

パレコウイルス検査マニュアル

令和 6 年 3 月

Ver. 1

目次

- 1 概説
- 2 検査における一般的注意事項
- 3 臨床検体の種類と保存
- 4 検査材料の前処理
- 5 ウイルス分離
- 6 遺伝学的検査法
- 7 検出感度
- 8 その他

参考文献

1 概説

パレコウイルスは、ピコルナウイルス科パレコウイルス属 (genus *Parechovirus*) に分類される。6 つの種 (*Parechovirus A-F*) のうちヒトの感染症にとって特に重要なのは *Parechovirus A* であり 19 の遺伝子型が知られている^{1,2}。1956 年に分離されたウイルスは、それぞれエコーウイルス 22 型、23 型と命名されていたが、ゲノム構造の違いなどからそれぞれパレコウイルス A1 型・A2 型としてそれぞれ再分類された^{1,2}。パレコウイルス A3 型は、1999 年に愛知県内で発熱、胃腸炎、一過性の下肢麻痺を呈した 1 歳児の糞便検体から初めて分離され、2004 年に愛知県衛生研究所が論文発表した新しい型のパレコウイルスである³。また、パレコウイルス A6 型は新潟県保健環境科学研究所が、世界で初めて分離報告したウイルスである⁴。また、パレコウイルス A3 型が 20 世紀後半に出現した比較的新しいウイルスであることは山形県衛生研究所における 1976 年から 2017 年の血清疫学の結果から示唆された⁵。検出事例の報告数は、パレコウイルス A1 型と A3 型が多く、A4 型と A6 型がそれに続く^{1,4}。

パレコウイルスのゲノムは約 7300 塩基であり、単一のポリプロテインをコードし、ウイルス由来プロテアーゼ (3C) により 3 つの構造蛋白 (VP0, VP1, VP3) と 7 つの非構造蛋白 (2A-2C および 3A-3D) に分解される (図 1)。ピコルナウイルス (例: エンテロウイルス) は通常 4 つの構造蛋白 (VP1-4) がカプシドを形成するが、パレコウイルスでは VP0 から VP2 と VP4 へは開裂しない^{1,2,6}。

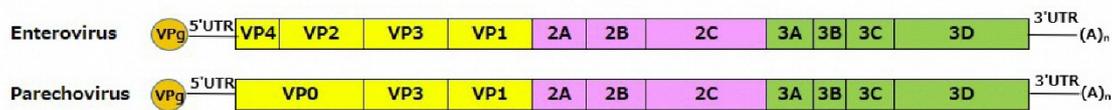


図 1. エンテロウイルスとパレコウイルスのゲノム構造。文献 2, 6をもとに改変。

パレコウイルス感染症は世界中で認められ、夏から秋にかけて流行することが多く、日本もこのパターンをとる^{1,7}。ウイルス検出や血清疫学調査の結果から不顕性感染も含め小児期に感染することが知られている^{2,5,7,8}。パレコウイルス感染症の多くは小児でよくみられる胃腸炎や急性気道感染症、発疹症などであるが、一部重症例の報告がある。特に、パレコウイルス A3 型は新生児・乳児における敗血症症候群や髄膜脳炎など重症感染症の原因ウイルスとして临床上重要であり、また小児・成人の流行性筋痛症の原因ウイルスとしても知られている^{2,9,10}。日本国内では 2008 年以来パレコウイルス A3 型を原因とする流行性筋痛症が繰り返し発生しているが、海外からの報告は無く、ユニークなウイルス感染症として注目されている^{7,11-17}。パレコウイルス A3 型による流行性筋痛症を含むパレコウイルス感染症は日本における感染症発生動向調査事業の対象疾患になってはいないが、新たなパレコウイルスの発見と流行性筋痛症の関連性に関する報告は日本の地方衛生研究所からなされたものであり、さらなる実態解明が期待される。

実験室内診断の方法には、ウイルス分離や遺伝学的検査があるが、細胞培養によるウイルス分離は困難であることが多く、主に遺伝学的検査が行われている (図 2)。2022 年 11

月より、全自動遺伝子解析装置 FilmArray® 髄膜炎・脳炎パネルが保険点数化され、医療機関における検査も可能となってきたが、いまだ病原性などに不明な点も多いことからウイルスを型別しデータを蓄積していくことが重要と考えられる。

パレコウイルスの検査は、新生児及び乳幼児における発疹や呼吸困難、敗血症、無菌性髄膜炎や感染性胃腸炎、感冒様症状あるいは筋痛症などの症例において実施することが有効である。なお、本マニュアルは、検査法における一つの参考例であり、今後必要に応じて随時更新していく予定である。

