

リアルタイムPCR法によるパレコウイルスA検出法の開発及び検出状況 (2022年度から2023年度)

原田 幸子^a, 熊谷 遼太^a, 岡田 若葉^a, 矢尾板 優^a, 高橋 久美子^a, 長島 真美^a, 貞升 健志^b

リアルタイム PCR 法によるパレコウイルス A (PeV-A) 遺伝子検査法を新たに構築した。本検査法を用いて、2022 年度、2023 年度の発生動向調査及び積極的疫学調査で搬入された 634 例を対象に PeV-A の検索を実施した。その結果、39 例から PeV-A 遺伝子を検出した。検出された PeV-A は、A1 型 13 例、A3 型 18 例、A4 型 1 例、A6 型 7 例であった。PeV-A が検出された年齢は、0 歳から 6 歳であり、呼吸器感染症や発疹症から検出された。PeV-A が単独で検出された疾患は、手足口病、突発性発疹、不明発疹、ヘルパンギーナ、麻疹・風しん、伝染性紅斑、流行性耳下腺炎であったが、多くの検体で PeV-A 以外のウイルスとの重複感染も確認された。PeV-A が単独で検出された疾患は臨床診断名が発疹症であることが多い傾向にあった。

キーワード：パレコウイルスA, PeV-A , 不明発疹症, リアルタイムPCR法, 手足口病, 突発性発疹, 不明発疹, ヘルパンギーナ, 麻疹・風しん, 伝染性紅斑, 流行性耳下腺炎

はじめに

パレコウイルス A (PeV-A) はピコルナウイルス科パレコウイルス属に分類され、プラス鎖の ssRNA をゲノムとして有している。かつてのエコーウイルス 22 型及び 23 型が 1999 年にパレコウイルス属として独立後¹⁾、それぞれ PeV-A1 型、A2 型とされ、さらに A19 型まで分類されている²⁾。本ウイルスは、呼吸器感染症、胃腸炎、発疹症などの小児でよくみられる多彩な感染症の原因ウイルスである。特に PeV-A3 型は 2004 年に初めて報告されて以降³⁾、新生児や生後 3 か月以下の乳児で敗血症、髄膜炎などの重症感染症を引き起こすことが報告されている⁴⁾。さらに近年では成人及び小児において、四肢に生じる強度の筋痛、筋脱力等の症状を呈する流行性筋痛症との関連性が指摘されている⁵⁾。しかし、流行性筋痛症については、感染症発生動向調査の対象疾患となっておらず、成人での流行状況の詳細は分かっていない。また、小児においても PeV-A の主となる疾患は特定されておらず、PeV-A の実態把握はなされているとはいえない。

新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の流行に影響を受け、多くの疾患で患者報告数が減少していた。2023

年 5 月の COVID-19 政策の終了後、様々な疾病が再流行する中で、PeV-A 感染の実態把握を目的として、PeV-A1 から A8 型を検出可能なリアルタイム PCR の検査系を構築し、2022 年度及び 2023 年度の流行状況を調査した。

実験方法

1. リアルタイムPCR法によるPeV-A遺伝子の検出

1) プライマー及びプローブの設定

プライマー及びプローブは、GenBankに登録されているPeV-A1型からA8型の参照配列 (PeV-A1 : GQ183019, GQ183020, JX575746, GQ83022, EF051629. PeV-A2 : AJ005695. PeV-A3 : JX682576, AJ889918. PeV-A4 : AB433629, AM235750, DQ315670 . PeV-A5 : HQ696576, JX050181, AM235749. PeV-A6 : HQ696577, AB252582, FJ888592, EU077518. PeV-A7 : EU556224. PeV-A8 : EU716175) を取得し、A1からA8型に共通し、塩基配列が高度に保存されているPolypotein領域にリアルタイムPCR系を設計した (表 1) 。なお、プライマー及びプローブの設計にはPrimer Express v3.0.1 (Thermo Fisher

