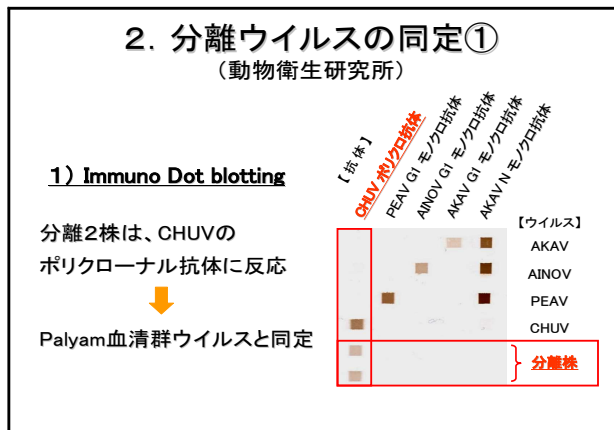


図4) イムドットブロット法

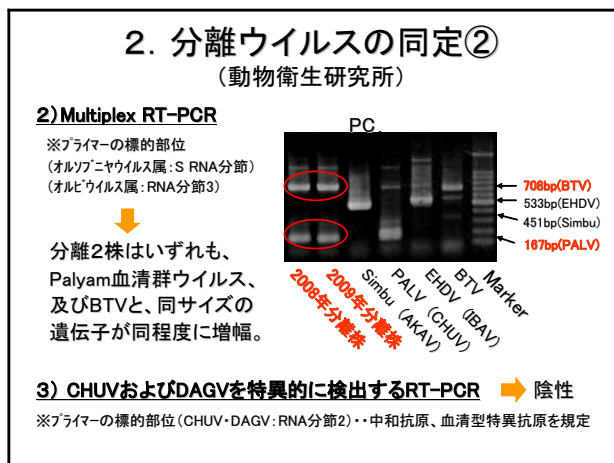


図5) Multiplex RT-PCR

またイムドットブロット法と平行して、大橋らによる牛アルボウイルス multiplex RT-PCR<sup>2)</sup> も実施した。その結果、イムドットブロット法と同様、分離株ではパリアム血清群に特異的な遺伝子の増幅が確認されたが、CHUV や DAGV では増幅されないブルータンゲウイルスの特異遺伝子が、2008 年分離株ならびに2009 年分離株のいずれにも確認された。さらに、パリアム血清群である CHUV と DAGV を識別するための

RT-PCR を実施した結果、分離株はいずれの特異遺伝子も増幅されなかった。以上のことから分離ウイルスは CHUV 、 DAGV 以外のパリアム血清群ウイルスであることが示唆された。(図5)

次に、FLAC 法を用いた遺伝子解析を行った。

ウイルスは極めて単純な構造であり、未知の細菌などを同定する際に手がかりとなるリボゾーム RNA が存在しないため、未知のウイルスについては遺伝子増幅が困難で、同定には多くの時間と労力がかかり、分離ウイルスが同定に至るまでに、何年も費やされていた。

しかし、2007年に Maan らが考案した FLAC 法<sup>3)</sup>では未知のウイルス遺伝子の増幅が可能となったことから、今回、分離株の2本鎖RNAを抽出し、FLAC法を用いて遺伝子増幅を実施した。その結果、分離株のcDNAの増幅に成功し、塩基配列の解析の結果、分離株は、1976年にオーストラリアで分離されたBCV CSIRO58株と最も近縁であることが判明した。

分離株は日本で3番目のパリアム血清群ウイルスとなるBCVと同定された。(図6、7)