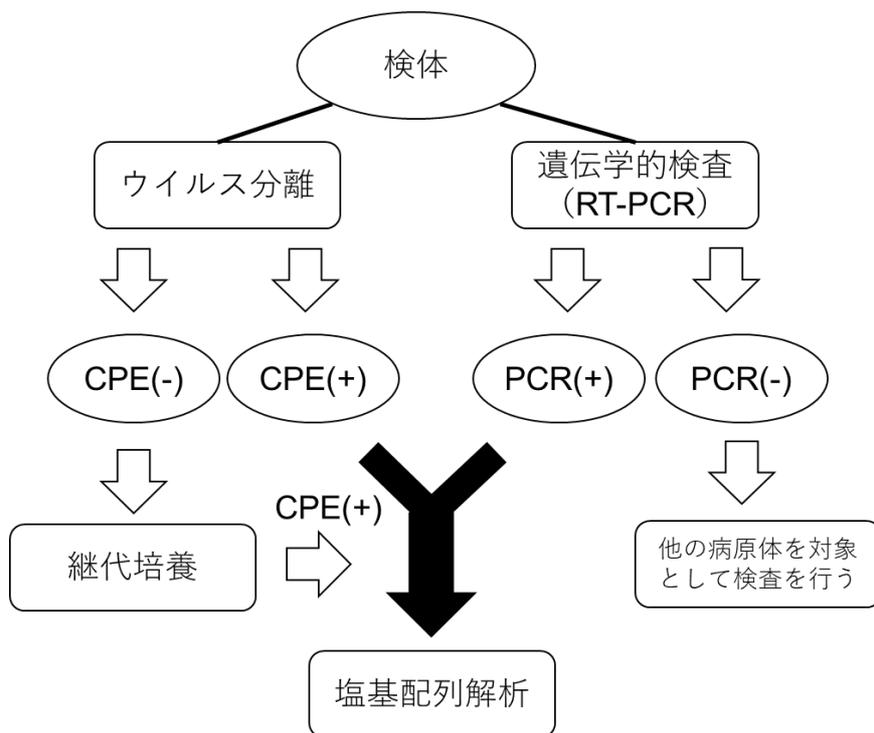


図2 一般的な検査の流れ

2 検査における一般的注意事項

検査に際し、臨床検体およびウイルスの取り扱いにはバイオセーフティレベル (BSL)2 施設および安全キャビネット (クラス IIA/IIB) 内で適切な操作を行うとともに、使用済みの器具等は高圧蒸気滅菌処理などにより感染性を排除した後に実験区域から搬出しなければならない。

3 臨床検体の種類と保存

3-1 検体の種類

検査に供する検体として、糞便からの検出率が高い¹⁹⁾。髄膜炎/脳炎を伴う場合には、髄液からも検出されるが一般に検出率は低いため、複数種類の検体を採取しておくことが肝

要である^{20, 21}。血清についても、発症後短期間しか検出されないこともあるため、同様に複数種類の検体を用いることが望ましい。咽頭拭い液を採取したフロックスワブは、乾燥を避けるため、ウイルス輸送培地 (VTM)等適切な保存液中に入れておく。すぐに検査に供しない場合、検体は-80°Cで凍結保存する。

3-2 臨床検体の特徴

原因特定や検出率を上げるためにはなるべく急性期に複数検体を採取することが重要である。したがって、下記の検体を組み合わせて採取することが望ましい (表)。

表 検体の種類と特徴

検体の種類	備考
咽頭拭い液	・ 検出率が高い。 ・ 乾燥をさけるため、スワブはウイルス輸送培地 (VTM 等) に入れる
糞便	・ 検出率が高い (長期に検出できる可能性がある)
髄液	・ 髄膜炎の時ウイルスが検出できれば価値が高い
血清	・ 発症後、検出期間が短い可能性がある

4 検査材料の前処理

VTM等にスワブが入っている場合は、VTM等の中でよく攪拌し、スワブは廃棄する。検査材料として3,000rpm、15分間、冷却 (4°C)遠心分離した上清を使用する。ウイルス分離用検体として糞便を用いる場合、VTMなど抗生物質の入った溶液で10%懸濁液を作成後、3,000rpm、15分間、冷却 (4°C)遠心分離した上清を0.22µmのフィルターで濾過して使用することが望ましい。

※ウイルス分離に関しては使用する検体によって、様々な前処理が必要である。特に血清から分離する際には抗体関連タンパクと考えられる感染阻害が散見されるため、パンクレアチンなどの酵素処理を実施することで分離率が向上している。

5 ウイルス分離

パレコウイルス A1 型は HEp-2 細胞、VeroE6 細胞、GMK 細胞、BSC-1 細胞、Caco-2 細胞、RD-18S 細胞、LLC-MK2 細胞などさまざまな細胞で分離されてきた^{4, 21}。パレコウイルス A3 型は愛知県の初分離では Vero 細胞、新潟県では BSC-1、Vero、LLC-MK2 細胞、Caco-2 細胞の使用が報告されている^{3, 4}。一方、RT-PCR 陽性の 9 検体から RD、GMK、CRFK、Vero 細胞で分離を試みたが 2 検体からしか分離ができなかった報告もあり、パレコウイルスの分離は必ずしも容易ではない^{22, 23}。しかし、Takagi らは最近ヒト腸管細胞である HuTu80(ATCC HTB-40)がパレコウイルスに対する感受性が高く、A1~A6 型のウイルスの迅速分離に有用であることを見出した²⁴。