表 1. リアルタイム PCR 法のプライマーおよびプローブ

名前	primer/probe	配列 (5'-3')	位置*
PeV-A-F3	Forward primer	GGTARTARTGCAAACACTAGTTGTAAGGC	517-545
PeV-A-F4	Forward primer	GGTAGTTAGGCAAGCACTAGTTGTAAG	517-543
PeV-A-R2	Revers primer	AGATCCAYAGTGTCDCTTGTTA	577-598
PeV-A-P2	Probe	FAM-CCACGAAGGATGCCCAGAAGGTACC-TAMRA	546-570

* AJ889918をレファレンスとした位置

^a 東京都健康安全研究センター微生物部ウイルス研究科
169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

^b 東京都健康安全研究センター微生物部

Scientific) を用いた。

2) 試薬及び反応条件

リアルタイムPCR反応は、供試RNA又はDNA標準液3 μ Lに、表1に示した各プライマー100 μ Mを等量混合したもの2 μ L、プローブ10 μ Mを1 μ L、及びOne Step Prime Scripttm III RT-qPCR Mix (takara) を使用した（最終反応量25 μ L）。QuantStudio 12K Flex Realtime PCR System（サーモフィッシャー）を使用し、52°C5分、95°C10秒の後、95°C5秒、58°C30秒の増幅反応を45サイクル実施した。

2. リアルタイムPCR法の特異性及び検出感度の検討

1) 合成DNA希釈系列の作製

検出系の感度を検証するため、PeV-A検出系のプライマー及びプローブの標的領域の塩基配列を含む、PeV-A1からPeV-A8型の96または98bpの合成DNA（Sigma-Aldrich）を用いて、RNaseFree Water（QIAGEN）により10倍希釈系列（10⁰ copies/ μ L～10⁷ copies/ μ L）の合成DNA希釈液を作製し、検出感度の測定に用いた。

2) PeV-A陽性患者検体を用いた検出感度の検討

2016年から2019年に発生動向調査の試料として東京都健康安全研究センターに搬入され、conventional PCR⁶⁾ で取得した配列をシーケンスした結果、PeV-A（PeV-A1型、2型、3型及び型不明）が検出された39検体を供試材料として用いた。

3) エンテロウイルスを用いた特異性の検討

PeV-Aの近縁ウイルスであるエンテロウイルス属のエコーウイルス（6, 11, 18, 25及び30型）、コクサッキーウイルスA群（5, 6, 9及び10型）及びコクサッキーウイルスB群（3及び5型）を検出した臨床検体を使用し、構築したリアルタイムPCRによる非特異反応の有無を検討した。

3. 2022年度及び2023年のPeV-A流行状況の調査

2022年4月から2024年3月までに定点医療機関及び都内保健所から当センターに搬入された5類定点把握疾患（感染性胃腸炎、性感染症、インフルエンザ、新型コロナウイルス感染症を除くウイルス性疾患）、5類全数把握疾患である麻疹・風しん、急性脳炎、急性弛緩性麻痺、水痘（带状疱疹含む）及び、インフルエンザ様疾患、ウイルス性肺炎疑いを対象とした。2022年度に搬入された236例（258検体）及び2023年度に搬入された398例（448検体）の合計634例（706検体）を対象に、リアルタイムPCR法でスクリーニング陽性となった検体について、conventional PCR⁶⁾ 及びシーケンスで型別を実施した。搬入された検体の内訳は、表2の通りである。

臨床検体からのRNA抽出は、QIAamp Viral RNA Mini Kit（QIAGEN）を用いた。抽出したRNA 3 μ Lを前述の

検査試薬22 μ Lと合わせ、25 μ LをリアルタイムPCRに供した。

表 2. 2022, 2023 年度に搬入された検体種の内訳

検体種	2022	2023	総計
咽頭拭い液（鼻咽頭拭い液含む）	199	326	525
結膜拭い液	1	58	59
血液（血清・血漿含む）	5	2	7
水疱内容物	2		2
髄液	11	19	30
糞便（直腸拭い液含む）	9	17	26
尿	6	14	20
鼻汁	20	10	30
その他	5	2	7
総計	258	448	706

4. 塩基配列の決定及び分子系統樹解析

PeV-A のVP1/VP3領域を標的としたconventional PCR⁶⁾ により得られたPCR産物は、QIAquick PCR Purification Kit（QIAGEN）を用いて精製し、Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequence Kit（Applied Biosystems）によるシーケンス反応を行った。反応産物は、Centri-Sep Columns（PRINCETON SEPARATIONS）を用いて精製し、3500 Genetic Analyzer（Applied Biosystems）で塩基配列を決定した。