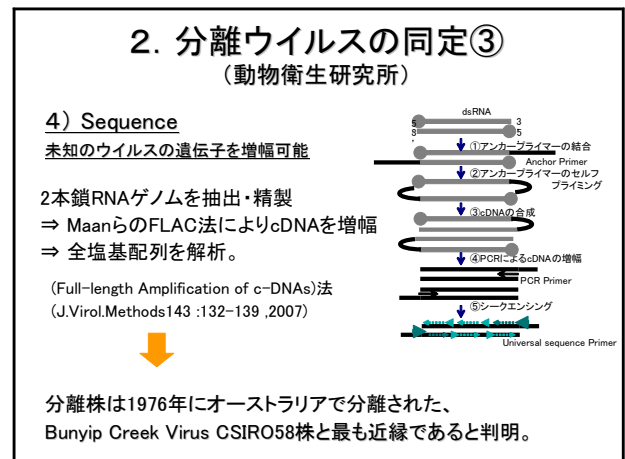


図6) FLAC 法を用いたシーケンス

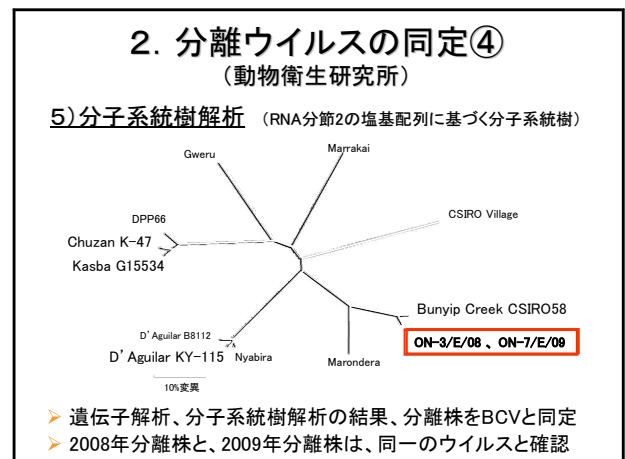


図7) 分子系統樹解析

(2)疫学調査:国内で初めてBCVが分離されたことを受け、BCVの流行実態を把握するため、おとり牛の保存血清を用いて、過去12年間の遡り調査を実施した。その結果、2008年以前に、ウイルスの流行は認められなかった。また、2008年以降に流行が確認されたのは八重山圏域のみであることが確認された。(図8)

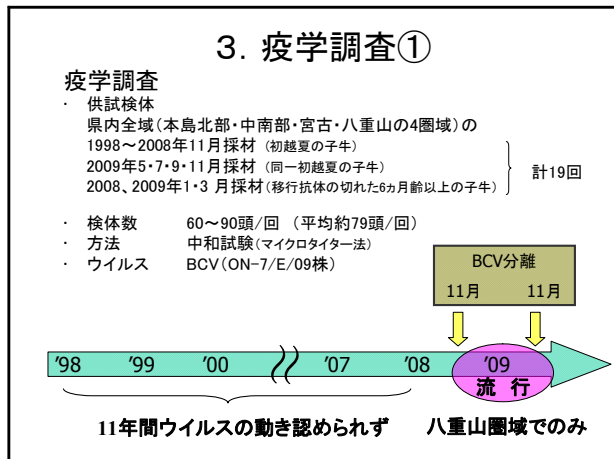


図8)疫学調査①

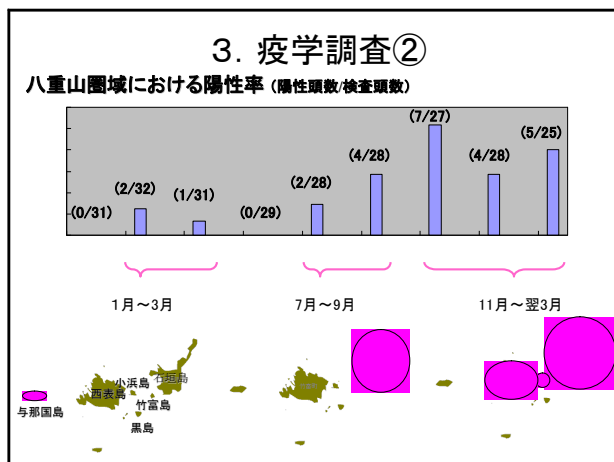


図9)疫学調査②

与那国島でウイルスが分離された、2008年11月時点では、まだ抗体陽性牛は確認されず、この時期にBCVの流行が開始されたことが確認された。その後も、2008年1月、3月に与那国島で抗体陽性牛が確認されたが2008年度は与那国島以外での流行は確認されなかった。一方、2009年に入ると7月、9月に石垣島で陽転が確認され、11月以降は石垣・西表・小浜島で順次確認された。

このことより、与那国島から石垣島にウイルスが浸潤し、石垣島で流行後、その他の地域に広がった可能

性が示唆された。(図9)

(3)BCVの病性鑑定成績:ウイルスの流行が認められた2008年以降に、病性鑑定依頼のあった牛異常産や新生子牛の神経症状等の52例について、抗体検査ならびにウイルス分離によりBCVの関与について調査したが、BCVの関与を示唆する症例は確認されなかった。

【まとめ】

2008年、2009年に八重山圏域で分離されたウイルスは、BCVと同定された。BCVの分離は国内初で、国内ではCHUV,DAGVに次ぐ第3のバリアム血清群ウイルスになった。

疫学調査の結果、BCVは2008年11月頃に初めて県内に侵入されたと推測された。2008年の流行開始当初は、与那国島だけの小規模な流行であったが、2009年半ばより八重山圏域の他地域へ拡大が認められた。宮古や沖縄本島など県内の他圏域への拡大は認められなかったが、2009年に九州南部でBCVの流行が確認されている。

病原性について検証するため、流行時期を元に病性鑑定の遡り調査を実施したが、牛異常産等へのBCVの関与は認められなかった。

【考察】


2008年に本県でBCVが確認された後、翌2009年には九州でも流行が確認された。これは、2006年のピートンウイルス<sup>4)</sup>や、2007年のサシュペリウイルス<sup>5)</sup>の時と同様の流行状況で、沖縄が流行予察に果たす役割が大きいことが確認されるとともに、近年の新興アルボウイルスの流行パターンである可能性が示唆された。一方、BCVの分離は国内初であったことに加え、アルボウイルスの流行が盛んな沖縄県において過去にBCVの侵入形跡は認められなかったことは、BCVが初めて国内に侵入した可能性が示唆された。このようにBCVは初めての侵入であり、かつ沖縄から九州にかけて流行が見られているため、BCVのモニタリングを実施することにより、清浄地にアルボウイルスが侵入した際の流行動態について、疫学的に解明することが可能になると考えられる。近年、温暖化の影響も受け、アルボウイルスの動きが活発化しており、新興アルボウイルスの流行も頻繁に確認されており、アルボウイルスの流行にかかる疫学的な解析をさらに進め

るためにも、九州 や中国地方においても BCV の疫学調査を行い、BCV の流行実態 を把握することが重要であると考ええる。(図9)

図9) 今後の展望

**今後の展望**

- ◆ 沖縄県で流行確認後、翌年九州でも流行。  
2006年PEAV、2007年SATVの流行時と同じ状況。
- ◆ BCVは今回が国内で初めての確認。  
疫学調査からも過去の流行を示す形跡は認められず。



**BCVの詳細なモニタリングにより  
新興アルボウイルス侵入時の伝播実態について  
疫学的な解明が可能**

**BCVの流行実態を把握するため、九州・中国地方  
を中心に、BCVの流行状況調査が望まれる。**

謝辞:株の同定、解析ならびに発表に際しご助言を賜りました、動物衛生研究所九州支所ウイルス部門の諸先生方に深謝致します。

**【参考文献】**

1)H.A.Standfast.et al. Isolation of Arboviruses from Insects Collected at Beatrice Hill,Northern Territory of Australia,1974-1976.Aust,J.Biol.Sci,37,351-66(1984)

2)Ohashi,S.et al. Simultaneous detection of bovine arboviruses using single-tube multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction. J.Virol.Methods.120,79-85(2004)

3)Maan,S.et al. Rapid cDNA synthesis and sequencing techniques for the genetic study of bluetongue and other dsRNA virusesJ.Virol.Methods.143,132-139 (2007)

4)相澤ら. ピートンウイルスの分離と疫学調査ならびに牛異常産の発生 沖縄県家衛試年報 vol.43,85-88 (2007)

5)相澤ら. サシユペリウイルスの分離と疫学調査沖縄県家衛試年報 vol.44,79-81(2008)