山形県では、パレコウイルス A3 型による流行性筋痛症の検査を実施した際に、新潟県保

健環境科学研究所から分与を受けた LLC-MK2-N で分離することに成功し、もっぱらこの細胞を使用している。しかし、分離までに時間がかかることから、リアルタイム RT-PCR 法や RT-PCR 法などによるスクリーニングも有効である²⁵⁻²⁹。実際、陽性検体を細胞に接種しても、3-5 回の継代を必要とすることもあり、さらなる検討が必要と考えられている^{18, 23}。また、ウイルス分離法は、各所属で従来から行われている方法があると推定される。本マニュアルでのウイルス分離法は、実際にウイルスが分離されている方法としての参考例である。本マニュアルを参考として、細胞の種類や培養条件等を適宜改良することでウイルス分離率が向上することが期待できる。なお、分離されたウイルスは、抗血清を用いた型別の決定も可能ではあるが、RT-PCR およびシーケンス解析による型別の決定が現在は一般的である。

5-1 維持培地の調整

維持培地の調整は、500mL のイーグル MEM (日水製薬, Cat.No.63-5753-58) 等にペニシリン-ストレプトマイシン溶液 (Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL), Cat.15140122 など) を 5mL、ウシ胎児血清 (FBS) を 10mL 添加する。

5-2 96 ウェルマイクロプレート法

この方法は多数例の検体を迅速かつ省力的に取り扱う場合、極めて有効な方法であるが、検体相互間のクロスコンタミネーションの発生には注意が必要である。

- (1) あらかじめ単層培養 (96 穴プラスチックプレート) させた LLC-MK2 など感受性のある細胞を PBS(-) で 2 回洗浄し、維持培地 100 μ L を各穴に入れる。
- (2) 被検検体 75 μ L を 2-4 穴接種し、36-37 $^{\circ}$ C の CO₂ インキュベーターで培養する。
* 検体を接種後に、マイクロプレートを 2,000rpm、20 分遠心する方法も知られている。
- (3) 細胞コントロールと比較観察して細胞変性効果 (CPE) 出現の有無を確認する。

5-3 48 ウェルプレート法

- (1) 48 ウェルプレートに単層培養した細胞の増殖培地を捨てる。
- (2) 1 ウェルあたり 300 μ L の維持培地を分注し、細胞洗浄を二回行う。
- (3) 接種用検体の前処理を行った検体を 1 ウェルあたり 100 μ L を接種し、36-37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ で 1 時間インキュベートする。
- (4) 1 ウェルあたり 400 μ L の維持培地を分注する。この際、検体が隣のウェルに入ることが無いように注意する。
- (5) 36 $^{\circ}$ C、5%CO₂ で 1 週間以上観察し、CPE の有無を確認する。CPE の出現が無い場合は、感染培養液を回収し、新しく作成した培養細胞に上記と同様の手順で接種する。パレコウイルスは、CPE の出現まで 3 代継代以上必要であることもある。

*パレコウイルスはウイルス分離が困難であることも多いことから、パレコウイルス遺伝

子の陽性を確認してから検体を LLC-MK2 細胞などに接種・継代して CPE の観察を行うことも有効である。

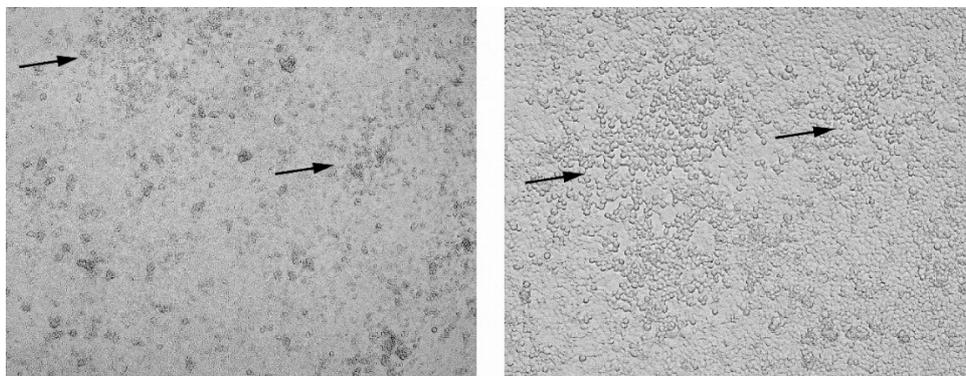


図3. LLC-MK2-N細胞によるパレコウイルスA3型の細胞変性効果（40倍及び100倍）

6 遺伝学的検査法

遺伝学的検査法には、RT-PCR およびシーケンス解析による方法やリアルタイム RT-PCR 法などが使用されている²⁵⁻²⁹。以下に、パレコウイルスの型別・同定用の RT-PCR およびシーケンス法（6-1）、パレコウイルスの検出用の RT-PCR 法（6-2）、およびパレコウイルスの検出用のリアルタイム RT-PCR 法（6-3）を示す。6-1 は、パレコウイルスの型別・同定に有用な *VP3/VP1 junction* 領域を標的とした RT-PCR 法である³⁰。ただし、検出感度がウイルス株によって異なるため、一般のパレコウイルス株を検出するという目的においては 6-2 および 6-3 の方法が有用な場合がある。ただし、6-2 および 6-3 の方法では、パレコウイルスの型別の決定はできないことに留意する必要がある。

なお、RT-PCR に使用する試薬は、多数販売されているので各施設で感度等を検討の上、試薬を選定しても問題ない。また本マニュアルで示した以外にも多くの方法が報告されているので、参考にされたい³¹⁻³³。