得られた塩基配列は、MEGA10⁷⁾を用いた最尤法⁸⁾により、分子系統解析（266塩基）を行った。

結果および考察

1. リアルタイムPCR法の特異性及び検出感度の検討

1) 合成DNA希釈液を用いた検出感度の検討

リアルタイムPCR法によるPeV-A遺伝子の検出感度を検討するため、10倍段階希釈した8種類の合成長鎖DNAを用いてPeV-A遺伝子検出を行った。その結果、本PeV-A検出系はPeV-A1型からA8型に対応する合成DNA希釈液を一部は10¹ copies/ μ Lまで検出したが、PeV-A1からPeV-A8型まですべての型で、10² copies/ μ L（Ct値：36.3～39.5）まで検出できた（表3）。

表 3. 合成 DNA の検出限界検査結果

	コピー数 (/ μ L)			
	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰
PeV-A				
PeV-A1	(+)	(+)	(-)	(-)
PeV-A2	(+)	(+)	(-)	(-)
PeV-A3	(+)	(+)	(-)	(-)
PeV-A4	(+)	(+)	(-)	(-)
PeV-A5	(+)	(+)	(+)	(-)
PeV-A6	(+)	(+)	(+)	(-)
PeV-A7	(+)	(+)	(-)	(-)
PeV-A8	(+)	(+)	(+)	(-)

(+) : 検出

(-) : 検出せず

2) PeV-A陽性患者検体を用いた検出感度の検討

2016年から2019年に発生動向調査の試料として東京都健康安全研究センターに搬入され、PeV-Aが検出された39検体（PeV-A1型、2型、3型及び型不明）について、リアルタイムPCR法によりPeV-A遺伝子の検出を行った。

その結果、38検体からPeV-A遺伝子（1型が7/7、2型が1/1、3型が29/30、6型が1/1、型不明が1/1）を検出した。1検体（3型）を検出できなかった理由として、検体に含まれるウイルス量が微量であったか、保存期間が長期であったことから、RNAになんらかの影響が加わった可能性が考えられた。

3) エンテロウイルスを用いた特異性の検討

エンテロウイルス属のエコーウイルス（6、11、18、25及び30型）、コクサッキーウイルスA群（5、6、9及び10型）及びコクサッキーウイルスB群（3及び5型）を使用し、非特異反応の有無を検討した結果、いずれのウイルスもリアルタイムPCRにより増幅は認められなかった。

2. 2022年度及び2023年のPeV-A流行状況の調査結果

2022年度に搬入された236例及び2023年度に搬入された398例の合計634例を対象に、構築したリアルタイムPCR法でスクリーニング後、conventional PCR⁶⁾及びシーケンスによる型別を行った。その結果、それぞれ2022年度は11例（4.7%）及び2023年度は29例（7.3%）からPeV-Aが検出された。その内訳は、2022年度はPeV-A1型が7例、A3型が3例及びA4型が1例、2023年度はPeV-A1型が6例、A3型が15例及びA6型が7例検出された（図1）。また、検出月は、5月から1月で、PeV-A3型は5月から9月の夏季に、A6型は9月から1月の秋冬季に、A1型は、6

月から12月に検出された。2023年度はPeV-A3型が他の型に比べ多数検出されており、A3型の流行傾向にあったことが推測される。また、PeV-Aが検出された年齢を見ると、1歳以下が24例と半数以上を占めており、2歳で5例、3歳も5例検出し、6歳までPeV-Aが検出された（図2）。小児での検出が多数を占める理由として、対象とする定点が主として小児科定点であること、かつ、筋痛症などのPeV-Aが成人に引き起こす疾患が調査対象とされていないことが考えられる。

