

目次

- 【1】 Bウイルス感染症の概説
- 【2】 Bウイルス検査の必要性の判断
- 【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] 検査の判定
- 【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】 判定基準
- 【6】 引用文献
- 【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Cercopithecine herpesvirus 1 (CeHV-1)であるが、一般的には、B virusやHerpesvirus simiaeと呼ばれている。他のヘルペスウイルスと同様に、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たウイルス構造を持つ。カプシドとエンベロープの間には、テグメント蛋白が存在している。ウイルス粒子は直径約120-200nmである。アカゲザルより分離されたE2490株において全ゲノム配列(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	略号	通称名	自然宿主
human herpesvirus 1	HHV-1	単純ヘルペスウイルス1型 (HSV-1)	ヒト
human herpesvirus 2	HHV-2	単純ヘルペスウイルス2型 (HSV-2)	ヒト
Cercopithecine herpesvirus 1	CeHV-1	B virus, HV simiae	アカゲザル
Cercopithecine herpesvirus 2	CeHV-2	SA8	アフリカミドリザル
Cercopithecine herpesvirus 16	CeHV-16	Herpesvirus papio 2, Baboon herpesvirus 2	ヒヒ

Bウイルスは、アカゲザル、カニクイザル、ニホンザル、ブタオザルなどのアジア産マカク属サルを自然宿主とし、サルあるいはサルの排泄物（唾液、その他）との接触により人体に感染する。具体的には咬傷、擦過、あるいは唾液・便等の排泄物、感染サル組織材料により感染する。自然宿主たるマカク属サル感染では重症となりにくく、急性感染後、潜伏性に感染し、ときにウイルスを排出している。なお、アジア産マカク属以外のサルの場合には、Bウイルス感染症に罹患する可能性は極めて低い。

本ウイルスによるヒトの感染は非常にまれで、これまで世界での感染事例は50例程度とされているが、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。本邦での報告はなく、確定診断法も十分に開発されていないのが現実である。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、掻痒感、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、脳炎症状を呈すること、
- E)無治療での致死率は70～80%である。
- F)生存例でも重篤な神経障害が後遺症としてみられることがある。

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検索する必要がある。

【2】 Bウイルス検査の必要性の判断

本感染症における検査の必要性の判断において考慮すべきことは、

- a) 本ウイルスがHSV-1、-2と抗原性が非常に類似していること。
- b) HSV-1あるいはHSV-2に感染しているヒトが多く、ヒトの診断では血清抗体による鑑別が困難であること。
- c) 本ウイルス感染は感染サルまたはサル由来の組織・分泌物・汚物を介さなければ感染が生じないこと。
- d) アジア産マカク属以外のサルの場合には、Bウイルス感染症に罹患する可能性は極めて低いこと。
- e) 副作用が少なくαヘルペスウイルス亜科のBウイルスを含むヘルペスウイルスに効果的な抗ウイルス薬としてアシクロビルやバラシクロビルなどがあること。

以上のことから、

- 1) 感染源となるアジア産マカク属などのサルまたはその組織等に接触があり、その症状から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・脳脊髄液などの検体を採取し検査を行う。
- 2) 一方、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が無症状の場合には、血清保存を行い、検査は実施せず経過観察を行うことが重要である。
- 3) 症候性もしくは無症候性（アジア産マカク属などのサルに伴う事故後）のいずれの場合においても、検査の実施や検査結果を待つのではなく、医師の判断に基づき治療もしくは発症予防目的にアシクロビルなどを早期に投与することが推奨される。
- 4) アシクロビルなどを投与してもBウイルス感染症と思われる症状の改善が見られない場合やBウイルス感染症と思われる病状が発症した場合には、鑑別診断を目的とした検査や薬剤耐性株の出現の可能性を検討するために、アシクロビル投与前に採取しておいた検体も含めて検査を行う。また、抗ウイルス薬投与後2週間、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、治療を中止する。検査も不要である。

【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（ヘルペスBウイルス）取り扱い（Bウイルス（ヘルペスBウイルス）感染を疑うサル及び患者検体からのウイルス分離）に関するマニュアル」を平成11年4月に作成し、これを遵守して取り扱っている。本マニュアルには、診断のための少量培養にはP3実験施設でBSL3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1検体につき培養面積25 cm²の培養容器2個に相当する量以内である。また、実験動物を用いてのウイルス分離は原則として行わない。

[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℃以下で凍結に保存す

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の B ウイルスを含む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」に準拠に準じて行う。

[3] 検査の進め方

ヒトにおける感染の可能性が発生した場合の実験室診断は以下の試験の実施を行う。

- a) 患部からのウイルスゲノム DNA の PCR 検出
- b) 必要に応じて、ウイルス分離
- c) 被験患者血清の B ウイルス抗体の検出
- d) 接触したあるいは感染源と推定されるサル特定の検査(血清抗体の検出、口腔ぬぐい液等からのウイルス分離またはウイルスゲノム DNA の検出)

[4] 検査の判定

実験室検査の結果およびサルとの接触歴、並びにヒトヘルペスウイルス感染の既往等を考慮して総合的に判定する。

【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 の検出を行う。

<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'-CCGCGTACGACTACGAGATCC-3'

5'-GTTCGCGGCCACGATCCA-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'-TGGCCTACTACCGCGTGG-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 $^{\circ}$ C 15 分間、さらに 37 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C	2min	40cycle
95 $^{\circ}$ C	10min	
95 $^{\circ}$ C	15sec	
60 $^{\circ}$ C	60sec	

定量のためのスタンダードとして、B ウイルス gB または gG 遺伝子を含むプラスミドを用いる。また、被験 DNA を含まない陰性対照を必ず同時に実施する。また、結果が陰性の場合には、HSV 及び VZV に対するリアルタイム PCR を実施することも推奨される。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℃、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 µg / ml ストレプトマイシン、2.5 µg /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働化血清(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。固定の後に通常の方法でパラフィンに包埋する。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。なお、40%ホルムアルデヒド（ホルマリン）を水道水で10倍に希釈した溶液は、抗原性が著しく低下するので使用してはならない。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、抗 HSV 抗体を使用して除外診断として解析することになる。しかし、この解釈は現在確定していない。従って、平成 23 年 8 月の時点では標本作製、通常の染色標本での光顕的解析の段階までが可能である。HSV 感染では核内封入体の形成が特徴的であるが、B ウイルスでは形成されないとする報告もあり、その病理像についても検討の余地が残されている。いずれ、B ウイルス特異的抗体が入手できることが予想されており、貴重な検体を保存することが望まれる。

<必要な試薬など>

- ・ 蒸留水
- ・ 封入材

- ・ 染色液：ヘマトキシリン、エオシン
- ・ 染色バット
- ・ 染色籠
- ・ 特級エタノール
- ・ 特級メタノール
- ・ 特級キシロール
- ・ ピンセット
- ・ スライドグラス
- ・ カバーグラス
- ・ 光学顕微鏡

(リリーの緩衝ホルマリンの組成)

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 44g

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 163.8g

特級ホルマリン 1 l

蒸留水 全量 10 l となるように蒸留水を加える

[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、本邦での実施はなされていない。

[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。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。被検患者に接触のあったサルの血清抗体検査は、接触時以前に当該サルがウイルスに感染していてウイルス排泄の可能性があったか否かを知ることができる。

(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

サル血清の B ウイルス抗体検査実施機関として、（社）予防衛生協会（茨城県つくば市）があり、問い合わせのうえ依頼できる。

【5】 診断基準

本邦において、ヒトの B ウイルス感染確定例は報告されていないため、その判定は慎重に行う。最も確実なのは患者材料からの B ウイルス DNA の検出もしくはウイルス分離である。感染を疑った場合、ゲノム DNA 検出検査を行うが、必ず、偽陽性（コンタミネーション）の可能性を否定しなければならない。必要に応じて少量培養系でのウイルス分離を P3 施設を有する検査機関に依頼する。傍証として、1) 患者のマカク属サルとの接触歴、2) サルの唾液・尿などの体液にウイルス DNA を検出できれば、ほぼ確定的となる。剖検における組織学的解析は確立していないが、今後の進展により開発されることが予想されるので、ヒトの中枢神経組織ならびに咬傷部位をホルマリン固定したパラフィン組織の採取、保存が望まれる。

【6】 参考文献

1. 吉川泰弘, 1999, B ウイルス感染症、エマージングディゼイズ（竹田、五十嵐、小島編）265-270、近代出版
2. 岩崎琢也、向井鐐三郎、倉田毅：B ウイルス。小児科臨床 51: 2555-2559, 1998
3. Tanabayashi, K., R. Mukai, and A. Yamada. 2001. Detection of B virus antibody in monkey sera using glycoprotein D expressed in mammalian cells. J. Clin. Microbiol., 39, 3025-3030.
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. 2003 109:245-251
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 2002;35:1191-203 (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：03-4582-2660）

病理検体に関して

感染病理部（長谷川秀樹：03-4582-2700）

【8】執筆者一覧

井上直樹：国立感染症研究所ウイルス第一部

山田壮一：国立感染症研究所ウイルス第一部

棚林 清：国立感染症研究所獣医科学部