6-1 RT-PCR およびシーケンス解析によるパレコウイルスの同定法（*VP3/VP1* 遺伝子領域）

6-1-1 材料及び試薬

(1) 共通

マイクロピペット (10, 20, 200, 1000 μ L)、滅菌微量遠心チューブ (0.2, 0.5, 1.5mL)、マイクロ遠心機、RNase-free 滅菌蒸留水 (例：ニッポンジーン, Cat. No. 312-90103)

(2) RNA 抽出

QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Cat. No.52904)、エタノール (96-100%)

(3) RT 反応

PrimeScript[®] RT reagent Kit (Perfect Real Time) (タカラバイオ, RR037A)

(4) PCR 反応

EmeraldAmp[®]PCR Master Mix (タカラバイオ, RR300A)、プライマー、サーマルサイクラー

(5) 電気泳動

電気泳動装置、UV 照射ゲル写真撮影装置、電気泳動用アガロース、分子量マーカー、ローディングバッファー、1×TAE バッファー、DNA 検出用蛍光試薬 (例：エチジウムブロマイドなど)

(6) PCR 産物の精製

QIAquick PCR purification kit (QIAGEN, Cat. No. 28104)、エタノール (96-100%)

(7) シークエンス

BigDye Terminator ver. 3.1 Cycle sequencing kit (AppliedBiosystems, Cat. No. 4337457)、Auto Seq G-50 (Cytiva, Cat. No. 27-5340-01)

(8) 遺伝子増幅用プライマー

1st PCR 2090 : 5'-GAYAATGCYATMTAYACWATYTGGA-3'

2523 : 5'-ACWGTRAARATRTCHACATTSATDG-3'

2nd PCR 2159 : 5'-TTYTCMACHTGGATGMGGAARAC-3'

2458 : 5'-DGGYCCATCATCYTGWGCTGA-3'

1st PCR 産物 : 約 430bp, 2nd PCR 産物 : 約 300bp

6-1-2 ウイルス RNA の抽出

ウイルス RNA の抽出は、それぞれの施設で一般に用いている方法で良いが、ここでは QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Cat. No.52904)を用いる方法を示す。

QIAamp Viral RNA Mini kit による RNA の抽出

使用前に以下の試薬調整を行う。

- ・培養上清あるいは臨床検体を室温 (15-25°C)に戻す。
- ・ Buffer AW1 にエタノール (96-100%)を 25mL 加える。
- ・ Buffer AW2 にエタノール (96-100%)を 30mL 加える。
- ・ Buffer AVL/Carrier RNA をサンプル数にあわせて調整する。

以下の操作は全て室温 (15-25°C)で行う。

- (1) 1.5mL チューブに Buffer AVL/Carrier RNA 560μL を入れる。
- (2) 検体 140μL と Buffer を充分混合するため 15 秒間ボルテックスミキサーにて振盪混和後、室温に 10 分間静置する。チューブをスピンドウンする。
- (3) エタノール (96-100%)560μL をチューブに加え、ボルテックスミキサーにて振盪混和後、チューブをスピンドウンする。液が混濁した時には再度 9,000 × g (10,000rpm)で 5 分間遠心する。
- (4) (3)の液 630μL を QIAamp スピンカラム (キットに添付)に注入し、蓋を閉め、6,000 × g (8,000 rpm)で 1 分間遠心する。QIAamp スピンカラムを新しい 2mL のチューブに移

し、残りの (3) の液 630 μ L を入れ、同様に遠心し、全ての液が無くなるまで行う。

- (5) QIAamp スピнкаラムを開け、Buffer AW1 を 500 μ L 入れる。
- (6) 蓋を閉め、6,000 \times g (8,000 rpm) で 1 分間遠心する。QIAamp スピнкаラムを新しい 2mL のチューブに移し、ろ液の入っているチューブは捨てる。
- (7) QIAamp スピнкаラムに Buffer AW2 を 500 μ L 加え、20,000 \times g (14,000 rpm) で 3 分間遠心する。
- (8) QIAamp スピнкаラムを新しい蓋つき 1.5mL チューブに移し、ろ液の入っているチューブは捨てる。QIAamp スピнкаラムの蓋を開け、室温に戻した Buffer AVE 60 μ L を加え、蓋を閉めて 1 分間置いた後、6,000 \times g (8,000 rpm) で 1 分間遠心する。
- (9) このろ液が抽出 RNA であり、抽出 RNA は -80 $^{\circ}$ C での保存が望ましい。

6-1-3 RT反応

RT 反応は各実験室で行われている方法で差し支えない。ここでは、反応に必要な試薬がキットの中に全て含まれる PrimeScript[®] RT reagent Kit (Perfect Real Time) (タカラバイオ, RR037A) を用いた方法を述べる。合成後の cDNA は、他のウイルスの PCR 反応にも用いることができる。

- (1) 下表の RT 反応調整液を作成する。

試薬	20 μ L系
RNA	10 μ L
5 \times PrimeScript Buffer	4 μ L
PrimeScript RT Enzyme Mix I	1 μ L
Random 6mers (100 μ M)	4 μ L
RNase Free dH ₂ O	1 μ L