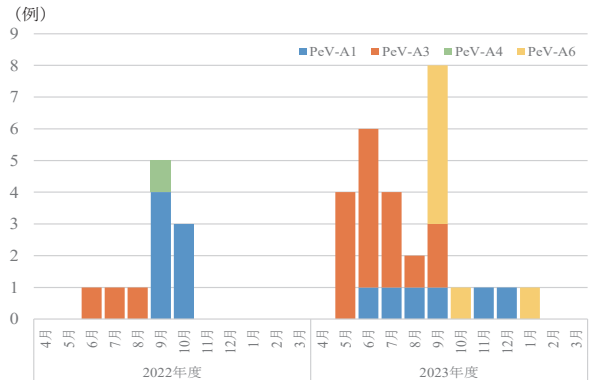


図 1. PeV-A の検出数と検出時期

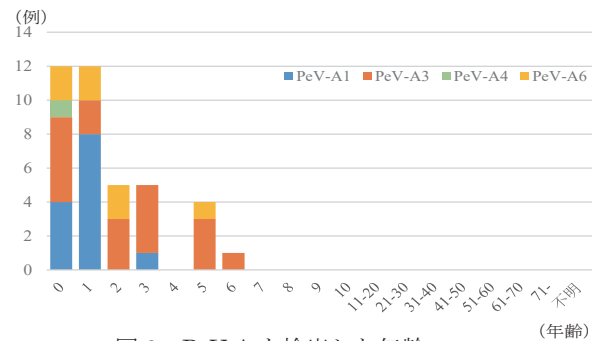


図 2. PeV-A を検出した年齢

表 4. 調査した疾患名と PeV-A の検出状況

疾患名	2022					2023				
	PeV-A1	PeV-A3	PeV-A4	(一)	検出割合	PeV-A1	PeV-A3	PeV-A6	(一)	検出割合
R S ウイルス感染症	3		1	34	5.6				13	0.0
アデノウイルス感染症									3	0.0
インフルエンザ様疾患	1			13	3.7					
ウイルス性肺炎疑い				2	0.0					
ヘルパンギーナ				3	0.0	2	1		15	9.1
咽頭結膜熱				19	0.0	1	2	1	32	5.9
急性弛緩性麻痺				4	0.0				6	0.0
急性脳炎				1	0.0				2	0.0
手足口病	3	1		44	4.3	1	1	1	18	7.7
水痘（帯状疱疹）				9	0.0					
川崎病				2	0.0				1	0.0
弛緩性麻痺				1	0.0				1	0.0
伝染性紅斑							1		3	14.3
突発性発疹				14	0.0		1	1	14	6.7
不明発疹症		2		30	3.2	1	6		48	6.8
麻しん風しん（CRS含む）				25	0.0	1	1	3	139	1.8
無菌性髄膜炎				9	0.0		1		9	5.3
流行性角結膜炎				1	0.0				56	0.0
流行性耳下腺炎				14	0.0		1	1	9	10.0
合計	7	3	1	225	2.4	6	15	7	369	3.7

それぞれの型が検出された疾患名について、表4にまとめた。PeV-Aは、RSウイルス感染症やインフルエンザ様疾患などの呼吸器疾患からの検出も見られ、ヘルパンギーナ、手足口病や突発性発疹、不明発疹症などの発疹性疾患からの検出も多く見られる。特に、PeV-A3型が流行した2023年は、不明発疹症からの検出が多くみられた。

PeV-AとPeV-A以外のウイルスが重複感染していたものを表5に示した。呼吸器疾患では、臨床診断がRSウイルス感染症、咽頭結膜熱、インフルエンザ様疾患で重複感染が認められた。呼吸器疾患で重複感染していたウイルスは、RSウイルスA型（RSVA）、アデノウイルス（AdV）2型・3型、コクサッキーA群ウイルス（CA）10型・16型、ヒトライノウイルス（HRV）であった。発疹性疾患では、臨床診断名が手足口病、突発性発疹、不明発疹症、ヘルパンギーナ及び、麻しん・風しんにおいて重複感染が認められ、検出されたウイルスは、CA2型・6型・9型及び16型、エンテロウイルス71型（EV71）、HRV、ヒトヘルペスウイルス（HHV）6型、AdV1型、麻しんウイルスA型、新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）、ヒトパラインフルエンザウイルス（PIV）3型と多様であった。重複感染で検出されたウイルスの多くは疾患との関連性が明らかになっているウイルスであるが、HHV6型、HRV、PIV3型及び、SARS-CoV-2等の検出された疾患との関連性が明らかではない場合も多く、陽性結果の解釈には注意する必要がある⁹⁾。また、HRVについても様々なウイルスと重複感染すること^{10,11)}や、不顕性感染すること¹²⁾が知られており、検出された疾患の原因ウイルスであるかは明確ではない。

