

目 次

- 【1】** Bウイルス感染症の概説
- 【2】** Bウイルス検査について
- 【3】** Bウイルス検査に関する一般的な注意事項
 - [1] 検査材料の採取
 - [2] 検査材料の輸送
 - [3] 検査の進め方
- 【4】** 検査法
 - [1] ウイルス DNA の検出
 - [2] ウイルス分離
 - [3] 病理学的検査
 - [4] 血清学的検査
 - [5] 感染源動物の検査
- 【5】** 実験室診断
- 【6】** 参考文献
- 【7】** 問い合わせ先

【1】 Bウイルス感染症の概説

Bウイルス感染症の病原体であるBウイルスは、ヘルペスウイルス科 α ヘルペスウイルス亜科に分類される(表1)。分類学上の正式ウイルス名はMacacine alphaherpesvirus 1であるが、一般的には、Bウイルスと呼ばれ、Herpesvirus simiaeと呼ばれることもある。他のヘルペスウイルスと同様に、ウイルス構造はカプシド内に2本鎖線状DNAのウイルスゲノムを持ち、それらがエンベロープに囲まれている。ウイルス粒子の大きさは直径120-200nmである。アカゲザルより分離されたE2490株の全ゲノム配列(156,789塩基対)が解読されている。ヒトのHSV-1ならびにHSV-2にウイルス学的に近縁であり、血清学的に交差する。

表1 ヒトおよびサル類を自然宿主とする主なアルファヘルペスウイルス亜科のウイルス

ウイルス名	通称名	自然宿主
Human alphaherpesvirus 1	単純ヘルペスウイルス1型 (HSV-1)	ヒト
Human alphaherpesvirus 2	単純ヘルペスウイルス2型 (HSV-2)	ヒト
Macacine alphaherpesvirus 1	Bウイルス, HV simiae	アカゲザル, カニクイザル
Cercopithecine alphaherpesvirus 2	SA8	アフリカミドリザル
Papiine alphaherpesvirus 2	Herpesvirus papio 2, Baboon herpesvirus 2	ヒヒ

アカゲザル、カニクイザル、ニホンザル、ブタオザルなどのマカク属サルがBウイルスの自然宿主であり、これらのサルは体液・排泄物(唾液、尿、便など)にBウイルスを排出する。ヒトはこれらのサルに咬まれたり、体液・排泄物を浴びせられたりすると感染する。また、感染サル組織材料を取り扱う際に、感染防御策が適切でなければ感染する場合もある。自然宿主のマカク属サルがBウイルスに感染しても重症にはならないが、一度感染すると神経節に潜伏感染し、ときにウイルスを排出する。

ヒトのBウイルス感染事例の報告は少なく、これまで世界での感染報告事例は50例程度とされ、その内、詳細な記録があるのは26例とされる。感染症法では4類感染症となっている。臨床経過及び症状は以下のとおりである。

- A) サルによる咬傷後、症状発現までの潜伏期間は早い場合2日、通常2～5週間である。
- B) 早期症状としては、サルとの接触部位周囲の水疱性あるいは潰瘍性皮膚粘膜病変、接触部位の疼痛、搔痒感、所属リンパ節腫脹が出現する。
- C) 中期症状として発熱、接触部位の感覚異常、接触部位側の筋力低下あるいは麻痺、眼に分泌物等が入った際には結膜炎症状が出現する。
- D) 後期には副鼻腔炎、項部強直、頭痛、悪心・嘔吐、目まい、麻痺及び知覚障害、意識障害、脳炎症状を呈する。
- E) 無治療での致命率は70～80%である。
- F) 回復しても重篤な神経障害が後遺症として残ることがある。

なお、原因不明の脳炎患者では本症も考慮し、また、マカク属サルとの接触歴についても確かめ、直近または過去にサルとの接触歴がある場合にはBウイルス感染を鑑別診断に挙げる。

【2】 Bウイルス検査について

本感染症におけるウイルス学的検査の実施に際して考慮すべきことは、以下の事項である。

- a) B ウイルスの抗原性は HSV-1、-2 のそれと交差していること
- b) 多くのヒトは HSV-1 あるいは HSV-2 に感染していることから、血清学的診断つまり抗体検査による診断は困難であること
- c) ヒトはサルまたはサル由来の組織・体液・排泄物に直接接触しなければ B ウイルスに感染しないことから、問診等からサルとの接触歴を調べるのが重要であること
- d) B ウイルス感染症に有効な抗ウイルス薬（アシクロビルやバラシクロビル）があり、治療には早期投与が重要で、治療経過を評価するにはウイルス分離検査や遺伝子検査が実施されるべきであること
- e) B ウイルスは BSL-3 または BSL-4 病原体に指定されていることから、検体の取り扱いには特別な配慮が必要であること

以上のことから、

- 1) マカク属サルに咬まれることを含め、体液・排泄物や組織等に接触があり、症状から B ウイルス感染が強く疑われる時には、急性期の血清や水疱性病変・咽頭拭い液・脳脊髄液などを採取し検査に供する。
- 2) 症状がある場合もしくはない場合を問わずサルに咬まれたり、体液（尿・唾液ほか）を眼などに直接浴びる事故が発生した場合には、嚴重に経過観察したり、抗ウイルス薬（アシクロビルやガンシクロビル）の予防投与を開始したりすることが重要である。
- 3) 予防的抗ウイルス薬投与を 2 週間続けた患者で、B ウイルス感染症を疑わせる症状が認められなかった場合には、予防的抗ウイルス薬投与を中止する。B ウイルスに関するウイルス学的な検査を実施する必要はない。
- 4) B ウイルス感染症と診断された患者で抗ウイルス薬による治療がなされても症状の改善が認められない場合には、薬剤耐性株の出現の可能性を調べるための検査を実施する。

【3】 B ウイルス検査に関する一般的な注意事項

国立感染症研究所においては「B ウイルス取り扱いに関するマニュアル」を平成 11 年 4 月に作成（平成 29 年 1 月改訂）し、これを遵守して取り扱っている。本マニュアルには、診断検査のための少量培養には BSL-3 実験施設で BSL-3 の取り扱い基準に従い実施すると規定されている。少量培養とは具体的に、同時に行う培養の規模が培養面積 25 cm² の培養容器 2 個に相当する量（10mL）以内である。

[1] 検査材料の採取

- a) 患部水疱液及び生検可能な組織は、直ちに検査できない場合は- 70℃以下で凍結保存する。これらの材料はウイルス分離またはウイルスゲノム検出の材料となる。病理組織学的検査にはホルマリン固定する。
- b) 血液は血清を分離して抗体検出に用いる。

[2] 検査材料の輸送

検査材料からウイルス分離した材料や確実に感染性 B ウイルスが含まれる検査材料の輸送が必要な場合は、WHO「感染性物質の輸送規則に関するガイダンス」に準拠する。

[3] 検査の進め方

B ウイルス感染が疑われる患者には、以下の検査を実施する。

- a) 検体からウイルスゲノム DNA を PCR 法で検出する。
- b) ウイルス分離検査を実施する。
- c) 患者血清中の急性期および回復期の B ウイルス抗体価の有意な上昇を検出する。

【4】検査法

患者材料からのウイルス DNA の検出、ウイルス分離、血清抗体の検出ならびに感染源動物の検査が行われる。

[1] ウイルス DNA の検出

患部水疱液、生検材料等から DNA サンプル を調製し、B ウイルス特異的 real-time PCR 法にて B ウイルスゲノム DNA を検出する。

<必要な試薬など>

- 0.5M EDTA (pH 8.0)
- Proteinase K
- SDS
- フェノール
- クロロフォルム
- エタノール
- 滅菌蒸留水
- B ウイルス gB 遺伝子検出用

primer

5' - CGTGGCCAGGTAGTACTGCAC-3'

5' - CTCGTCCGCTTCTCCTCGTC-3'

probe

5' - FAM-TAGCGCCGGAGGAA-MGB-3'

- B ウイルス gG 遺伝子検出用 (Perelygina et al. 2003 参照)

primer

5' -TGGCCTACTACCGGTGG-3'

5' -TGGTACGTGTGGGAGTAGCG-3'

probe

5' -FAM-CCGCCCTCTCCGAGCACGTG-MGB-3'

<検査手順>

(1) 試料調製 (DNA 抽出法)

検体 50 μ l に 0.5M EDTA (pH 8.0)を加えて、終濃度 20 mM にした後、Proteinase K (終濃度 1 mg/ ml) , SDS (終濃度 0.5%) をそれぞれ加えて、65°C 15 分間、さらに 37°C で一昼夜保温する。その後、常法に従い、フェノール、クロロフォルム抽出、エタノール沈澱を行い、70%エタノールで DNA を 2 回洗浄・乾燥後、10 μ l の純水で溶解する。もしくは、市販の DNA 抽出用キットを用いて精製する。

(2) Real time PCR

1) 反応液

検体DNA	2~4 μ l
TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied)	12.5 μ l
Sonicated salmon sperm DNA (100 μ g/ml)	0.5 μ l
primer (25 μ M each)	0.2 μ l
probe (10 μ M)	0.5 μ l
H ₂ O	up to 25 μ l

2) サイクル条件

50°C	2min	40cycle
95°C	10min	
95°C	15sec	
60°C	60sec	

B ウイルス gB または gG 遺伝子を含むプラスミドを定量用スタンダードとする。また、必ず被験 DNA を含まない陰性対照を同時に実施する。また、HSV 及び VZV に対するリアルタイム PCR を同時に実施することが推奨される。病原体マニュアルの「性器ヘルペス」及び「水痘帯状疱疹」の項を、参照されたい。

[2] ウイルス分離

(1) 検体の処理

<必要な試薬など>

- ・ウシ胎仔血清(FCS) (56°C、30 分間非働化したもの)
- ・Eagle' s modified essential medium (EMEM) 培地
- ・細胞増殖用培養液 (5% FCS 加 EMEM)
- ・細胞維持用培養液 (2%FCS、100 IU / ml アンピシリン 100 μ g / ml ストレプトマイシン、2.5 μ g /ml ファンギゾン加 EMEM)
- ・PBS (-)

- ・ 0.05%トリプシン-0.53mM EDTA 液

<検査手順>

- 1) 患部水疱液やぬぐい液をウシ胎仔非動化血清(FCS)20%を含む EMEM 培地と混合した後、検査試料の雑菌を除くため 3000rpm、20 分間遠心し、その上清を接種材料とする。生検材料については同培地で 10%乳剤としてその遠心上清を接種材料とする。採取後直ちに検査を行う場合は 4℃に、行えない場合は-70℃に保存する。
- 2) 対数増殖期にある Vero 細胞を 25cm² フラスコを準備し、処理検体を接種する。
- 3) 37℃、1 時間炭酸ガス培養器内に保温し、吸着させた後、細胞維持用培養液を加え培養器内で培養する。
- 4) 倒立顕微鏡下で毎日観察し、細胞変性が観察された場合は、前述のウイルス DNA 検出により、B ウイルス DNA を確認する。

[3] 病理学的検査

患部の生検組織、患者が不幸にして死亡した場合剖検組織が解析の対象となる。生検・剖検組織は中性緩衝ホルマリンで確実に固定することにより感染性は喪失する。採取された組織材料は採材直後に中性緩衝ホルマリンで固定を行い速やかに検査室に輸送する。固定の後に通常の方法でパラフィンに包埋する。免疫組織学的に B ウイルスを検出できる抗体は現在、国内で入手できないので、標本作製、通常の染色標本での光顕的観察とともに、病理組織からの PCR により B ウイルスの存在を確定する。

<必要な試薬など>

- ・ 10%中性緩衝ホルマリン（市販）
- ・ 病理学的検索で通常使われる試薬一式

[4] 血清学的検査

人体例において、HSV-1 ならびに HSV-2 抗体陽性者では、血清中の抗 HSV 抗体と B ウイルス特異的抗体を区別する方法は現段階では困難であり、現状では国立感染症研究所では実施されていない。

[5] 感染源動物の検査

被検患者の検査や治療等の参考とするため接触のあったサルを検査が必要な場合は、当該サルがウイルスを排泄していたか否かを知るためにウイルス分離やウイルス DNA 検出の検査がなされる。一部の施設では血清学的検査としての B ウイルス抗体検査は、主に飼育サルのコロニーや導入サルの衛生管理のために行われているとされているが、現状では国立感染症研究所では実施されていない。サルに関するこれらのウイルス学的検査が陰性であったとしても、感染源にならないということを証明することにはならないことを銘記する必要がある。

(1) ウイルス分離

被験患者に接触があったサルの口腔内ぬぐい液、泌尿生殖器ぬぐい液等が検査の対象となる。検査の方法は前述と同様に行う。

(2) ウイルス DNA の検出

被験患者に接触があったサルの口腔内ぬぐい液、泌尿生殖器ぬぐい液等が検査の対象となる。検査の方法は前述と同様に行う。

(3) 血清学的検査

現状では国立感染症研究所では B ウイルス特異的抗体検査は実施されていない。

【5】 実験室診断

脳脊髄液などの検体から B ウイルス遺伝子が増幅された場合、B ウイルスが分離された場合、急性期および回復期の B ウイルス抗体価の有意な上昇が確認された場合に B ウイルス感染症 (B ウイルス病) と診断される。また、病理組織において B ウイルス抗原や遺伝子が検出された場合も同様である。

【6】 参考文献

1. 吉川泰弘. B ウイルス感染症、エマージングディジーズ (竹田、五十嵐、小島編) pp265-270, 1999、近代出版
2. 岩崎琢也、向井鎌三郎、倉田毅 : B ウイルス。小児科臨床 51: 2555-2559, 1998
3. Tanabayashi K, Mukai R, Yamada A. Detection of B virus antibody in monkey sera using glycoprotein D expressed in mammalian cells. J Clin Microbiol 39:3025-3030, 2001
4. Holmes GP, Chapman LE, Stewart JA, et al: Guideline for the prevention and treatment of B-virus infections in exposed person. Clin Infect Dis 20:421-439, 1995
5. Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL). 5th edition Washington, DC: US Government Printing Office, 2007
6. Perelygina L, Patrusheva I, Manes N, Wildes MJ, Krug P, Hilliard JK. Quantitative real-time PCR for detection of monkey B virus (Cercopithecine herpesvirus 1) in clinical samples. J Virol Methods 109:245-251, 2003
7. Cohen JI, Davenport DS, Stewart JA, Deitchman S, Hilliard JK, Chapman LE and B virus Working Group. Recommendations for prevention of and therapy for exposure to B virus (Cercopithecine herpesvirus 1). Clin Infect Dis 35:1191-203, 2002 (和訳) 光永聡子, 藤本浩二, 中村伸 : B ウイルス (*Cercopithecine Herpesvirus 1*) 感染の予防、緊急対応および治療に関するガイドライン. 霊長類研究 20:147-164, 2004.

【7】 問い合わせ先

〒162-8640 東京都新宿区戸山 1-23-1 国立感染症研究所

患者治療及び患者検体に関して

ウイルス第一部（西條政幸、福士秀悦：03-5285-1111、info@niid.go.jp）

病理検体に関して

感染病理部（鈴木忠樹：03-5285-1111、info@niid.go.jp）

【8】 執筆者一覧

福士秀悦、山田壮一、西條政幸：国立感染症研究所ウイルス第一部

鈴木忠樹：国立感染症研究所感染病理部