- (2) 次の条件で反応させる。

温度	時間
37 $^{\circ}$ C	15分
85 $^{\circ}$ C	5秒
4 $^{\circ}$ C	∞

- (3) 得られた cDNA を PCR 反応させる。

6-1-4 PCR反応

パレコウイルスの PCR では解析方法は標準化されていないが、ここでは Harvala らが報告した VP3/VP1 遺伝子に対して行う方法を示す²⁹。

1st PCR

- (1) 下表の反応調整液を作成する。

試薬	50 μ L系
----	-------------

cDNA	5 μ L
2090 (50 μ M)	0.5 μ L
2523 (50 μ M)	0.5 μ L
Distilled water	19 μ L
EmeraldAmp PCR Master Mix	25 μ L

(2) 次の条件で反応させる。

温度	時間	×40サイクル
98°C	10秒	
50°C	30秒	
72°C	30秒	
72°C	5分	

(3) PCR産物を2nd PCRにかける。

2nd PCR

(1) 下表の反応調整液を作成する。

試薬	50 μ L系
1st PCR産物	5 μ L
2159 (50 μ M)	0.5 μ L
2458 (50 μ M)	0.5 μ L
Distilled water	19 μ L
EmeraldAmp PCR Master Mix	25 μ L

(2) 次の条件で反応させる。

温度	時間	×40サイクル
98°C	10秒	
50°C	30秒	
72°C	30秒	
72°C	5分	

(3) PCR産物を電気泳動する。

6-1-5 PCR産物のアガロースゲル電気泳動による確認

(1) 1.5%アガロースゲルを作成する。

(2) アガロースゲルのウェルに2nd PCR産物を5 μ L、分子量マーカーとローディングバッファーを混ぜたものを5 μ L入れ、1×TAEバッファーで電気泳動する。なお、EmeraldAmp PCR Master Mixは、そのまま電気泳動が可能である。

(3) DNA検出用蛍光試薬で染色後、蛍光検出しUV照射ゲル写真撮影装置で撮影する。

(4) パレコウイルス遺伝子が存在した場合、2nd PCR産物として304bpのバンドが認めら

れる。

6-1-6 PCR産物の精製とシーケンス

- (1) PCR産物をQIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Cat. 28104)等により精製する。
- (2) 精製PCR産物を鋳型としたサイクルシーケンス反応を行う。

反応液	
試薬	20 μ L系
Primer (3.2pmol/ μ L) [※]	2 μ L
5 \times Sequencing Buffer	4 μ L
Distilled water	8 μ L
BigDye TM Terminator v3.1 Ready Reaction Mix	4 μ L
Template DNA (3-10ng)	2 μ L

※PrimerはFあるいはRのみを用いて反応させる。

反応条件	
温度	時間
96 $^{\circ}$ C	10秒
50 $^{\circ}$ C	5秒
60 $^{\circ}$ C	4分

×25サイクル

- (4) 反応後、Auto Seq G-50などを用いて未反応ダイターミネーターを除去する。この試料をDNAシーケンサーにより解析し、ウイルス遺伝子の塩基配列を決定する。

※得られた塩基配列の同定法に関しては、手足口病の病原体検出マニュアルを参考にされたい。

6-2 RT-PCRによるパレコウイルスの検出法 (5'末端領域)

H Harvalaらの方法に基づく5'末端領域を標的とするRT-PCR法で³⁰、高感度であるために一般のパレコウイルス株の検出に有用である。ただし、本方法では、パレコウイルスの型別・同定はできないことに留意する必要がある。また、オリゴdTプライマーでcDNA合成することにより、完全長に近いウイルスRNAが確認できるため、ウイルス収率の評価にも応用できる。ウイルスRNAの抽出など、6-1の方法と共通する操作については、6-1の各項目を参照されたい。

市販のキットを用いた場合の測定条件を、一例として以下に示す。使用するPCRキットが以下と異なる場合には、アニーリング温度の検討を推奨する。

RT反応： TOYOBO RevarTra Ace[®]を使用した場合の条件を、以下に示す。

反応系(20 μ L reaction)

抽出したRNA 10 μ L

5x buffer	4 μ L
10mM dNTPs	2 μ L
25 μ M Random primer	1 μ L (pdN6 or pdN7)
RevarTra Ace(100U/ μ L)	0.5 μ L (50U/reaction)
RNase inhibitor	0.5 μ L

反応プログラム

30°C	10 min
42°C	60 min
99°C	5 min

PCR反応： KAPA BIOSYSTEMS KAPA2G Fast ReadyMixを使用した場合の条件を、以下に示す。

Forward primer： 5'-GGGTGGCAGATGGCGTGCCATAA

Reverse primer： 5'-CCTRCGGGTACCTTCTGGGCATCC

反応系(20 μ L reaction)

2x ReadyMix	10 μ L
F-primer(10 μ M)	1 μ L
R-primer(10 μ M)	1 μ L
cDNA template	2 μ L
H2O	6 μ L

反応プログラム

95°C	5 min	
95°C	15 sec	
57°C	20 sec	X 50 cycles
72°C	5 sec	↓
	↓	
72°C	1 min	

※High-speed PCR kitであるため、extension timeが短い

2%以上のアガロースにて電気泳動を行い、約330bpのproductを確認する。

6-3 リアルタイム RT-PCR 法によるパレコウイルスの検出法

リアルタイム法はいくつかの方法が報告されているが²⁵⁻²⁹、本マニュアルにおいては、

5'UTR 領域をターゲットにした Nix 検出系²⁶について示す。本方法では、パレコウイルスの型別・同定はできないことに留意する必要がある。

3型を特異的に検出する系²⁹も報告されていることから、参考にされたい。

One-Step Probe RT-PCR

前述の RNA 抽出

陽性コントロール RNA (各研究室で標準株より精製したもの)

リアルタイム RT-PCR 用プライマーおよびプローブについて (文献 26)

Forward Primer (AN345) GTAACASWWGCCTCTGGGSCCAAAAG

Reverse Primer (AN344) GGCCCCWGRTCAGATCCAYAGT

Probe (AN257) FAM-CCTRYGGGTACCTYCWGGGCATCCTTC-BHQ

(1) 下表の反応調整液を作成する。

試薬	25 μ L系
RNA	2.5 μ L
2xQuantiTect Probe RT-PCR Master Mix*	12.5 μ L
QuantiTect RT Mix*	0.25 μ L
AN345 (10 μ M)	0.5 μ L
AN344 (10 μ M)	0.5 μ L
AN257 (10 μ M)	0.25 μ L
Distilled water	8.5 μ L

* QuantiTect Probe RT-PCR (200) (QIAGEN, Cat. No.204443)

(2) 次の条件で反応させる。

温度	時間	
50°C	30秒	×45サイクル
95°C	10分	
95°C	15秒	
58°C	30秒	
72°C	10秒	

使用装置 ABI7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher scientific)

<調製手順> 操作は全て氷上にて行う。

(1) Template RNA 以外の試薬を必要な数量分調製し、プレートもしくは 8 連チューブのウェルに 22.5 μ l ずつ反応液を分注する。

(2) 陰性コントロールとしては、Nuclease-free Water 2.5 μ l をウェルに添加したものを取る。

(3) RNA サンプルを 2.5 μ l ずつウェルに添加する。

(4) 各濃度の陽性コントロール RNA (段階希釈したものを用いる場合は低濃度から) を 2.5 μ l ずつウェルに添加する。

(5) キャップまたはプレートシールで封をした後、反応液をスピンドウンする。

陽性コントロール RNA

陽性コントロールは、 1×10^2 コピー/反応相当の RNA を必ず毎回の反応に使用する。 $(1 \times 10^2$ コピー/反応相当が Ct 値 35 サイクルで検出されることを目安に定性試験とする。) 10 倍階段希釈した陽性コントロールを用いる事は、これにより検査毎に精度管理を行う事ができるため、推奨される。

7 検出感度

別紙参考情報を参照。

引用文献

1. Romero JR, Vijayan V. Parechoviruses. In: Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ, editors. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*, 9th ed. Philadelphia: Elsevier; 2020. p 2238-2242.
2. 相澤悠太, 齋藤昭彦. パレコウイルス. ウイルス. 2015;65 :17-26.
3. Ito M, Yamashita T, Tsuzuki H, Takeda N, Sakae K. Isolation and identification of a novel human parechovirus. *J Gen Virol*. 2004;85:391-8. doi: 10.1099/vir.0.19456-0.
4. Watanabe K, Oie M, Higuchi M, Nishikawa M, Fujii M. Isolation and characterization of novel human parechovirus from clinical samples. *Emerg Infect Dis*. 2007;13:889-95.
5. Mizuta K, Komabayashi K, Aoki Y, Itagaki T, Ikeda T. Seroprevalence of parechovirus A1, A3, and A4 antibodies in Yamagata, Japan, between 1976 and 2017. *J Med Microbiol*. 2020;69:1381-7.
6. Racaniello VR. Picornaviridae: The viruses and their replication. In: Knipe EM, Howley PM, editors. *Fields Virology*, 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2013. P453-489.
7. Mizuta K, Aoki Y, Komabayashi K, Ikeda T. Proposal for the recognition of a new disease concept from Japan; Parechovirus A3-associated myalgia. *Jpn J Infect Dis*. 2021;74:259-72.
8. Tanaka S, Aoki Y, Matoba Y, Yahagi K, Itagaki T, Matsuzaki Y, et al. Seroepidemiology of human parechovirus types 1, 3, and 6 in Yamagata, Japan, in 2014. *Microbiol Immunol*. 2016;60:854-8.
9. Aizawa Y, Izumita R, Saitoh A. Human parechovirus type 3 infection: An emerging infection in neonates and young infants. *J Infect Chemother*. 2017;23:419-26.
10. Olijve L, Jennings L, Walls T. Human parechovirus: an increasingly recognized cause of sepsis-like illness in young infants. *Clin Microbiol Rev*. 2018;31:e00047-17.
11. Mizuta K, Kuroda M, Kurimura M, Yahata Y, Sekizuka T, Aoki Y, et al. Epidemic myalgia in adults associated with human parechovirus type 3 infection, Yamagata, Japan, 2008. *Emerg Infect Dis* 2012;18:1787-93.
12. Mizuta K, Yamakawa T, Nagasawa H, Itagaki T, Katsushima F, Katsushima Y, et al. Epidemic myalgia associated with human parechovirus type 3 infection among adults occurs during an outbreak among children: findings from Yamagata, Japan, in 2011. *J Clin Virol*. 2013;58:188-93.
13. Mizuta K, Yamakawa T, Kurokawa K, Chikaoka S, Shimizu Y, Itagaki T, et al. Epidemic myalgia and myositis associated with human parechovirus type 3 infections occur not only in adults but also in children: findings in Yamagata, Japan, 2014. *Epidemiol Infect*. 2016;144:1286-90.
14. 山川達志、水田克巳、黒川克朗、永沢光、山田尚弘、鈴木恵美子、和田学. ヒトパレコウイルス 3 型感染に伴う成人の流行性筋痛症 17 例の検討. *臨床神経学*. 2017;57:485-491.

- https://www.jstage.jst.go.jp/article/clinicalneuro/57/9/57_cn-001035/_article/-char/ja/
15. Mizuta K, Aoki Y, Komabayashi K, Tanaka S, Yamakawa T, Shimizu Y, et al. Parechovirus A3 (PeVA3)-associated myalgia/myositis occurs irrespective of its genetic cluster: a longitudinal molecular epidemiology of PeVA3 in Yamagata, Japan between 2003 and 2016. *J Med Microbiol.* 2019;68:424-8.
 16. Tanaka S, Sendo D, Ichikawa M, Toyota K, Furuyama M, Komabayashi K, et al. Careful clinical surveillance is important for the identification of parechovirus type A3-associated myalgia/myositis: a sporadic case found in a season with a low level of its activity in Yamagata, Japan in 2017. *Jpn J Infect Dis.* 2019;72:71-2.
 17. Mizuta K, Itagaki T, Chikaoka S, Wada M, Ikegami T, Sendo D, et al. Recombinant parechovirus A3 possibly causes various clinical manifestations, including myalgia; findings in Yamagata, Japan in 2019. *Infect Dis (Lond).* 2022;54:632-50.
 18. Mizuta K, Tanaka W, Komabayashi K, Tanaka S, Seto J, Aoki Y, et al. Longitudinal epidemiology of viral infectious diseases combining virus isolation, antigenic analysis, and phylogenetic analysis as well as seroepidemiology in Yamagata, Japan, between 1999 and 2018. *Jpn J Infect Dis.* 2019;72:211-23.
 19. 便からの検出が優れている de Crom SC, Obihara CC, de Moor RA, Veldkamp EJ, van Furth AM, Rossen JW. Prospective comparison of the detection rates of human enterovirus and parechovirus RT-qPCR and viral culture in different pediatric specimens. *J Clin Virol.* 2013 Oct;58(2):449-54.
 20. 新潟大学 髄液検体だけでは不明なことがある Suzuki Y, Aizawa Y, Izumita R, Habuka R, Watanabe K, Saitoh A. PCR detection rates for serum and cerebrospinal fluid from neonates and young infants infected with human parechovirus 3 and enteroviruses. *J Clin Virol.* 2021 Feb;135:104736.
 21. 複数の部位から検出（髄液が多いというわけではない） Tomatis Souverbielle C, Wang H, Feister J, Campbell J, Medoro A, Mejias A, Ramilo O, Pietropaolo D, Salamon D, Leber A, Erdem G. Year-Round, Routine Testing of Multiple Body Site Specimens for Human Parechovirus in Young Febrile Infants. *J Pediatr.* 2021 Feb;229:216-222.e2.
 22. Baumgarte S, de Souza Luna LK, Grywna K, Panning M, Drexler JF, Karsten C, Huppertz HI, Drosten C. Prevalence, types, and RNA concentrations of human parechoviruses, including a sixth parechovirus type, in stool samples from patients with acute enteritis. *J Clin Microbiol.* 2008;46:242-8.
 23. Tanaka S, Matoba Y, Unno M, Ikeda T, Itagaki T, Mizuta K. First isolation of human parechovirus type 4 in Yamagata, Japan. *Jpn J Infect Dis.* 2017;70:689-90.
 24. Takagi H, Oka T, Ami Y, Suzaki Y, Saito H. A Human Intestinal Cell Line Suitable for the Propagation of Human Parechovirus Type 1 to 6 with a Clear Cytopathic Effect. *Jpn J Infect*

- Dis. 2022;75:318-321.
25. Benschop KS, Schinkel J, Minnaar RP, et al. Human parechovirus infections in Dutch children and the association between serotype and disease severity. *Clin Infect Dis*. 2006;42(2):204-210.
 26. Nix WA, Maher K, Johansson ES, Niklasson B, Lindberg AM, Pallansch MA, Oberste MS. Detection of all known parechoviruses by real-time PCR. *J Clin Microbiol*. 2008;46:2519-24.
 27. Lu H, Xiao J, Zhang K, Han Z, Song Y, Wang D, Ji T, Yan D, Zhu S, Xu W, Zhang Y. Development of a real-time RT-PCR assay for the detection of pan-human parechoviruses. *Virology*. 2021;18:227.
 28. Liu B, Forman M, Valsamakis A. Optimization and evaluation of a novel real-time RT-PCR test for detection of parechovirus in cerebrospinal fluid. *J Virol Methods*. 2019;272:113690.
 29. Selvaraju SB, Nix WA, Oberste MS, Selvarangan R. Optimization of a combined human parechovirus-enterovirus real-time reverse transcription-PCR assay and evaluation of a new parechovirus 3-specific assay for cerebrospinal fluid specimen testing. *J Clin Microbiol*. 2013;51(2):452-458.
 30. Harvala H, Robertson I, Leitch ECM, Benschop K, Wolthers KC, Templeton K, Simmonds P. Epidemiology and clinical associations of human parechovirus respiratory infections. *J Clin Microbiol*. 2008;46:3446-53.
 31. Nix WA, Maher K, Pallansch MA, Oberste MS. Parechovirus typing in clinical specimens by nested or semi-nested PCR coupled with sequencing. *J Clin Virol*. 2010;48:202-7.
 32. Ito M, Yamashita T, Tsuzuki H, et al. Detection of human parechoviruses from clinical stool samples in Aichi, Japan. *J Clin Microbiol*. 2010;48:2683-2688.
 33. Pham NT, Trinh QD, Khamrin P, Maneekarn N, Shimizu H, Okitsu S, Mizuguchi M, Ushijima H. Diversity of human parechoviruses isolated from stool samples collected from Thai children with acute gastroenteritis. *J Clin Microbiol*. 2010;48:115-9.

マニュアルに関する問い合わせ先

国立感染症研究所 ウイルス第二部 有田峰太郎
群馬県衛生環境研究所 塚越博之、猿木信裕

執筆者一覧

北川和寛 (福島県衛生研究所)
佐野貴子 (神奈川県衛生研究所)
皆川洋子 伊藤雅 (愛知県衛生研究所)
中田恵子 (大阪健康安全基盤研究所)
河瀬曜 山下育孝 四宮博人 (愛媛県立衛生環境研究所)
芦塚由紀 小林孝行 濱崎光宏 (福岡県保健環境研究所)

池田辰也、水田克巳（山形県衛生研究所）
小室慶子、新堀もなみ（茨城県衛生研究所）
塚越博之、猿木信裕（群馬県衛生環境研究所）
蕪木康郎（さいたま市健康科学研究センター）
長島真美（東京都健康安全研究センター）
岡本玲子、調恒明（山口県環境保健センター）
高木弘隆（国立感染症研究所安全実験管理部）
有田峰太郎（国立感染症研究所ウイルス第二部）
※その他必要がありましたら追記願います。

謝辞

本マニュアルは感染症実用化研究事業 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業「多分野連携による新興・再興エンテロウイルス感染症に対する検査・診断・治療・予防法開発に向けた研究（JP23fk0108627）」、および厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業「わが国の病原体検査の標準化と基盤強化、ならびに、公衆衛生上重要な感染症の国内検査体制維持強化に資する研究」（22HA2001）の補助金を受けて作成された。

パレコウイルス検査マニュアル別紙

RT-PCRおよびシーケンス解析によるパレコウイルスの同定法の検出感度の確認（標準株から抽出したRNAを用いた検討）

検討1 cDNAを用いた感度の確認

試験品の調整方法

各々の型の標準株からRNAを抽出し、リアルタイムPCR法により定量し、以下のコピー数に調製したものをPrimescript RT Reagent kitで逆転写した。この逆転写サンプルを、3か所の地衛研で確認した。

陽性となった施設数（すべての施設で検出できた場合は黄色マーク）

	PCR試薬	血清型												copies/reaction
		1		2		3		4		5		6		
		100	10	100	10	100	10	100	10	100	10	100	10	
PrimerMix②	Emerald Amp	3	1	3	2	3	3	1		3	3	3	2	
2159 / 2458	KOD One	3	2	3	3	3	3	3	1	3	2	3	2	
(1st PCR)	SapphireAmp	3	2	3	3	3	3	3	2	3	3	3	2	

※1st PCRでは100コピー以下は検出できず

検討2 臨床検体を用いた検出感度の確認

5か所の地衛研で臨床検体を用いた確認を行った。

パレコウイルス陽性となった臨床検体を用いて、1stおよび2nd PCRでの検出感度の確認を行った。

臨床検体での検討

	PCR試薬	陽性となった検体数				検出率			
		血清型				血清型			
		1	3	4	6	1	3	4	6
PrimerMix①	Emerald Amp	8	5	1	6	57	50	50	60
2090 / 252	KOD One	4	3		2	29	30		20
(1st PCR)	SapphireAmp	2	1		1	14	10		10
PrimerMix②	Emerald Amp	14	10	2	10	100	100	100	100
2159 / 2458	KOD One	14	10	2	10	100	100	100	100
(2nd PCR)	SapphireAmp	14	10	2	10	100	100	100	100
	検体数	14	10	2	10	陽性率100%の場合を黄色マーク			

<感度確認結果のまとめ>

精製RNAの検出限界は、血清型によって異なる傾向が示唆されたが、おおむね10~100コピー程度と推定された。
臨床検体での結果からは、いずれの試薬を用いた場合でも、すべての検体で2nd PCRで陽性となった。