今回不明発疹症から検出された重複感染のウイルスはHRVが多く（重複感染例5例中3例）、その全てでPeV-A3型が検出されていることから、PeV-A3型の病態への関与が示唆される。

さらに、単独でPeV-Aが検出された例を見ると、臨床診断名が手足口病、突発性発疹、不明発疹症、ヘルパンギーナ、麻しん・風しん、伝染性紅斑、流行性耳下腺炎であった（表6）。流行性耳下腺炎以外は全て発疹症であり、流行性耳下腺炎の2例を抜いた13例中8例でPeV-A3型が検出されている。PeV-A3型では新生児や生後4か月未満の乳児において髄膜炎や脳炎、敗血症を起こすことが知られているが、発疹も呈することが報告されている²⁾。また、A1型及びA6型が単独で検出された疾患も発疹症が多いことから、A1型、A6型も発疹症に関与している可能性が示唆された。一般にA1型は、胃腸炎からの報告がある¹⁾が、今回対象とした疾患の中に胃腸炎は含まれておらず、今後は胃腸炎患者も含めた流行状況の把握が必要である。

表 5. 臨床診断名と PeV-A と重複感染していたウイルス

疾患名	検出年度	年齢	検出病原体 1	検出病原体 2	検出病原体 3	重複感染例/検出例
RSウイルス感染症	2022	0	PeV-A 4	RSVA		4/4
		0	PeV-A 1	RSVA	Ad2	
		1	PeV-A 1	RSVA		
		0	PeV-A 1	RSVA		
咽頭結膜熱	2023	2	PeV-A 3	AdV2	HRV	4/4
		5	PeV-A 3	CA10		
		0	PeV-A 1	HRV	AdV3	
		0	PeV-A 6	AdV3	CA16	
インフルエンザ様疾患	2022	1	PeV-A 1	RSVA		1/1
手足口病	2022	2	PeV-A 3	CA6		5/7
		1	PeV-A 1	CA6		
		1	PeV-A 1	CA6		
	2023	3	PeV-A 3	EV71		
突発性発疹	2023	2	PeV-A 6	CA9		1/2
		2	PeV-A 6	CA16	HRV	
不明発疹症	2022	1	PeV-A 3	HRV		5/9
	2023	0	PeV-A 3	HRV		
		0	PeV-A 3	HRV	AdV 1	
		0	PeV-A 3	HRV		
		1	PeV-A 1	麻しんウイルスA型	HRV	
ヘルパンギーナ	2023	0	PeV-A 1	CA2	SARS-CoV-2	2/3
		1	PeV-A 1	PIV3		
麻しん風しん	2023	1	PeV-A 6	HHV6		1/5

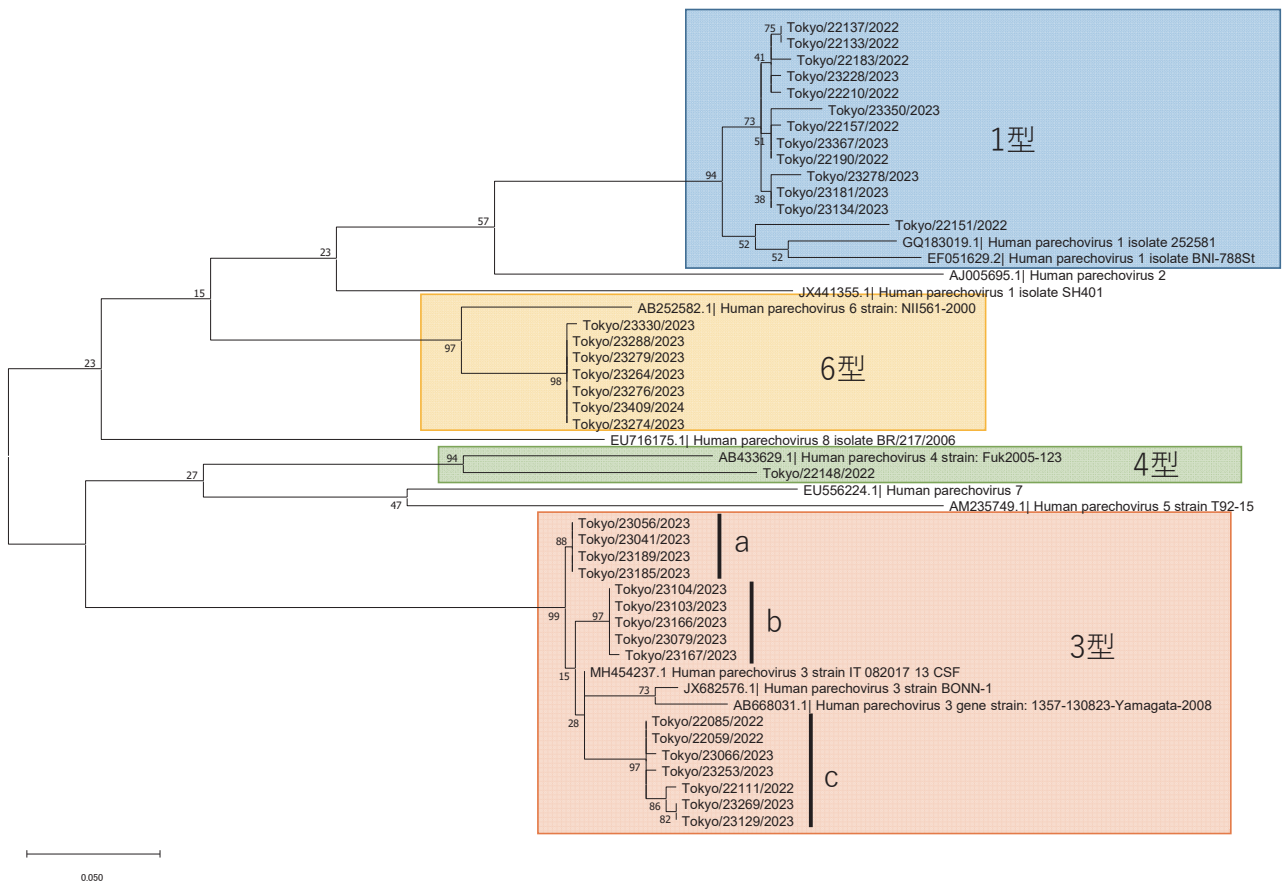


図 3. 2022, 2023 年度に検出された PeV-A の系統樹解析 (最尤法, 266 塩基)

表 6. PeV-A が単独で検出された例

疾患名	検出年度	年齢	検出病原体 1
手足口病	2023	1	PeV-A 1
		1	PeV-A 1
突発性発疹	2023	3	PeV-A 3
不明発疹症	2022	0	PeV-A 3
		6	PeV-A 3
		2	PeV-A 3
		3	PeV-A 3
ヘルパンギーナ	2023	3	PeV-A 3
麻しん風しん	2023	5	PeV-A 3
		1	PeV-A 6
		0	PeV-A 6
		3	PeV-A 1
伝染性紅斑	2023	1	PeV-A 3
流行性耳下腺炎	2023	5	PeV-A 3
		5	PeV-A 6

今回検出された PeV-A から得られた塩基配列は、MEGA10⁷⁾を用いた最尤法⁸⁾により、分子系統解析 (266 塩基) を行った (図3)。その結果、東京都で検出された A6 型は、2007 年に新潟で報告された株とは異なるが、ほぼ同一の株が流行していたことが分かった。A4 型については、検出数が 1 株なので詳細は不明だが、2005 年に福岡市で検出された AB433629 とは異なる系統のウイルスであったことが判明した。さらに A1 型、A3 型も同様に、それぞれの近縁な配列 (GQ183019 及び MH454237) とは異なる系統のウイルスが流行していた。今回の分子系統樹解析で、A3 型はさらに a から c の 3 系統

に細分できた。この遺伝的な変異が何を表すのかは不明だが、引き続き調査し、検討していく必要がある。

ま と め

リアルタイム PCR 法によるパレコウイルス A (PeV-A) 遺伝子検査法を新たに開発した。本検査法を用いて、2022 年度、2023 年度の発生動向調査で搬入された検体及び積極的疫学調査で搬入された 634 例を対象に PeV-A の検索を実施した。その結果、40 例から PeV-A 遺伝子を検出した。検出された PeV-A は、A1 型 13 例、A3 型 16 例、A4 型 1 例、A6 型 7 例であった。PeV-A が検出された年齢は、0 歳から 6 歳であり、1 歳以下が 24 例と半数以上を占めた。PeV-A は呼吸器感染症からも発疹症からも検出された。多くの疾患で PeV-A のみならず、それ以外のウイルスとの重複が確認された。また、PeV-A が単独で検出された疾患は、臨床診断名が手足口病、突発性発疹、不明発疹症、ヘルパンギーナ、麻しん・風しん、伝染性紅斑、流行性耳下腺炎だった。単独で検出された疾患は発疹症が多く、発疹症との関連が示唆された。今回の解析は、感染性胃腸炎を対象としていないが、PeV-A 1 型は感染性胃腸炎からの報告も多く、今後 PeV-A の流行状況の把握には感染性胃腸炎も含んだ解析が必要と考える。

文 献

- 1) 伊藤 雅, 山下照夫, 皆川洋子: モダンメディア, **53**, 329-336, 2007.
- 2) 相澤悠太, 齋藤昭彦: 臨床と微生物, **46**, 697-702, 2019.
- 3) Ito, M., Yamashita, T., Tsuzuki, H., *et al.*: *J Gen Virol.* **85**: 391-398, 2004.
- 4) Schuffenecker I., Javouhey E., Gillet Y., *et al.*: *J Clin Virol.* **54**, 337-341, 2012.
- 5) Mizuta K., Kuroda M., Kurimura M., *et al.*: *Emerg Infect Dis.* **18**, 1787-1793, 2012.
- 6) Harvala H., Robertson I., Leitch ECM., *et al.*: *J Clin Microbiol.* **46**, 3446-3453, 2008.
- 7) Kumar S., Stecher G., Li M., *et al.*: *Mol Biol Evol.* **35**, 1547-1549, 2018.
- 8) Tamura K. and Nei M.: *Mol Biol Evol.* **10**, 512-526, 1993.
- 9) 国立感染症研究所: 発生動向調査年別報告数一覧.
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/kansennohanashi/532-exanthem-subitum.html> (2024 年 7 月 10 日現在, なお本 URL は変更または抹消の可能性がある)
- 10) 北川和寛, 富田 望, 鈴木理恵, 他: 福島県衛生研究所年報, **33**, 41-45, 2015.
- 11) Tsatsral S., Xiang Z., Fuji N., *et al.*: *Jpn J Infect Dis.*; **68**, 280-287, 2015.
- 12) Peltola V., Waris M., Osterback R., *et al.*: *J Infect Dis.* **197**, 382-389, 2008.

**Development of a Real-Time Polymerase Chain Reaction Method for Detecting Parechovirus A and
Analysis of Its Detection from April 2022 to March 2024**

Sachiko HARADA^a, Ryota KUMAGAI^a, Wakaba OKADA^a, Yuu YAOITA^a,
Kumiko TAKAHASHI^a, Mami NAGASHIMA^a, and Kenji SADAMASU^a

This study developed a new real-time polymerase chain reaction method for detecting Parechovirus A (PeV-A) in samples of 634 cases obtained from outbreak trend surveillance and active epidemiological surveillance from April 2022 to March 2024. The PeV-A gene was detected in 39 cases including 13 type A1, 18 type A3, 1 type A4, and 7 type A6. The ages during PeV-A detection ranged from 0 to 6 years. The genes were detected from both respiratory infections and rash diseases. Although co-infection with viruses other than PeV-A was confirmed in many diseases, PeV-A alone was detected in exanthematous diseases such as hand, foot, and mouth disease, exanthema subitum, erythema subitum, herpangina, measles/rubella, erythema infectiosum, and mumps.

Keywords: Parechovirus A, PeV-A, respiratory infections, rash diseases, hand, foot, and mouth disease, exanthema subitum, Roseola infantum, herpangina, measles and rubella, erythema infectiosum, mumps

^aTokyo Metropolitan Institute of Public Health,
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan