

令和2年3月24日

高島市民病院

人権推進・倫理委員会 委員各位

会議同席者 各位

申請者

所属 高島市民病院

職名 副院長

氏名 土居健太郎

医療行為の概要

新型コロナウイルス感染症(COVID-19)に対する薬物療法はまだ確立されていませんが、同じコロナウィルスのSARS(重症急性呼吸器症候群)やMERS(中東呼吸器症候群)などの臨床試験および国内のin vitroの研究成果や海外での使用経験から、有望視されている医薬品の候補があります。

当院は第二種感染症指定医療機関であり、COVID-19患者を受け入れる役割を担っています。呼吸器専門医、感染症専門医が常勤していないため、重症症例は、第一種感染症指定医療機関である市立大津市民病院等への転送を想定していますが、入院したCOVID-19軽症例が一夜にして重症化する症例報告も見受けられます。当院で受け入れた軽症例がそのように重症化した際、迅速に特定機能病院等に受け入れてもらえるかは現在予断を許さない状況にあると考えられます。特に、感染が滋賀県内に拡がり、突然爆発的に患者が急増(オーバーシュート)した場合、第一種感染症指定医療機関である市立大津市民病院(病床数2)への転送は不可能になると想定されます。また、集中治療室やECMOを持ち合わせない当院においては重症に陥らないためには、軽症から中等症で集学的な薬物療法が可能であるか否かが、患者救命において分水嶺になると思われます。

このため、すでに国内で承認されている医薬品の中から、COVID-19に治療効果が期待される以下の薬剤について、対象となる患者が発生した場合、当該患者および家族の同意を得た上で遅滞なく投与できるようにあらかじめ適応外使用の手続きを取りたいと考えています。そこでこれら抗ウイルス効果が示された薬剤のCOVID-19に対する適応外使用/Compassionate useに関して倫理的妥当性を審議いただきたい。

- 1) オルベスコ吸入薬(シクレソニド)
- 2) アビガン(ファビピラビル)
- 3) カレトラ配合錠(ロピナビル・リトナビル)

- 4) プラケニル (ヒドロキシクロロキン)
- 5) フサン注射薬 (ナファモスタット)
- 6) フォイパン (カモスタット)

参考資料

資料 A: ファビピラビル等の抗ウイルス薬が投与された COVID-19 患者の背景因子と治療効果の検討 (観察研究) → P.10 AMED 研究課題 SARS-CoV2 感染無症状・軽症患者におけるウイルス量低減効果の検討を目的としたファビピラビルの多施設非盲検ランダム化臨床試験において富士フィルム富山化学株式会社から薬剤の無償提供を受けている。

資料 B: 研究に関するホームページ上の情報公開文書 → このリストに当院が掲載される

資料 C: 藤田医科大学の医学研究倫理審査結果通知書

資料 D: 他の研究機関への既存資料・情報の提供に関する届出書 → 当院から藤田医科大学への情報提供

資料 E: 研究用医薬品購入希望書 → シクレソニド購入書類

資料 F: COVID-19 に対する抗ウイルス薬による治療の考え方 第 1 版 → ロピナビル・リトナビル、ファビピラビルの具体的な投与方法

資料 G: 医療機関における新型コロナウイルス感染症への対応ガイド 第 2 版改訂版 (ver.2.1) → 入院中の治療費用は公費負担となる (p.9)

資料 H: COVID-19 に対するシクレソニド (オルベスコ) 投与観察研究ご参加のお願い

資料 I: シクレソニド使用上の注意 → シクレソニドの抗ウイルス効果はプロドラッグの段階で確認

資料 J: ヒドロキシクロロキンを使用し症状が改善した COVID-19 の 2 例 → プラケニルの具体的な使用例

資料 K: COVID-19 infection: origin, transmission, and characteristics of human

Coronaviruses. Journal of Advanced Research (Impact factor 5.045) → P.11 ナファモスタットが臨床で使われた記述

資料 L: SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. Cell (Impact factor 36.216) → カモスタットが効果のある可能性を示した基礎論文

資料 M: 「SARS-CoV2 感染無症状・軽症患者におけるウイルス量低減効果の検討を目的としたファビピラビルの多施設非盲検ランダム化臨床試験およびファビピラビルを投与された中等症・重症患者における臨床経過の検討を目的とした多施設観察研究」(藤田医科大学病院 湯澤病院長) 統括事務局 (covid-19@fujita-hu.ac.jp) からのメール

研究計画書

フケピラピル等の抗ウイルス薬が投与された COVID-19 患者の背景因子と治療効果
の検討 (観察研究)

研究代表者:

土井洋平 (藤田医科大学 微生物学講座・感染症科 教授)

〒470-1192 愛知県豊明市沓掛町田楽ヶ窪1番地98

TEL: 0562-93-9241、FAX: 0562-93-3576

研究事務局:

(藤田医科大学 研究支援推進本部)

〒470-1192 愛知県豊明市沓掛町田楽ヶ窪1番地98

TEL: 0562-93-9241、FAX: 0562-93-3576

令和2年3月8日作成 第0.1版

令和2年3月10日作成 第1.0版

0. 概要

試験名

ファビピラビル等の抗ウイルス薬が投与された COVID-19 患者の背景因子と治療効果の検討 (後ろ向き観察研究)

試験予定期間

倫理審査承認日から 2020 年 12 月 31 日

目的

COVID-19 に対してファビピラビル等の抗ウイルス薬治療がなされた患者の背景因子と治療効果を多施設で迅速に収集することにより、それらの薬剤の効果を推定し、今後の臨床研究に役立てる。

研究実施体制

(1) 研究形態

藤田医科大学のみで行われる研究

ただし、情報は、多施設から収集する (既存情報の提供のみ)。

(2) 藤田医科大学内の研究組織

研究責任者

医学部 微生物学講座・感染症科

教授 土井 洋平

研究協力者

研究支援推進本部 治験・臨床研究支援センター

センター長 近藤 征史

研究事務局

研究支援推進本部

医学部医学科 再生医療学講座

講座教授 松山 晃文

TEL: 0562-93-9241、FAX: 0562-93-3576

(3) 関連機関

既存情報の提供を行う各施設

別紙リスト (随時更新予定※)

※本研究においては、既存試料・情報の提供のみを行う者をあらかじめ特定することが困難であって、提供を行う者が極めて多数となることが想定される。そのため施設リストの更新についての変更申請は行わず、研究責任者が研究機関の長に行う定期報告の際にリストを添付して報告することとする。

主要評価項目

薬剤投与後の患者の状態の改善

副次評価項目

患者の背景因子や重症度と薬剤投与後の患者の状態との相関
ウイルス陰性化の有無、生存、退院などの予後情報

試験シエーマ

COVID-19 に対しファビピラビル等の抗ウイルス薬投与を受けた患者
医療機関より臨床情報を提供

↓

研究事務局で集計・解析

対象

COVID-19 患者

目標症例数

200 例、ただし 2020 年 12 月までに投与される患者であり、SARS-CoV-2 の流行の状況により変動が予想される

1. 研究の背景及び目的

1-1. 背景

ファビピラビルは、富山化学工業株式会社（現・富士フイルム富山化学株式会社）が創製した抗ウイルス薬であり、効能・効果を「新型又は再興型インフルエンザウイルス感染症（但し、他の抗インフルエンザウイルス薬が無効又は効果不十分なものに限る）」に限定して、2014年3月に厚生労働省の承認を受けている。その作用機序は、生体内で変換された三リン酸化体（T-705RTP）がウイルスのRNAポリメラーゼを選択的に阻害するものであることから、インフルエンザウイルス以外のRNAウイルスへも有効性が期待されている。実際、*in vitro*又は*in vivo*でフィロウイルス科、アレナウイルス科やブニヤウイルス科のウイルスへ効果を示すことが報告されている（19、文献1,2,3）。SARS-CoV-2ウイルスに対しても増殖阻害効果があることから、COVID-19に対して適応外使用されている。投与対象としては、感染症学会の「COVID-19に対する抗ウイルス薬による治療の考え方 第1版」により、重症度の高い症例への投与が示唆されている。また、催奇性を有する可能性から、妊婦、妊娠の可能性のある患者には禁忌とされている。

しかしながら、COVID-19に対するファビピラビルをはじめとする抗ウイルス薬の実際の治療効果や、それに関連する背景因子などは不明であり、投与症例の詳細な解析が必要である。そのために、レジストリー研究を開始する計画である。一方、実際にどのような症例（患者背景、重症度）で抗ウイルス薬が投与され、その効果が見られるかどうかを迅速に集計、公表することが期待されている。そこで、本研究は、ファビピラビル投与患者を中心に、COVID-19に対し抗ウイルス薬を投与された患者の臨床症状を集計する。

1-2. 研究の目的

ファビピラビルなど抗ウイルス薬が投与されたCOVID-19症例の背景と重症度とその反応性、安全性を迅速に集計して、逐次公表することを目的とする。

1-3. 研究の科学的合理性の根拠

本研究は、COVID-19患者の診療上得られた情報の後方視的な解析であり、本研究自体に、研究目的の介入や侵襲性はない。特に、ファビピラビル投与症例の患者背景とその反応性、安全性を迅速に集計して、逐次公表することにより、医師の適応外使用の判断の一助、またファビピラビルに関連した種々の臨床研究の立案する上での有用な情報になることが期待される。詳細なレジストリー研究は、国立国際医療研究センターを共同で実施する予定である。

2. 研究の種類及びデザイン

2-1. 研究の種類

観察研究

介入の有無：無

対照群の有無：無

侵襲の有無：無

検証するレベル：探索的

未承認・適応外の医薬品・医療機器の使用：有

ファビピラビルなどは適応外薬剤であるが、投与の決定は既に診療上の必要性から各医療施設で判断されているため、本研究には含まれない。投与された患者のカルテ情報を使用するため、介入の有無については、無と判断する。

製薬企業等から資金提供を受けて実施される当該製薬企業等の医薬品等の臨床研究該当：無

研究結果の広告利用の可能性：無

2-2. 研究予定期間

倫理審査承認日より 2020 年 12 月 31 日

2-3. 試験シエーマ

COVID-19 に対しファビピラビル等の抗ウイルス薬投与を受けた患者
医療機関より臨床情報を提供

↓

研究事務局で集計・解析

2-4. 対象

COVID-19 患者

2-5. 評価項目

患者転帰情報

臨床経過、生存/死亡、転院/無増悪生存期間 (PFS) など

安全性情報

2-6. 症例数

研究対象者数

予定登録患者数 約 200 例

設定根拠

COVID-19 の流行状態に依存するものの、レジストリー研究が実施可能となる時期まで、探索的に効果、安全性を検討するには、約 200 例の登録、解析が必要と考え得る。観察研究であることから、適宜中間結果を公表する予定である。

3. 本研究で用いる基準、定義

ウイルス検査

咽頭ぬぐい液または鼻咽頭ぬぐい液からの核酸増幅法による SARS-CoV2 の検出
ファビピラビル投与後の臨床経過

改善、増悪、不変、不明は、熱型、酸素投与量などから担当医の全般的な評価で
判断する。

Performance Status (ECOG)

Scale	内容
0	全く問題なく活動できる。 発病前と同じ日常生活が制限なく行える。
1	肉体的に厳しい活動は制限されるが、歩行可能で、軽作業や座 っての作業は行うことができる。例：軽い家事、事務作業
2	歩行可能で自分の身の回りのことはすべて可能だが作業はで きない。 日中の 50%以上はベッド外で過ごす。
3	限られた自分の身の回りのことしかできない。 日中の 50%以上をベッドか椅子で過ごす。
4	全く動けない、自分の身の回りのことは全くできない。 完全にベッドか椅子で過ごす。

有害事象の判定基準

有害事象の評価は、“National Cancer Institute Common Terminology Criteria
for Adverse Events Ver 5.0 (CTCAE) [日本語訳 JCOG 版]” に準じて行う。

4. 症例・除外選択基準

選択基準

下記の全ての基準を満たす

- 1) 咽頭ぬぐい液または鼻咽頭ぬぐい液を検体として、核酸増幅法で SARS-CoV-2
陽性であることが確認されている症例
- 2) ファビピラビル、シクレソニド、インターフェロン製剤、Remdesivir、クロ
ロキン、カレトラ配合錠などの抗ウイルス薬、または抗ウイルス効果が示さ
れている薬剤が投与された症例
- 3) 各施設が臨床情報を研究事務局に提供が可能な場合

除外基準

- 1) 介入研究としてファビピラビルが投与されている患者
- 2) 本研究に関して研究事務局に情報提供を拒否した患者
- 3) 情報提供施設が患者情報の提供を拒否した場合

5. 登録の手順

研究施設は、COVID-19 に対しファビピラビルを適応外使用している施設に研究の協力を依頼する。提供施設のファビピラビル投与医師は、必要なデータを研究事務局に報告する。

6. 観察項目

6-1. 対象となる治療

抗ウイルス薬を使用した患者を対象とするが、薬剤治療が適応外使用として、施設、担当医師の判断で、医療行為として行われた後に行われる観察研究である。本研究では、投与後の効果や安全に関する情報を診療録より抽出する。

以下の薬の投与は、本試験の治療とは考えないが、参考に記載する。

さらに詳細な情報は、最新の添付文書とインタビューフォームを参照のこと。

使用薬名：アビガン®(ファビピラビル)

製造元：富士フイルム富山化学株式会社

対象疾患：新型インフルエンザ

適応の範囲内 適応の範囲外

用法・容量：ファビピラビルとして 1 日目は 1 回 1600mg を 1 日 2 回、2 日目から 5 日目は 1 回 600mg を 1 日 2 回経口投与する。総投与期間は 5 日間とすること (COVID-19 には、これ以上の用量が投与されることがある)

6-2: 観察項目

情報用紙参照 (添付)

1) 患者基本情報

施設名 患者の性別、生年月、入院日、退院日など

ウイルス検査の結果、既存疾患、入院時の状態

2) 投薬時の状態

患者の状態、治療内容、検査値、薬剤の名称、投与量および投与期間

7. データ収集と記載

FAX、郵送または電子的にデータを収集する。

8. 個人情報等の取扱い

8-1. 匿名化の方法

症例登録には登録症例の氏名、診療録 ID 等は使用しない。患者情報は、研究事務局で発行される施設番号と登録番号を用いて報告される。情報のやりとりはこれらの番号を用いて行われる。氏名等の登録症例の個人情報と登録番号に関しては、各研究

施設で対応表を作成して管理し、対応表は各施設における研究責任者が厳重に施錠管理する。また研究の発表・報告に際しても個人情報は一切公表しない。

8-2. 情報の管理・保管

本研究における患者情報は「8-1. 匿名化の方法」に記載した方法により匿名化される。対応表は各施設において厳重に施錠管理する。匿名化後のデータに関しては、研究結果を公表した後に少なくとも5年間の情報保存後、個人情報の取り扱いに十分注意して破棄される。施設外への対応表の持ち出しを禁止する。学会発表・論文執筆などで解析されたデータが公になることはあるが、個人情報が開示されることはない。

8-3. 既存情報の提供に関する記録

既存情報の提供を受ける研究機関（藤田医科大学）においては、①提供機関のリスト②提供元の機関における取得の経緯③試料・情報の項目の記載された研究計画書を、情報の提供に関する記録として代用し、少なくとも、当該研究の終了について報告された日から5年を経過した日までの期間保管する。

また、既存情報の提供をいただく各機関においては、各機関における提供に関する手続きに従い、機関の長への届出等を保管していただく等により提供の記録を残していただく。各機関で提供に関する記録が適切になされるよう、提供を求める際や受領の際に案内を行う。

9. インフォームド・コンセント等について

研究責任者は、インフォームド・コンセントに代わる手続きとして、藤田医科大学研究支援推進本部ホームページ内に以下の事項を記載する（掲載期間：倫理審査委員会承認日～2020年12月31日）※。

- ① 研究の概要、試料・情報の利用目的及び利用方法（他の機関へ提供される場合はその方法を含む。）
- ② 利用し、又は提供する試料・情報の項目
- ③ 利用する者の範囲
- ④ 試料・情報の管理について責任を有する者の氏名又は名称
- ⑤ 研究対象者又はその代理人の求めに応じて、研究対象者が識別される試料・情報の利用又は他の研究機関への提供を停止すること。
- ⑥ ⑤の研究対象者又はその代理人の求めを受け付ける方法

※COVID-19の疾患としての性質を鑑み、情報提供施設の情報の公開は研究責任者が社会情勢を判断して決定することとする。

10. 研究対象から得られた情報の将来活用

本試験で得られたデータを二次利用することが有益であると判断した場合は、個人情報保護に細心の注意を払い、データの二次利用をすることがあり得る。また、国立国際医療研究センター等研究機関と必要な手続きを経た上でデータを共有する可能性がある。いずれの場合も、関係法令・指針等を遵守し、適切な手続きを経て行う。

1 1. 研究対象者に生じる負担、予測されるリスク

1 1-1. 予測される利益

本研究により、参加者個人に対する直接の利益は生じない。解析結果により、COVID-19の治療の進歩に貢献できる可能性がある。

1 1-2. 研究対象者に生じる負担、予測されるリスク

本研究は観察研究であり、この試験に参加することで生じる侵襲や検査等の負担はない。個人情報保護は匿名化し、細心の注意をもって取り扱うため、漏洩等のリスクは低いと考える。全体として、研究の不利益より利益が上回ると考える。

1 2. 研究対象者等およびその関係者からの相談等への対応

研究対象者等から本研究に関する相談等があった場合は、研究事務局を通して、研究責任者が誠意を持って対応する。

1 3. 研究実施後における医療の提供に関する対応、有害事象発生時の取扱い

本研究は、観察研究であり、該当しない。

1 4. 研究に関する情報の公開

本研究は、観察研究であり、速報を目的するものであり、データベースなどに公開しない。研究の概要や中間解析などは研究事務局より適宜、ホームページ等で公表する。

1 5. 研究機関の長への報告内容および方法

研究責任者は、本研究の進捗状況、終了について、また適正性・信頼性・継続性に影響を与える事実を把握した場合、自施設の手順に従い研究機関の長へ報告する。

1 6. 研究に関する業務委託

なし

1 7. 本研究実施に係る利益相反および資金源

本研究には、AMED 研究課題 (①SARS-CoV2 感染無症状・軽症患者におけるウイルス量低減効果の検討を目的としたファビピラビルの多施設非盲検ランダム化臨床試験、②ファビピラビルの投与された中等症・重症患者における臨床経過の検討を目的とした

多施設観察研究)の資金を使用する。本研究において、企業・団体等から資金提供はない。また研究者個人について、本研究に関して開示すべき利益相反関係はない。

上記AMED研究課題¹⁰において、富士フイルム富山化学株式会社から薬剤の無償提供を受けている。しかし、本研究の実施に関して同社は一切関与しない。研究者は研究の公正さが損なわれないよう十分に留意しつつ研究を遂行する。また、藤田医科大学利益相反委員会へ申請を行い、適切な利益相反マネジメントを受けて研究を実施する。

18. モニタリング・監査

本研究では、モニタリング及び監査は行わない。

19. 文献

1. Gowen BB, Wong MH, Jung KH, Sanders AB, Mendenhall M, Bailey KW, et al. In vitro and in vivo activities of T-705 against arenavirus and bunyavirus infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51:3168-76.
2. Mendenhall M, Russell A, Smee DF, Hall JO, Skirpstunas R, Furuta Y, et al. Effective oral favipiravir (T-705) therapy initiated after the onset of clinical disease in a model of arenavirus hemorrhagic fever. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5:e1342
3. Oestereich L, Lüdtkke A, Wurr S, Rieger T, Rieger T, Muñoz-Fontela C, et al. Successful treatment of advanced Ebola virus infection with T-705 (favipiravir) in a small animal model. *Antiviral Res.* 2014;105:17-21.

2020年〇〇月〇〇日

研究に関するホームページ上の情報公開文書

研究課題名：ファビピラビル等の抗ウイルス薬が投与された COVID-19 患者の背景因子と治療効果の検討（観察研究）

本研究は藤田医科大学の医学研究倫理審査委員会で審査され、学長の許可を得て実施しています。

1. 研究の対象

2020年に当院（、または別紙リストの施設）において、入院前、または入院後の検査検体から SARS-CoV-2 が検出された方

2. 研究目的・方法・研究期間

(1) 研究目的

新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)による肺炎(COVID-19)が日本各地で発生していることが報告されています。COVID-19に対する治療薬は確立されておらず、ファビピラビルなど他のウイルスに対して治療効果がある抗ウイルス薬、その他の抗ウイルス効果が示された薬剤が各医療施設の判断で治療に用いられています。

本研究では、日本各地の医療機関でファビピラビルなどの抗ウイルス薬やその他の抗ウイルス効果が示された薬剤が投与された COVID-19 患者の臨床情報を収集、分析することで各薬剤に COVID-19 に対する治療効果が見られるかどうかを検討することを目的としています。

(2) 研究方法

この研究は、既存の臨床情報（診療で得られた情報）を用いる後ろ向き観察（コホート）研究です。本研究にご協力いただける機関からいただいた対象者の方の臨床情報を藤田医科大学で集約し、解析を行います。

個人情報保護の観点から、対象者は研究専用の ID 番号で登録され、誰の情報か分からない状態で研究代表機関に集約されます。藤田医科大学においては、名前、病院での ID 番号など個人が特定可能な情報は記録しません。

(3) 研究期間

倫理審査委員会承認日 ~ 2020年12月31日

3. 研究に用いる情報の種類

年齢、性別、入院日、入院前の所在（自宅、療養施設など）、基礎疾患、SARS-CoV-2 検出日、SARS-CoV-2 検出日の所在（ICU、病棟など）、COVID-19（肺炎）の重症度、抗ウイルス薬による治療の内容、治療への臨床的反応、退院先（自宅、療養施設など）等

4. 外部への情報の提供

この研究から明らかになった COVID-19 に対する抗ウイルス薬の治療効果などについては、厚生労働省に報告するほか、学会発表および論文発表を通して公開する予定です。また、このような国内のデータはこれまで限られていることから、当院及び他の医療施設が今後 COVID-19 患者を治療するにあたり役立つことが期待されます。他の機関が共同研究機関として加わる場合や、本研究に関するデータを他の研究機関と共有する場合は、関係法令・指針に基づき適切な手続きを経た上でを行い、その旨を公開します。

5. 研究組織

研究責任者：

藤田医科大学 微生物学講座・感染症科
教授 土井 洋平

既存試料・情報の提供のみを行う機関：

別紙リスト参照

6. お問い合わせ先

情報が本研究に用いられることについて研究の対象となる方もしくはその代諾者の方にご了承いただけない場合には、研究対象から除外させていただきます。下記の連絡先までお申し出ください。その場合でも、お申し出により、研究の対象となる方その他に不利益が生じることはありません。ただし、研究実施上、既に個人が特定できない状態で解析の対象となった場合など、除外できない場合があります。

本研究に関するご質問等がありましたら下記の連絡先までお問い合わせ下さい。また、ご希望があれば、他の研究対象者の個人情報及び知的財産の保護に支障がない範囲内で、研究計画書及び関連資料を閲覧することが出来ますのでお申出下さい。

連絡先：

藤田医科大学 微生物学講座
愛知県豊明市沓掛町田楽ヶ窪 1-98
研究責任者 土井 洋平
(電話 0562-93-2433)

※別紙リスト

ー以下、印刷時は削除ー

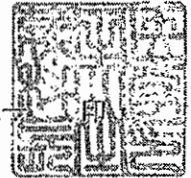
1、5における黄色のマーカ一部分は、別紙リストを添付しないで公開する際には削除
ないし適宜修正する。

医学研究倫理審査結果通知書

2020年03月12日

藤田医科大学
医学部・感染症科
教授 土井 洋平 殿

藤田医科大学
学長 才藤 栄



下記研究について、以下のとおり決定しましたので通知いたします。

記

1. 申請年月日： 2020年03月09日
2. 申請者(代表)： 藤田医科大学
医学部・感染症科 教授 土井 洋平
3. 審査区分： 新規
4. 受付番号： HM19-467
5. 研究課題： 「ファビピラビル等の抗ウイルス薬が投与されたCOVID-19患者の背景因子と治療効果の検討（観察研究）」
6. 審査結果： 承認
7. 備考：

2020年 月 日

他の研究機関への既存試料・情報の提供に関する届出書

(届出者の所属機関の長) 殿

届出者 所属: _____
職名: _____
氏名: _____ 印

下記のとおり、当施設で保有する既存試料・情報を外部機関へ提供するので、届け出ます。

- 添付資料
- 当該提供に係る研究計画書
 - 提供先の機関における倫理審査委員会承認の証書写し
 - その他 ()

1. 当該提供を行う研究に関する事項	
提供先の機関及び当該提供に係る責任者	提供先機関：藤田医科大学 責任者の部署・職名：微生物学講座・感染症科 教授 責任者氏名：土井洋平
研究課題名	ファビピラビル等の抗ウイルス薬が投与された COVID-19 患者の背景因子と治療効果の検討（観察研究）
研究代表者	所属研究機関：藤田医科大学 氏名：微生物学講座・感染症科 教授 土井洋平
研究計画書に記載の 予定研究期間	倫理審査委員会*承認日 ～ 2020年12月31日 *藤田医科大学医学研究倫理審査委員会
提供する試料・ 情報の項目	<input type="checkbox"/> 試料：該当せず <input checked="" type="checkbox"/> 情報：年齢、性別、入院日、入院前の所在（自宅、療養施設など）、基礎疾患、SARS-CoV-2 検出日、SARS-CoV-2 検出日の所在（ICU、病棟など）、COVID-19（肺炎）の重症度、抗ウイルス薬による治療の内容、治療への臨床的反応、院内生存率、退院先（自宅、療養施設など）
提供する試料・ 情報の取得の経緯 (複数選択可)	<input type="checkbox"/> 当該研究のための利用・提供について本人の IC/同意を得て取得 <input type="checkbox"/> 関連する別研究での利用・提供について本人の IC/同意を得て取得 <input checked="" type="checkbox"/> 診療の過程で取得(研究利用・提供の IC/同意は得ていない)
提供方法	直接・郵送・電子的配信・FAX
2. 確認事項	

<p>研究対象者の同意の取得状況等</p>	<p><input type="checkbox"/> 文書によりインフォームド・コンセントを受けている</p> <p><input type="checkbox"/> 口頭によりインフォームド・コンセントを受けている</p> <p><input type="checkbox"/> ア(ア)：匿名化されているもの（特定の個人を識別することができないものに限る。）を提供する場合</p> <p><input type="checkbox"/> ア(イ)：匿名加工情報又は非識別加工情報を提供する場合</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> ア(ウ)：匿名化されているもの（どの研究対象者の試料・情報であるかが直ちに判別できないよう、加工又は管理されたものに限る。）を提供する場合</p> <p><input type="checkbox"/> イ：アによることができない場合（オプトアウト及び倫理審査委員会の審査要）</p> <p><input type="checkbox"/> ウ：ア又はイによることができない場合であって、(※)を満たす場合（倫理審査委員会の審査要）</p>
<p>当施設における通知又は公開の実施の有無等</p>	<p><input checked="" type="checkbox"/> 実施しない</p> <p><input type="checkbox"/> 通知又は公開を実施</p> <p><input type="checkbox"/> 通知又は公開＋拒否機会の保障（オプトアウト）を実施</p> <p><input type="checkbox"/> その他適切な措置を実施</p>
<p>対応表の作成の有無</p>	<p><input checked="" type="checkbox"/> あり（管理者：届出者）</p> <p><input type="checkbox"/> 無し</p>
<p>試料・情報の提供に関する記録の作成・保管方法</p>	<p><input checked="" type="checkbox"/> この申請書を記録として保管する（管理者：届出者）</p> <p><input type="checkbox"/> 別途書式を提供先の機関に送付し、提供先の期間で記録を保管する</p> <p><input type="checkbox"/> その他（ ）</p>

- (※) ① 研究の実施に侵襲を伴わない
 ② 同意の手続の簡略化が、研究対象者の不利益とならない
 ③ 手続を簡略化しなければ研究の実施が困難であり、又は研究の価値を著しく損ねる
 ④ 社会的に重要性の高い研究と認められるものである
 ⑤ 以下のいずれかのうち適切な措置を講じる
- ・ 研究対象者等が含まれる集団に対し、試料・情報の収集及び利用の目的及び内容、方法等について広報する
 - ・ 研究対象者等に対し、速やかに、事後的説明を行う
 - ・ 長期間にわたって継続的に試料・情報が収集され、又は利用される場合には、社会に対し、その実情を当該試料・情報の収集又は利用の目的及び方法を含めて広報し、社会に周知されるよう努める

本研究では「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に従い、貴施設を「他機関に既存試料・情報の提供のみ行う者」としているため、倫理審査委員会の審査及び研究機関の長の許可を受けることを必要としていません。本書式「他の研究機関への既存試料・情報の提供に関する届出書」を所属機関の長に提出し、届出を行ってください。（届出の書式は貴施設の書式でも可）

シクレソニド観察研究(感染症学会主導)用

御中

(注文先 FAX : _____ 又は E-mail _____)

研究用医薬品購入希望書

シクレソニドの観察研究実施のため、以下のとおり、研究用医薬品の購入を希望します。

1. 医療機関名、住所

医療機関名 : _____

住所 : 〒 _____

2. 研究参加医師(氏名、所属、肩書、連絡先)

氏名(フリガナ) : _____

所属 : _____ (例: 呼吸器内科)

肩書 : _____ (例: 准教授、医局長)

連作先: TEL _____

E-mail _____

3. 注文日及び注文本数

注文日 : _____ 年 _____ 月 _____ 日

オルベスコ 200 μ g インヘラー56 吸入用(専用アダプター付き) 1本入 : _____ 本

統一商品コード : 294-22921-7

4. 院内での指定納品場所、担当者名、連絡先

希望納入日 : _____ 年 _____ 月 _____ 日

納品場所 : _____ (例: 薬剤部、部屋番号など)

担当者名(フリガナ) : _____

担当者連絡先 TEL _____

5. その他連絡事項(自由記述)

事務局 学校法人 藤田学園 藤田医科大学

XXXXXXX 病院用

北海道 アルフレッサ(株)
東北 6 県 東北アルフレッサ(株)
北陸 3 県 明祥(株)
四国 4 県 四国アルフレッサ(株)
中国 5 県 ティーエスアルフレッサ(株)
九州 7 県 アルフレッサ(株)
沖縄 (株)琉薬
上記以外の本州 アルフレッサ(株)

COVID-19 に対する抗ウイルス薬による治療の考え方 第1版

(2020年2月26日)

1. 目的

現時点では、COVID-19の抗ウイルス薬による治療に関する知見は限られている。過去には重症急性呼吸器症候群（SARS）、中東呼吸器症候群（MERS）患者に対して既存の抗ウイルス薬が使用されている。これらの事実に基づいてCOVID-19の抗ウイルス薬に関する本邦における暫定的な指針を示すのが本指針の目的である。日進月歩でCOVID-19に関する知見が集積しつつあり、本指針はCOVID-19の治療に関して新たに重要な知見が出てきた段階で改訂を予定している。尚、COVID-19の原因ウイルスはSARS-CoV-2であることから、本指針中でも厳密には用語としてSARS-CoV-2を用いるべき箇所があるが、明瞭化のためCOVID-19に統一した。

2. 使用にあたっての手続き

現在日本ではCOVID-19に適応を有する薬剤は存在しない。よって行う事のできる治療は、国内で既に薬事承認されている薬剤を適応外使用することである。使用にあたっては各施設の薬剤適応外使用に関する指針に則り、必要な手続きを行う事とする。

3. 抗ウイルス薬の対象と開始のタイミング

現時点では、患者の臨床経過の中における抗ウイルス薬を開始すべき時期は患者が低酸素血症を発症し、酸素投与が必要であることを必要条件とする。そのうえで以下のように考える。

1. 概ね50歳未満の患者では肺炎を発症しても自然経過の中で治癒する例が多いため、必ずしも抗ウイルス薬を投与せずとも経過を観察してよい。
2. 概ね50歳以上の患者では重篤な呼吸不全を起こす可能性が高く、死亡率も高いため、低酸素血症を呈し酸素投与が必要となった段階で抗ウイルス薬の投与を検討する。
3. 糖尿病・心血管疾患・慢性肺疾患、喫煙による慢性閉塞性肺疾患、免疫抑制状態等のある患者においても上記2に準じる。
4. 年齢にかかわらず、酸素投与と対症療法だけでは呼吸不全が悪化傾向にある例では抗ウイルス薬の投与を検討する。

4. 抗ウイルス薬の選択

本指針では現時点で日本での入手可能性や有害事象等の観点より以下の薬剤を治療薬として提示する。今後臨床的有効性や有害事象等の知見の集積に伴い、COVID-19の治療のための抗ウイルス薬の選択肢や用法用量に関し新たな情報が得られる可能性が高い。

< ロピナビル・リトナビル >

機序：ロピナビルは HIV-1 に対するプロテアーゼ阻害剤として有効性が認められている。シトクローム P450 の阻害によりロピナビルの血中濃度を保つためリトナビルとの合剤（ロピナビル・リトナビル）として使用される。コロナウイルスに関する明確な作用機序は明らかにされていないが、以下に示すように *in vitro* や動物モデルで MERS への有効性が示されており、COVID-19 に対してもパーチャルスクリーニングで有効である可能性が示されている²⁾。

in vitro・動物モデル：ロピナビルは *in vitro* で MERS-CoV の抑制効果が認められた³⁾。動物モデルにて予後改善効果があった⁴⁾。

海外での臨床報告：MERS-CoV に対する臨床試験は現在サウジアラビアにおいて施行中である（MIRACLE trial⁵⁾。また現在、中国の臨床試験登録サイトによれば COVID-19 に対するロピナビル・リトナビルの有効性に関するランダム化比較臨床試験が複数進行中である（結果未公表）。これらの試験ではロピナビル・リトナビルが 400 mg/100 mg 1 日 2 回から 500mg/100mg 1 日 3 回で使用されている。韓国においても 2 例の COVID-19 に対するロピナビル・リトナビル 400 mg/100 mg の 1 日 2 回投与が報告されている^{6,7)}。

国内での使用実績：2020 年 2 月 21 日までに国立国際医療研究センターでロピナビル・リトナビルを使用した症例の臨床経過を下記に記載する。

症例	Day1	Day7	Day15
(1)	4	5	6
(2)	4	5	8
(3)	4	2	未
(4)	4	3	未
(5)	4	2	未
(6)	5	未	未
(7)	6	未	未

Day1: ロピナビル/リトナビル投与開始日、未:既定の日数に未到達

1: 死亡

2: 入院中、肺炎あり、人工呼吸器、ECMO 管理

3: 入院中、肺炎あり、リザーバーマスク、ネーザルハイフローなどによる酸素投与あり

4: 入院中、肺炎あり、カニューラ、マスクによる酸素投与あり

5: 入院中、肺炎あり、酸素投与なし

6: 入院中、肺炎なし、酸素投与なし

7: 退院後、症状により日常生活に支障あり

8: 退院後、症状による日常生活の支障なし

投与方法（用法・用量）：

1. ロピナビル・リトナビル（カレトラ[®]配合錠）：400mg/100mg 経口 12 時間おき、10 日間程度
2. ロピナビル・リトナビル（カレトラ[®]配合内用液）：400mg/100mg（1 回 5 mL）経口 12 時間おき、10 日程度

*上記は抗 HIV 薬としての承認用量であるが、過去の流行時の報告では MERS ウイルスは $EC_{50} 8.0 \pm 1.5 \mu M$ (*in vitro*)、SARS ウイルスは $EC_{50} 17.1 \pm 1.0 \mu M$ (*in vitro*) であるため、HIV-1 と比較し、200 倍以上の EC_{50} である^{3,8)}。このため、MERS・SARS ウイルスの近縁種と捉えられる COVID-2019 についても、HIV-1 と比較して高濃度の EC_{50} を示す可能性があり、用量については有害事象のモニターと合わせ今後の検討が必要である。

投与時の注意点：

1. ロピナビル・リトナビルの有効性に関し、適切な重症度や投与開始のタイミングに関しては不明である。
2. 使用開始前には HIV 感染の有無を確認し、陽性の場合には対応について専門家に相談する。
3. リトナビルによる薬剤相互作用があるため、併用薬に注意する。
4. 錠剤の内服困難者に内用液を使用する場合、アルコール過敏がないか確認する。

< ファビピラビル >

機序：ファビピラビルは効能・効果を「新型又は再興型インフルエンザウイルス感染症（但し、他の抗インフルエンザウイルス薬が無効又は効果不十分なものに限り）」に限定して、2014 年 3 月に厚生労働省の承認を受けている。その作用機序は、生体内で変換された三リン酸化体 (T-705RTP) が、ウイルスの RNA ポリメラーゼを選択的に阻害するものであることから、インフルエンザウイルス以外の RNA ウイルスへも効果を示す可能性がある。

in vitro・動物モデル：*in vitro* で COVID-19 の EC_{50} は $61.88 \mu M$ であり、抑制効果が認められた。 EC_{50} はエボラウイルスに類似している。

海外での臨床報告：現在、中国の臨床試験登録サイトによれば COVID-19 に対するファビピラビルの有効性に関する臨床試験 (ChiCTR2000029600、ChiCTR2000029548) が進行中である (結果未公表)。

国内での使用実績：2020 年 2 月 21 日までに本剤の COVID-19 への使用実績は無い。

投与方法（用法・用量）：

1. 3,600 mg (1,800 mg BID) (Day 1) + 1,600 mg (800 mg BID) (Day 2 以降)、最長 14 日間投与。

投与時の注意点：

1. ファビピラビルの有効性に関し、適切な重症度や投与開始のタイミングに関しては不明である。
2. 以下の薬剤については、薬物相互作用の可能性があることから、ファビピラビルとの併用には注意して使用する：1) ピラジナミド、2) レパグリニド、3) テオフィリン、4) ファムシクロビル、5) スリンダク
3. 患者の状態によっては経口投与が極めて困難な場合も想定される。その場合は 55°C に加温した水を加えて試験薬懸濁液を調製する（簡易懸濁法）。被験者に経鼻胃管を挿入し、経鼻胃管が胃の中に入っていることを胸部 X 線検査で確認した後、ピストンを用いて懸濁液をゆっくりと注入する。その後、5 mL の水で経鼻胃管を洗浄する。
4. 動物実験において、本剤は初期胚の致死及び催奇形性が確認されていることから、妊婦又は妊娠している可能性のある婦人には投与しないこと。
5. 妊娠する可能性のある婦人に投与する場合は、投与開始前に妊娠検査を行い、陰性であることを確認した上で、投与を開始すること。また、その危険性について十分に説明した上で、投与期間中及び投与終了後 7 日間はパートナーと共に極めて有効な避妊法の実施を徹底するよう指導すること。なお、本剤の投与期間中に妊娠が疑われる場合には、直ちに投与を中止し、医師等に連絡するよう患者を指導すること。
6. 本剤は精液中へ移行することから、男性患者に投与する際は、その危険性について十分に説明した上で、投与期間中及び投与終了後 7 日間まで、性交渉を行う場合は極めて有効な避妊法の実施を徹底（男性は必ずコンドームを着用）するよう指導すること。また、この期間中は妊婦との性交渉を行わせないこと。
7. 治療開始に先立ち、患者又はその家族等に有効性及び危険性（胎児への曝露の危険性を含む）を十分に文書にて説明し、文書で同意を得てから投与を開始すること。
8. 本剤の投与にあたっては、本剤の必要性を慎重に検討すること。

5. COVID-19 に対する他の抗ウイルス薬^{9,10)}

COVID-19 に対する治療に使用できる可能性のある抗ウイルス薬にはレムデシビル、インターフェロン、クロロキンなどがあるが、それらの効果や併用効果に関しては今後の知見が待たれる。

版管理	
第 1 版	2020/2/26

参考文献

1. Novel Coronavirus Pneumonia Emergency Response Epidemiology Team. [The epidemiological characteristics of an outbreak of 2019 novel coronavirus diseases (COVID-19) in China]. *Zhonghua liu xing bing xue za zhi = Zhonghua liuxingbingxue zazhi*. 2020;41(2):145-51.
2. Contini A. Virtual Screening of an FDA Approved Drugs Database on Two COVID-19 Coronavirus Proteins 2020. Available from: https://chemrxiv.org/articles/Virtual_Screening_of_an_FDA_Approved_Drugs_Database_on_Two_COVID-19_Coronavirus_Proteins/11847381/1.
3. de Wilde AH, Jochmans D, Posthuma CC, Zevenhoven-Dobbe JC, van Nieuwkoop S, Bestebroer TM, et al. Screening of an FDA-approved compound library identifies four small-molecule inhibitors of Middle East respiratory syndrome coronavirus replication in cell culture. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(8):4875-84.
4. Chan JF, Yao Y, Yeung ML, Deng W, Bao L, Jia L, et al. Treatment With Lopinavir/Ritonavir or Interferon-beta1b Improves Outcome of MERS-CoV Infection in a Nonhuman Primate Model of Common Marmoset. *J Infect Dis*. 2015;212(12):1904-13.
5. Arabi YM, Allothman A, Balkhy HH, Al-Dawood A, AlJohani S, Al Harbi S, et al. Treatment of Middle East Respiratory Syndrome with a combination of lopinavir-ritonavir and interferon-beta1b (MIRACLE trial): study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*. 2018;19(1):81.
6. Kim JY, Choe PG, Oh Y, Oh KJ, Kim J, Park SJ, et al. The First Case of 2019 Novel Coronavirus Pneumonia Imported into Korea from Wuhan, China: Implication for Infection Prevention and Control Measures. *Journal of Korean medical science*. 2020;35(5):e61-e.
7. Lim J, Jeon S, Shin HY, Kim MJ, Seong YM, Lee WJ, et al. Case of the Index Patient Who Caused Tertiary Transmission of COVID-19 Infection in Korea: the Application of Lopinavir/Ritonavir for the Treatment of COVID-19 Infected Pneumonia Monitored by Quantitative RT-PCR. *Journal of Korean medical science*. 2020;35(6):e79.
8. Oldfield V, Plosker GL. Lopinavir/ritonavir: a review of its use in the management of HIV infection. *Drugs*. 2006;66(9):1275-99.
9. Chong YP, Song JY, Seo YB, Choi JP, Shin HS, Rapid Response T. Antiviral Treatment Guidelines for Middle East Respiratory Syndrome. *Infect Chemother*. 2015;47(3):212-22.

10. England PH. Treatment of MERS-CoV: Information for Clinicians Clinical decision-making support for treatment of MERS-CoV patients 2015. Available from: https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/459835/merscov_for_clinicians_sept2015.pdf.

一般社団法人日本感染症学会

2020年3月10日

医療機関における新型コロナウイルス感染症への対応ガイド

第2版改訂版 (ver.2.1)

一般社団法人 日本環境感染学会

はじめに

2019年12月に中国武漢に端を発した新型コロナウイルス感染症（COVID-19）は急激な勢いで感染者数が増加し、海外にも広がっています。国内では指定感染症に指定され、WHOは緊急事態宣言を出して対策が取られていますが、現時点ではまだ感染が拡大する傾向にあります。国内でも感染経路が明確でない感染例が次々と報告されており、一般の医療機関においても感染者が受診する可能性がある段階に入っています。

日本環境感染学会は上記の状況を鑑み、本感染症が拡大した場合の国内の医療現場の混乱を防ぎ、適切な対応を取っていただくために「医療機関における新型コロナウイルス感染症への対応ガイド 第1版」を2020年2月12日に公開しました。さらにその後、変化した状況を踏まえて第2版を公開させていただきましたが、本ガイドはさらに一部を改訂したものです。

本ガイドの内容は本学会が示したひとつの目安であり、それぞれの施設の対応を制限するものではありません。また、各施設の状況に応じて具体的な対応を決めて頂くことが重要です。

各医療機関および高齢者介護施設の職員の方々におかれましては、本ガイドを参考にいただき、本感染症の終息まで大きな混乱を生じずに日々の業務を遂行していただくことを願っております。

ウイルスの特徴

ヒトに感染するコロナウイルスは従来、風邪のウイルス4種類と重症急性呼吸器症候群コロナウイルス（SARS-CoV）、中東呼吸器症候群コロナウイルス（MERS-CoV）の合わせて6種類が知られていました。新型コロナウイルス感染症（COVID-19）の原因病原体であるSARS-CoV-2はこれらとは異なるウイルスであり、主に呼吸器感染を起こし、病原性はMERSやSARSより低いレベルと考えられています。中国湖北省において致死率は2%超という数字が示されていますが、中国湖北省以外および国外では実際にはそれよりも低い数値となっています。

新型コロナウイルスは、飛沫および接触でヒト-ヒト感染を起こすと考えられていますが、空気感染は否定的です。感染力は一人の感染者から2~3人程度に感染させると言われています。

発生状況

2020年3月1日時点における本ウイルスの感染者数は全世界で約8万7千人、死亡者数は約3,000人となっています。その内、圧倒的多数は中国における感染者が占めているものの、中国国内での新規発生は減少傾向にあります。中国以外では世界50カ国以上で感染者が報告されています。

国内では2020年1月16日に最初の国内の感染例が報告され、以後、2020年3月1日時点で感染者数は946人（死亡者数11人）となっています。その多くはクルーズ船内の乗客と乗員感染例（711例）であり、さらに検疫や隔離・搬送などに関わった人11人、武漢からチャーター機で帰国した15人となっています。その他の国内の感染者数は225人となり、感染経路がたどれない感染者も増加し、各地域で新たな報告が続いています。

2020年2月21日現在、感染者13人の濃厚接触者128人に対する14日間の健康観察が終了しています。その結果、濃厚接触者から感染が確認されたのは4人で、感染源となった13人に比べて減少しています。一方で、医療機関における集団発生など、規模が拡大する事例があることも分かってきました。

国内で感染が確認された例の多くは軽症例や無症候病原体保有者が占めている一方、高齢者や基礎疾患のある患者では重症例や死亡例も報告される傾向があります。そのため、今後、国内でも集中治療を含めた積極的な治療を要する症例が増加する可能性が高いと考えられます。

これまで、国内外を含めて新型コロナウイルス感染症に占める小児や若年者の割合は明らかに低く、重症化する割合も低い傾向が認められます。この理由については明らかではありません。ただし、小児や若年者の場合でも流行が起こり得ることを念頭に対策を行う必要があります。

臨床的特徴（病態、症状）

新型コロナウイルス感染症は呼吸器系の感染が主体です。ウイルスの主な感染部位によって上気道炎、気管支炎、および肺炎を発症すると考えられます。本ウイルスに感染した方全員が発症するわけではなく、無症状で経過してウイルスが排除される例も存在すると考えられます。

本感染症の潜伏期は、約 5 日で最長 14 日程度。遷延する発熱を主体とする上気道炎症例、肺炎症例、発症 8 日以降に呼吸不全が進行し急性呼吸窮迫症候群(ARDS)を併発して更に重症化する症例があります。

感染者の症状としては、発熱、咳、筋肉痛、倦怠感、呼吸困難などが比較的多くみられ、頭痛、喀痰、血痰、下痢などを伴う例も認められます。一般的に呼吸困難を認める場合は肺炎を発症しているものと推測されますが、上気道炎の症状が主体であっても肺炎の存在が確認される例や、1 週間以上の上気道炎症状が続いた後に肺炎が出現する例もあります。

中国において新型コロナウイルス感染症の確定診断がなされた 1,099 例の検討結果では、入院中に発熱が認められたのは全体の約 89%で、約 10%は 37.5°C以下に留まっていました。また、入院時に発熱を認めた症例は約 44%で、発熱がみられない、あるいは軽度だからといって本疾患を安易に否定することはできないと考えられます。また、重症例と非重症例の比較においては、息切れが明らかに重症例に多くみられ、39°C以上の高熱や悪寒がやや重症例に多い傾向が認められています。これは肺炎の重症度を反映しているものと推測します。

本感染症の重症例は主に高齢者で認められます。また、重症化しやすい要因として、高血圧などの循環器疾患、糖尿病、喘息や COPD などの呼吸器疾患、がん、各種免疫不全、人工透析などが考えられます。妊婦が重症化しやすいかどうかは不明ですが、胎児への影響もあるため十分な注意が必要です。

重症例は肺炎を発症していると考えられますが、さらに死亡例では ARDS や敗血症、敗血症性ショックなどの合併が考えられます。

国内では新型コロナウイルスによる髄膜炎と診断された症例が報告されていますが、実際にはまれな事例と考えます。ただし、無菌性髄膜炎の症例に遭遇した場合、念のため新型コロナウイルス感染症の可能性も含めた鑑別が必要になると思われます。

なお、新型コロナウイルス感染症の重症化のリスク因子ならびに、どの程度、細菌感染症が合併しやすいかについては、明確なデータは認められません。

診断

1) 臨床的診断

新型コロナウイルス感染症に特異的な症状や所見はありません。本ウイルスに感染した方に認めやすい症状の特徴としては、長く続く発熱と強い倦怠感であると言われていています。ただし、症状のみで臨床的に診断を確定することはできませんので、症状、診察所見および各種検査所見を踏まえて、まず他の感染症および発熱性疾患との鑑別が重要です。特に類似した症状を示すインフルエンザや他の感染症については、抗原検査等を行って除外診断を行う必要があります。血液検査では特異的な所見はありませんが、白血球減少、リンパ球減少がみられる傾向があります。

さらに臨床的に重要なのは肺炎の有無を確認することであり、疑わしい場合は胸部 X 線、あるいは胸部 CT 検査の検査を行う必要があります。肺炎の画像上の所見としては、病初期には間質性パターンが主にみられ、両側の末梢側を中心とする多発性のすりガラス状陰影が多く、索状影などを伴うこともあります。浸潤影や胸水は乏しいとされています。病期の進行により ARDS の所見を伴い、鑑別が困難となります。

新型コロナウイルス感染が確定した症例の経過を追うことで明らかになった点としては、肺炎を合併した症例でも胸部 CT で小さな淡い病変のみ認める例も少なくなく、胸部 X 線では見逃してしまう可能性も考えられます。ただし、感染例全例に胸部 CT による検査が推奨されるわけではありません。

肺炎と診断された場合は肺炎球菌やレジオネラ属菌の尿中抗原検出、マイコプラズマ遺伝子検出、呼吸器検体の培養、血液培養など他の原因病原体の検索を併せて行ってください。

なお、一部の感染者においては、呼吸器症状が前面に表れず、下痢や嘔吐などの消化器症状が主な症状である場合があります。そのため、呼吸器症状がみられない場合でも新型コロナウイルス感染症を否定する根拠にはなりません。

2) ウイルス学的診断

新型コロナウイルスが患者検体から検出されれば確定診断が付き「確定例」として扱います。ウイルス検査が行われてない「疑い例」は、海外渡航又は居住歴、あるいは感染確定例との濃厚接触の有無、および臨床症状や経過、各種検査所見などに基づいて医師が判断します。

本ガイドの第1版では、“発熱や呼吸器症状を認めていても、海外渡航歴や新型コロナウイルス感染症確定患者との濃厚接触歴の無い方などは新型コロナウイルスによる感染症の可能性は否定的です”と記載していました。しかし、2020年3月の段階では海外渡航歴や感染確定者との濃厚接触歴が無い方であっても、感染が判明する例が多くなっており、むしろ国内でクラスターを形成し感染が拡大する傾向にあります。

そのため、本学会としては、海外渡航歴や感染確定例との濃厚接触といった感染リスクをある程度考慮に入れるとしても、各種検査や画像診断の結果などを踏まえて、他の病原体による感染症が否定的な肺炎症例については、医師の総合的な判断を尊重して新型コロナウイルスの検査対象とすべきであると考えます。

なお、発熱や呼吸器症状はあっても肺炎の存在が証明されないケースでは、感染リスク（海外渡航歴や感染確定例との濃厚接触）が無ければ積極的に検査すべき対象とは言えません。しかし、1週間以上発熱や呼吸器症状が続き、各種の治療にもかかわらず増悪する傾向があり、他の病原体の関与が否定的な場合は、検査対象にすべきであると考えます。

ウイルス検査にはPCR法など核酸増幅法が用いられており、医療機関から疑似症として保健所に届出後、国立感染症研究所、地方衛生研究所、および検疫所で検査が実施されていました。検査体制の拡充により、外注検査センターや大学でも検査が実施できる体制が整えられてきているため、さらに検査可能なケースが増えてくると思われます。

検体としては、下気道由来検体(喀痰もしくは気管吸引液)が望ましいとされていますが、下気道由来検体の採取が難しい場合は上気道由来検体のみでも可となっています。採取は発病後5日以内のできるだけ早い時期の採取が望ましく、速やかに氷上または冷蔵庫(4℃)に保管し、輸送まで48時間以上かかる場合は-80℃以下の凍結保存が推奨されています。上気道由来の検体では偽陰性となる事例が報告されており、初回のPCRが陰性であったとしても臨床的に新型コロナウイルスによる感染症が否定できない場合には、感染対策の解除には慎重になるべきと考えます。

治療・予防（ワクチン）

新型コロナウイルス感染症(COVID-19)に対して、現在、有効性が証明された治療法はありません。ただし、抗HIV薬のロピナビル/リトナビル、抗インフルエンザ薬のアビガン、エボラ出血熱の治療薬として開発されたレムデシビル、および吸入ステロイドの喘息治療薬であるシクレソニドなどが治療薬の候補として挙がっており、今後の検証によって効果が証明されれば治療薬として用いられる可能性があると思われます。

現時点における治療の基本は対症療法です。肺炎を認める症例などでは、必要に応じて輸液や酸素投与、昇圧剤等の全身管理を行います。細菌性肺炎の合併が考えられる場合は、細菌学的検査の実施とともに抗菌薬の投与が必要と思われます。肺炎例や重症例に対して、副腎皮質ステロイドの投与については、現時点では有効性を示すデータは無く、推奨されません。

重症呼吸不全に陥った症例では、体外式膜型人工肺(ECMO：extra-corporeal membrane oxygenation)の適応となる場合があります。ただし、ECMOを用いた治療には経験が豊富な医師の判断が必要とされるため、日本集中治療医学会などの関連学会は医療現場からの相談を24時間体制で受け付けることになっています。

新型コロナウイルスのワクチンは実用化されているものは存在しません。

感染対策

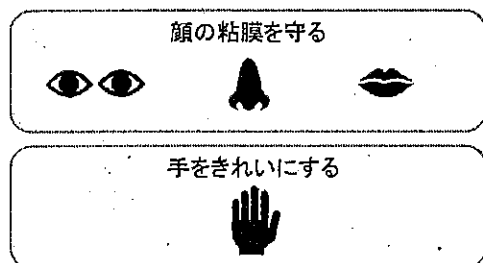
1) 標準予防策の徹底

新型コロナウイルス感染症に対して、感染対策上重要なのは、まず呼吸器衛生/咳エチケットを含む標準予防策の徹底です。基本的に誰もがこのウイルスを保有している可能性があることを考慮して、全ての患者の診療において、状況に応じて必要な个人防护具(PPE; Personal Protective Equipment)を選択して適切に着用してください。コロナウイルスはエンベロープを有するため、擦式アルコール手指消毒薬は新型コロナウイルスの消毒にも有効です。手指衛生は適切なタイミングで実施してください。

2) 感染経路別予防策

新型コロナウイルス感染症の感染確定例および疑い例には、飛沫予防策と接触予防策を標準予防策に追加して行います。新型コロナウイルスは気道分泌物および糞便から分離され、対策のポイントは以下の2点です。

- ・ ウイルスを含む飛沫が目、鼻、口の粘膜に付着するのを防ぐ
- ・ ウイルスが付着した手で目、鼻、口の粘膜と接触するのを防ぐ



(1) 个人防护具

- ・ 通常は眼・鼻・口を覆う个人防护具（アイシールド付きサージカルマスク、あるいはサージカルマスクとゴーグル/アイシールド/フェイスガードの組み合わせ）、キャップ、ガウン、手袋を装着します（図1【通常の場面参照】）。

一時的に大量のエアロゾルが発生しやすい状況※においては、上記にN95マスクを追加します。N95マスクを装着するたびにユーザーシールチェックを実施します（図1【N95マスクの着用を要する場面】参照）。

※エアロゾルが発生しやすい状況：気管挿管・抜管、NPPV装着、気管切開術、心肺蘇生、用手換気、気管支鏡検査、ネブライザー療法、誘発採痰など

- ・ 个人防护具を着用中また脱衣時に眼・鼻・口の粘膜に触れないように注意し、図1に示すタイミングで手指衛生を実施します。
- ・ キャップの装着は必須ではありません。ただし、髪に触れた際に手指に付着したウイルスによる粘膜汚染が懸念されるため、特に髪を触りやすい方はキャップをかぶることを推奨します。
- ・ タイベック®防護服などの全身を覆う着衣の着用は必須ではありません。

基本的にシューズカバーを使用する必要はありません。患者の状態に応じて必要ならば使用してください。

(2) 個室隔離

患者は個室に収容します。陰圧室は必須ではありません。

3) 外来患者への対応

事前に感染リスク（海外渡航歴・滞在歴、または、感染確定例との濃厚接触）があることを申告して受診される場合は、帰国者・接触者相談センターに相談の上、帰国者・接触者外来を設けている施設で対応していただくことになっています。

帰国者・接触者外来を設けていない医療機関にも新型コロナウイルスの感染患者が受診する可能性はあります。ただし、発熱や呼吸器症状を訴える患者が一般の外来を受診しても、現時点では新型コロナウイルス以外の感染者が圧倒的に多いのが現状です。そのため、基本的には標準予防策を徹底しながら、新型コロナウイルスによる感染例が含まれていても感染を予防できる対応が必要になると思われます。

一般外来で発熱患者に対応する職員は、常時マスクを着用し、手指衛生の徹底をはかります。マスクの着用は従来の各種のエビデンスにより感染予防効果が認められています。ただし、すき間が生じるなど着用方法が適切でない場合は効果が下がります。また、マスク表面に触るなど手指が汚染してしまうことによって感染リスクを高める場合もあり注意が必要です。

もし、診療の途中で新型コロナウイルスによる感染が否定できないあるいは疑わしいと判断された場合は、他の患者と導線を切り離して対応できる場所を確保し、診療を行うことが望ましいと考えられます。その際、患者に対応する医療スタッフは、それぞれの曝露リスクと施設の基準に応じて個人防護具を装着します（感染経路別予防策の項および図1参照）。

外来に多くの発熱患者が訪れた場合は、インフルエンザ流行期の対応に準じて、外来で適切な場所を確保して他の患者との距離を保つように工夫します。

4) トリアージ

外来受診時の患者のトリアージにおいては、まず重症度の評価を行います。肺炎や敗血症が疑わしい例では標準予防策を徹底しながら、画像や採血等の必要な検査を行うとともに、輸液等の処置を開始します。非重症例でも標準予防策を徹底した上で必要な検査を行います。

感染リスクの観点からも評価を行います。海外渡航歴や滞在歴、あるいは感染確定例との濃厚接触が確認されれば、疑い例としてウイルス検査の必要性を考慮します。流行国および地域は常時変化していますので、最新の情報を確認するようにしてください。

5) 入院患者への対応

感染確定例は地域の指定医療機関での対応が可能な場合は、指定医療機関に入院する手続きが進められます。ただし感染者数が増加した場合は、指定医療機関は重症例を優先的に入院させ治療する必要があります。そのため、軽症例は協力医療機関でも入院に対応することが望めます。

感染確定例や疑い例は、個室で管理します。陰圧室での管理が望ましいと考えられますが必須の条件ではありません。

もし多数の患者が発生した場合はコホーティングも考慮すべきですが、疑い例の中には新型コロナウイルスの

感染者と非感染者が混在し、患者間の感染が起こる可能性があります。そのため、疑い例を対象としたコホーティングは避け、新型コロナウイルスの検査結果が判明した症例のみに限定する必要があります。

病室外への移動は医学的に必要な場合のみに限定し、患者にはサージカルマスクを着用してもらいます。

患者に対応する医療スタッフは、それぞれの曝露リスクと施設の基準に応じて个人防护具を装着します（感染経路別予防策の項および図1参照）

6) 環境消毒

新型コロナウイルス感染症の原因病原体であるSARS-CoV-2は、エンベロープを有するためアルコールに感受性を有します。また、0.05%の次亜塩素酸ナトリウムも有効と考えられます。高頻度接触部位、聴診器や体温計、血圧計等の器材などは、アルコールや抗ウイルス作用のある消毒剤含有のクロスでの清拭消毒を行います。このウイルスは気道分泌物だけでなく、糞便からも分離されますので、感染者が使用したトイレの便座や水道のハンドルも消毒の対象となります。

病室内の環境清掃を行うスタッフは手袋、サージカルマスク、ガウン、フェイスシールドまたはゴーグルを着用します。

7) 換気

感染確定例や疑い例の陰圧室での対応が難しい場合は、通常の個室で管理し室内の換気を適切に行います。換気の回数は少なくとも6回/時以上行うことが望ましいと考えられます。

8) 患者の使用した食器やリネンについて

患者に使用した食器、リネンは、通常の熱水洗浄（80℃、10分間）で問題ありませんので、特別な対応は不要です。施設内においては、病室外に出してから洗浄するまでの間に人の手を複数介する可能性がある場合のみ配慮が必要です。水溶性ランドリーバックやプラスチック袋に入れて搬送すれば、特別な洗浄やディスボ化は不要です。

院内のコインランドリーは、場所を共有するリスクを考えると使用しないことが望ましいでしょう。

9) 透析患者への対応

新型コロナウイルスに感染した患者に透析が必要な状況となった場合も、標準予防策を徹底した上で、飛沫感染予防策と接触感染予防策を行う対応に変わりはありません。透析に用いた排液については、HBV、HCV、HIVの場合と同様の取り扱いで対応していただいで良いと考えられます。

10) 面会制限

新型コロナウイルス感染症の患者には原則的に感染性がないと判断されるまで、家族などの面会は禁止します。入院患者で適切な予防策が実施されていない状況で新型コロナウイルス感染が判明した場合は、施設全体での面会禁止を推奨します。

11) 職員の健康管理

新型コロナウイルス感染症の確定例または疑い例の対応を行ったすべての医療従事者が自宅待機や就業制限の対象になるわけではありません。個々の状況に応じて曝露のリスク評価を行い、健康状態のモニタリングや就業制限の必要性を判断します（表1）。

医療従事者が曝露されたとしても、すぐにPCR検査の対象となるわけではありません。曝露後早期であれば

検出感度は低いことが予想されるため、まずは検査に依存せず、感染対策上の観点から就業制限等を含めた対応を優先させて実施する必要があります。

国内における患者の診療体制

1) 帰国者・接触者相談センター

新型コロナウイルス感染症の疑い例を、診療体制等の整った医療機関に確実につなぐため、帰国者・接触者相談センターが設置されています。現在、帰国者・接触者相談センターに相談する目安は以下の通りです。

- ・ 風邪の症状や37.5度以上の発熱が4日以上続く方
(解熱剤を飲み続けなければならない方も同様)
- ・ 強いだるさ(倦怠感)や息苦しさ(呼吸困難)がある方

ただし、以下のような方は重症化しやすいため、この状態が2日程度続く場合には、帰国者・接触者相談センターに相談することを勧めています。

- ・ 高齢者
- ・ 糖尿病、心不全、呼吸器疾患(COPD等)の基礎疾患がある方や透析を受けている方
- ・ 免疫抑制剤や抗がん剤等を用いている方

2) 帰国者・接触者外来

新型コロナウイルス感染症の診断を行うことを目的として、帰国者・接触者外来が設置されています。帰国者・接触者外来は、新型コロナウイルス感染症が強く疑われる方の診察を目的としたものであり、他の患者と動線を分け、必要な検査体制を確保し、医療従事者の十分な感染対策を行うことが必要とされています。

3) 感染者の受診調整

帰国者・接触者相談センターが各保健所に設置され、帰国者・接触者外来へと受診調整を行っています。そのため、新型コロナウイルス感染症の可能性のある患者は、受診前に帰国者・接触者相談センターに連絡し、受診する時刻及び入口等について問い合わせる必要があります。もし疑い例に該当しない場合は、必要に応じて一般の医療機関を受診するよう指導されます。

4) 一般の医療機関における診療

一般の医療機関においては、患者が本来帰国者・接触者外来を受診すべき疑い例であることが受付等で判明した場合は、帰国者・接触者相談センターへ連絡の上で、帰国者・接触者外来の受診を案内することになっています。

5) PCR 検査の保険適用

新型コロナウイルス感染症のPCR検査は、3月6日から保険適用となりました。自己負担分は基本的に検査結果に関わらず公費扱いとなりますので、患者または受検者の費用負担は発生しません。これにより、医師が必要と認めた場合は、保健所に検査の可否について確認せずとも、外注の検査施設に依頼してPCR検査を実施してもらうことが可能になりました。ただし、PCR検査は帰国者・接触者外来を有する医療機関か、それと同様の機能を有する医療機関として都道府県等が認めた医療機関しか依頼できないため、注意が必要です。

PCR検査が公費負担になることによって、検査の希望者が急増することも予想されます。そのため、本当に検査を受けるべき患者を適切に選択する必要があります。また検査が不要と思われる患者についてはPCR検査に該当しないことについて丁寧に説明し、不安であれば経過観察後に改めて相談に応じるなどの対応を取ることが必要だと思われます。

6) 退院の判断と対応

入院中の新型コロナウイルス感染症の患者が軽快した場合、以下①②の基準を満たしていれば退院可と判定します。①48時間毎にPCR検査を実施し、陰転化を確認。②前回検体採取後12時間以後に再度採取を行い、二回連続で陰性が確認。なお、この場合の軽快とは37.5度以上の発熱が24時間なく、呼吸器症状が改善傾向であることを指しています。

中国広東省の衛生当局の発表によると、感染から回復して退院した人の14%がPCR検査で再び陽性と確認されています。状況から判断すると再燃の可能性を示唆する内容ではありますが、その頻度や病態が明確になっているわけではありません。ただし、念のため、病状が回復してPCR陰性の確認後に退院する場合でも、再燃の可能性を考慮して健康状態の観察と不要不急の外出を避けるようアドバイスする必要があると考えられます。

7) お亡くなりになった場合の対応

残念ながら新型コロナウイルスの感染者がお亡くなりになった場合、遺体搬送業者がご遺体に接触する際は、手袋、マスク、フェイスシールド、ガウンを装着して対応することが望ましいと考えられます。また、納棺後にご遺体に接触した場合は、手指衛生を行う必要があります。ただし新型コロナウイルスだからといって、葬儀や火葬の際に特別に厳密な対応が求められるわけではありません。

法律上の規定

新型コロナウイルス感染症は指定感染症に指定されています。それに伴い、中東呼吸器症候群（MERS）や重症急性呼吸器症候群（SARS）と同じ2類感染症と同等の措置が取られます。具体的には患者を診断した医師は直ちに報告義務があり、都道府県知事は患者に入院を勧告し、全国約400の指定医療機関への入院措置が行われます。患者には一定期間、就業制限の指示を出すことができます。なお、入院中の治療費は公費負担となります。なお、緊急その他やむを得ない場合につき、感染症指定医療機関における感染症病床以外に入院させること、又は感染症指定医療機関以外の医療機関に入院させることが可能となっています。

相談窓口、問い合わせ先

厚生労働省の電話相談窓口

電話番号 0120-565653

受付時間 9時00分~21時00分(土日・祝日も実施)

都道府県・保健所等による電話相談窓口

https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000164708_00001.html

参考文献、情報

厚生労働省

新型コロナウイルスに関する Q&A

https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/dengue_fever_qa_00001.html

新型コロナウイルス感染症に対応した医療体制について

<https://www.mhlw.go.jp/content/10900000/000591991.pdf>

感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律における新型コロナウイルス感染症患者の退院及び就業制限の取扱いについて(一部改正)

<https://www.mhlw.go.jp/content/10900000/000597947.pdf>

国立感染症研究所

2019-nCoV(新型コロナウイルス)感染を疑う患者の検体採取・輸送マニュアル

<https://www.niid.go.jp/niid/ja/diseases/ka/corona-virus/2019-ncov/9325-manual-200121.html>

日本感染症学会

COVID-19 急性呼吸不全への人工呼吸と ECMO 基本的注意事項

http://www.kansensho.or.jp/modules/news/index.php?content_id=130

国立国際医療研究センター

中国湖北省武漢市で報告されている新型コロナウイルス関連肺炎に対する対応と院内感染対策(2020年1月21日改訂版)

<https://www.niid.go.jp/niid/images/epi/corona/2019nCoV-01-200121.pdf>

中村啓二、忽那賢志、大曲 貴夫他、当院における新型コロナウイルス(2019-nCoV)感染症患者 3 例の報告
http://www.kansensho.or.jp/uploads/files/topics/2019ncov/2019ncov_casereport_200205.pdf

一般社団法人 職業感染制御研究会

個人防護具の着用手順

https://www.safety.jrigoicp.org/img/download/ppc_catalog_2011/個人用防護具（PPE）の着脱の手順一覧_抜粋_高解像度_見開き版.pdf

WHO

Infection prevention and control during health care when novel coronavirus (nCoV) infection is suspected

[https://www.who.int/publications-detail/infection-prevention-and-control-during-health-care-when-novel-coronavirus-\(ncov\)-infection-is-suspected-20200125](https://www.who.int/publications-detail/infection-prevention-and-control-during-health-care-when-novel-coronavirus-(ncov)-infection-is-suspected-20200125)

CDC

Interim Infection Prevention and Control Recommendations for Patients with Confirmed 2019 Novel Coronavirus (2019-nCoV) or Patients Under Investigation for 2019-nCoV in Healthcare Settings

<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/hcp/infection-control.html>

European Centre for Disease Prevention and Control

Situation update – worldwide

<https://www.ecdc.europa.eu/en/geographical-distribution-2019-ncov-cases>

The New England Journal of Medicine

Guan WJ, et al. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. N Engl J Med. 2020

https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa2002032?query=featured_home

JAMA

Wu Z, McGoogan JM. Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72 314 Cases From the Chinese Center for Disease Control and Prevention. JAMA. 2020 Feb 24. doi: 10.1001/jama.2020.2648.

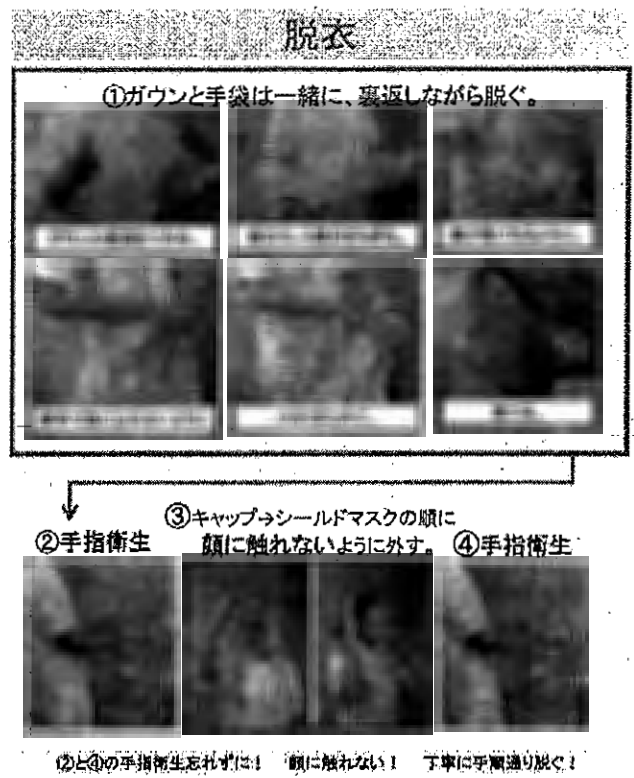
Clinical Infectious Diseases

Noti JD, et al. Detection of infectious influenza virus in cough aerosols generated in a simulated patient examination room. Clin Infect Dis. 2012 54:1569-77.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4680957/>

図1 個人防護具の種類と着脱手順例

【通常の場面】



【N95 マスクの着用を要する場面*】

*気管挿管, NPPV, 気管切開, 心肺蘇生, 用手換気, 気管支鏡検査など一時的に大量のエアロゾルが生じる処置の実施時

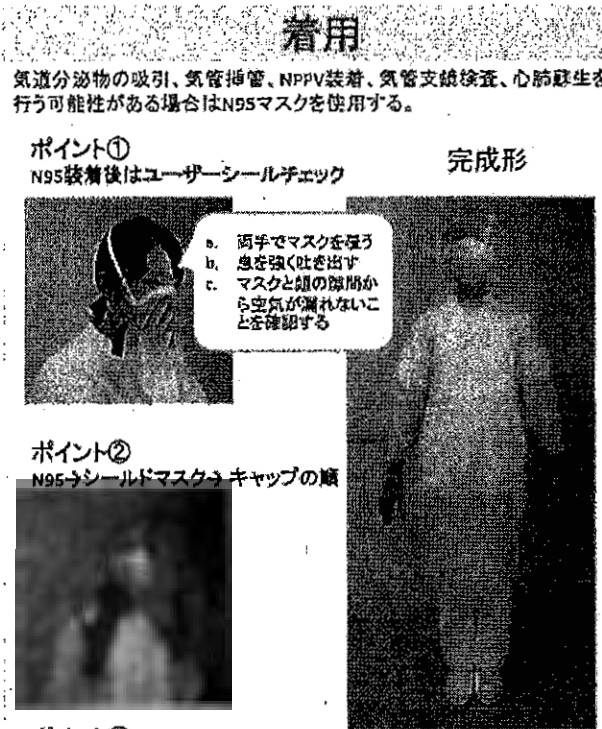


表1 医療従事者（注1）の曝露のリスク評価と対応

新型コロナウイルス感染症患者と接触したときの状況（注2）	曝露のリスク	健康観察の方法（注7） （最後に曝露した日から14日目まで）	無症状の医療従事者に対する就業制限
マスクを着用している新型コロナウイルス感染症患者と長時間（注5）の濃厚接触あり（注6）			
医療従事者のPPE：着用なし	中リスク	積極的	最後に曝露した日から14日間の就業制限
医療従事者のPPE：サージカルマスクまたはN95マスクの着用なし	中リスク	積極的	最後に曝露した日から14日間の就業制限
医療従事者のPPE：サージカルマスクは着用しているが眼の防護なし	低リスク	自己	なし
医療従事者のPPE：ガウンまたは手袋の着用なし（注3）	低リスク	自己	なし
医療従事者のPPE：推奨されているPPEをすべて着用（N95ではなくサージカルマスクを着用）	低リスク	自己	なし
マスクを着用していない新型コロナウイルス感染症患者と長時間（注5）の濃厚接触あり（注6）			
医療従事者のPPE：着用なし	高リスク	積極的	最後に曝露した日から14日間の就業制限
医療従事者のPPE：サージカルマスクまたはN95マスクの着用なし	高リスク	積極的	最後に曝露した日から14日間の就業制限
医療従事者のPPE：サージカルマスクは着用しているが眼の防護なし（注4）	中リスク	積極的	最後に曝露した日から14日間の就業制限
医療従事者のPPE：ガウンまたは手袋の着用なし（注3）（注4）	低リスク	自己	なし
医療従事者のPPE：推奨されているPPEをすべて着用（N95ではなくサージカルマスクを着用）（注4）	低リスク	自己	なし

Interim U.S. Guidance for Risk Assessment and Public Health Management of Healthcare Personnel with Potential Exposure in a Healthcare Setting to Patients with 2019 Novel Coronavirus (2019-nCoV)2020年3月4日版をもとに作成

注1 医療従事者

ここでいう医療従事者とは、医療機関で勤務するすべての職員を指す。

注2 記載されているPPE以外のPPEは着用していたと考える。例えば「眼の防護なし」とある場合は、それ以外の推奨されるPPE（マスク、手袋、ガウン）は着用していたと考える。

注3 体位変換などの広範囲の身体的接触があった場合は中リスクと判断する。

注4 医療従事者が大量のエアロゾルを生じる処置（下記）を実施した場合やこれらの処置を実施中の病室内に滞在した場合は中リスクと判断する。

エアロゾルを生じる処置とは、気管挿管・抜管、NPPV 装着、気管切開術、心肺蘇生、用手換気、気管支鏡検査、ネブライザー療法、誘発採痰などを指す。

注5 接触時間

ここでいう接触時間の長さは以下を目安とする。

長時間：数分以上

短時間：約1～2分

注6 濃厚接触

ここでいう濃厚接触とは以下のいずれかを指す。

- a) COVID-19 患者の約2メートル以内で長時間接触する（例えば、ケアを行う、または、2メートル以内に座って話しをするなど）
- b) 個人防護具を着用せずに患者の分泌物や排泄物に直接接触する（例えば、咳をかけられる、素手で使用済みのティッシュに触れるなど）

濃厚接触の有無を判断する際は、接触した時間（長いほうが曝露の可能性が高い）、患者の症状（咳がある場合は曝露の可能性が高い）、患者のマスク着用の有無（着用していれば飛沫による他者や環境の汚染を効果的に予防することができる）についても考慮する。

以下の状況では、患者のマスク着用の有無にかかわらず、医療従事者が推奨される個人防護具を着用していない場合でも低リスクと考えられる。

- ・ 受付で短時間の会話を交わした場合
- ・ 病室に短時間入ったが患者や分泌物/排泄物との接触がない場合
- ・ 退院直後の病室に入室した場合

患者のそばを通りかかったり、病室に入らず、患者や患者の分泌物/排泄物との接触がない場合、リスクはないと判断する。

注7 健康観察の方法

以下の二つの方法がある。いずれの場合も症状（発熱または呼吸器症状）が出現した時点で直ちに他の人から離れ（マスクがあれば着用し）、医療機関の担当部門に電話連絡のうえ受診する。

積極的：医療機関の担当部門が曝露した医療従事者に対し、発熱または呼吸器症状の有無について1日1回、電話やメール等で確認する。

自己：曝露した医療従事者自身が業務開始前に発熱または呼吸器症状の有無を医療機関の担当部門に報告する。

COVID-19 に対するシクレソニド（オルベスコ）投与観察研究ご参加のお願い

日本感染症学会会員の皆様

学会員の皆様には、新型コロナ肺炎への対応をはじめ、我が国の医療のため多大なるご尽力をいただいております。このような状況で、当学会ホームページに、COVID-19 患者様へシクレソニド（オルベスコ[®]）が投与された症例報告が掲載され、学会からも症例を速やかに蓄積し、シクレソニド（オルベスコ）投与の情報を集積することをお願いしているところです。

今般、日本感染症学会では、厚生労働省と協議し、COVID-19 に対するシクレソニド（オルベスコ[®]）投与症例の観察研究を開始することとし、本観察研究に必要な十分量のシクレソニド（オルベスコ[®]）を確保しているところです。

本観察研究に参画を希望される会員におかれましては、シクレソニド投与観察研究事務局（藤田医科大学：covid-19@fujita-hu.ac.jp）までご連絡ください。本観察研究への参加及び倫理的手続きに関する事項、ならびにシクレソニド（オルベスコ[®]）の医療機関への供給について、同事務局よりご連絡いたします。

なお、ファビピラビル（アビガン[®]）の特定臨床研究および観察研究につきましても、同じ事務局（藤田医科大学：covid-19@fujita-hu.ac.jp）で対応していただいております。

日本感染症学会といたしましては、この困難を一丸となって乗り越えるべく情報提供、研究活動、政策提言などを行っていく所存です。

引き続き学会員の皆様からのご指導、ご協力をいただけますよう、どうぞよろしくお願い申し上げます。

一般社団法人日本感染症学会
理事長 館田 一博

シクレソニド使用上のご注意

日本各地で、大小のクラスターからの感染拡大および散発の感染例が報告され、新型コロナウイルス感染症は、新たな感染拡大のステージに入りました。

神奈川県施設（岩瀬ら）から報告されたシクレソニドの肺炎改善効果は、3症例と限定的ではありますが、ウイルスに対する特効薬のない現状では、重要な報告として日本感染症学会 HP 上に掲載中です。

シクレソニドの使用上の注意点について述べたいと思います。

1. 本剤は、新型コロナウイルス感染が確定している患者様に対して治療目的で使用されます。感染予防目的で使用はできません。（今、従来使用されていた喘息の患者様への本剤の供給が困難になっている地区もあります）
2. 本剤の新型コロナウイルスに対する抗ウイルス効果は、プロドラッグの段階で確認されており、現在までの成績では、調べた他のステロイド吸入薬では確認されておりません（感染研ウイルス3部 松山ら、投稿中）。
3. 使用にあたっては、以下の点にご留意ください。
 - 1) ウイルスが感染・増殖している肺胞上皮細胞に確実に薬剤が到達するようにできるだけ大きく深呼吸し、薬剤の投与と同期させること。これは、従来の経口薬や静注薬が、血流を通じて局所に移行するのとは異なり、いわば自力でシクレソニドを到達させなければならないからです。
 - 2) そのためには、肺炎が進行して、しっかりした呼吸ができなくなる前の段階での投与開始が望ましいと考えます。
 - 3) 吸入がうまくいかない場合、練習用吸入器具などを用いるのも一つの手段です。深い呼吸が困難な症例は、スパーサーなどの補助的な使用などもご考慮下さい。
 - 4) 本剤の吸入時、53%が肺に分布し、30%が口腔内に残存、肺の中では肺胞に多く分布すると報告されています（論文参照）。口腔内の清浄も大事です。
Newman S. *et al.* Respiratory Medicine 2006, 100: 375-384
 - 5) 患者様の症状が改善し、PCR 陰性化・肺炎像が消失しても、深部の肺胞上皮に残存ウイルスが存在し、再び活性化する可能性もあります。退院後も定期的なフォローアップをお願いいたします。
これらの点については、症例が集積した段階で、あらためてご報告いたします。

必ずシクレソニドの使用例の日本感染症学会へのご登録をお願い申し上げます。

（文責 森島恒雄）

2020年3月16日

一般社団法人日本感染症学会

症 例

ヒドロキシクロロキンを使用し症状が改善した COVID-19 の 2 例

Key word: COVID-19, ヒドロキシクロロキン

序 文

2019 年の年末に中国で原因不明の肺炎が報告され SARS-CoV-2 が原因と判明してから、2 カ月しか経過していないにもかかわらず、瞬く間に世界中へと広がり現在も感染者は増加している。本邦においても 2020 年 3 月 8 日 12 時時点で、COVID-19 は感染者 455 人、死亡者 6 人が存在し(クルーズ船を除く)、更にこの中で人工呼吸器を使用、あるいは集中治療室に入室している者が 27 人と報告されている。しかし、今のところ COVID-19 に対する確立した治療方法は存在しない。日本感染症学会からは 2020 年 2 月 26 日に抗ウイルス薬による治療の考え方(第 1 版)が提示され、ロピナビル・リトナビル(LPV/r)およびファビピラビルの 2 剤が治療薬に挙げられている。今回、経過中に LPV/r を投与したにも関わらず、治療反応性が乏しい 2 例を経験し、うち 1 例は人工呼吸管理を要する呼吸不全となった。新たな治療が必要と考えヒドロキシクロロキンの投与を行ったところ、2 例とも症状が改善したため報告する。

症 例

症例 1: 69 歳, 男性

主訴: 呼吸不全, 発熱

現病歴: A 病院入院 1 週間前に倦怠感を主訴に近医を受診し、感冒と診断され経過。

観察していた。その後も 1 週間症状が持続したため再度近医を受診し、胸部レントゲンで肺炎像を認めたため、保健所を介して A 病院に紹介された。同日、喀痰 SARS-CoV-2 PCR 検査が行われ、COVID-19 と診断された。入院時の全身状態は良好だったが、胸部 CT で両肺(左優位)にすりガラス影が観察された(Fig.1)。入院翌日よりロピナビル・リトナビル(LPV/r)開始したが、入院 2 日目の胸部レントゲンで肺炎像が右肺にも広がり、急激な経過で呼吸不全となった。入院 3 日目に人工呼吸器管理となり、更に呼吸不全が進行し

た際、速やかに ECMO を導入することを念頭に B 病院へ同日転院搬送となった。

既往歴: 高血圧症, 2 型糖尿病

生活歴: 喫煙歴 20 本×30 年(20~50 歳)

Fig.1: A 病院入院時の胸部 CT



入院時現症: 意識(鎮静中.挿管前は清明), 体温 39.5°C, 血圧 144/56 mmHg, 脈拍 77/分, 呼吸数 20/分(自発呼吸)。人工呼吸器設定は SIMV mode, FiO₂ 0.7, PEEP 12 cmH₂O, PS 10 cmH₂O の状態で pO₂ 82.3 mmHg, P/F 比 117 であった。身体所見上, 右下肺背側で coarse crackles を聴取した。腹部は膨満しており蠕動音は低下していた。

血液検査(Table1), 画像検査(Fig.2,3)を示す。

Table 1

Hematology		Biochemistry	
WBC	7,870 / μ L	TP	5.2 g/dL
Neut	85.2 %	Alb	2.3 g/dL
Lym	8.2 %	BUN	22 mg/dL
Mo	4.4 %	Cre	1.37 mg/dL
Eo	0.0 %	AST	68 U/L
Baso	0.3 %	ALT	35 U/L
RBC	3.67 $\times 10^6$ / μ L	T-Bil	1.9 mg/dL
Hb	11.2 g/dL	ALP	97 U/L
Ht	33.9 %	Na	137 mEq/L
Plt	157 $\times 10^3$ / μ L	K	3.3 mEq/L
Coagulation		Cl	104 mEq/L
PT-INR	1.26 INR	CRP	21.92 mg/dL
APTT	34.9 sec		
FDP	5.4 μ g/mL		

Fig.2 : B 病院入院時の胸部 X 線写真

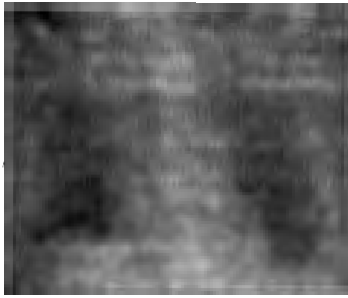
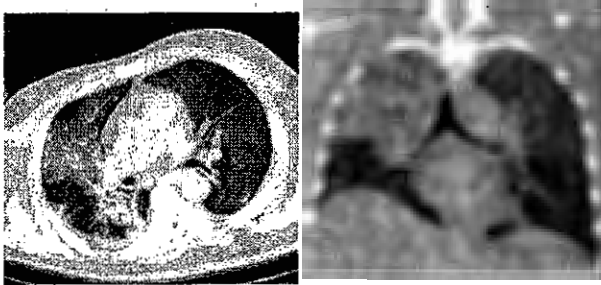


Fig.3 : B 病院入院時の胸部 CT



入院後経過 (Fig.6)

入院時、P/F 比 120 の呼吸不全を呈していた。ECMO を考慮する状態だったが、多診療科で協議し、まずは人工呼吸管理で対応し、ARDS に準じた肺保護戦略を行った。抗ウイルス治療として、①抗 HIV 薬 (LPV/r) 1 回 2 錠 (800/200mg) の継続に加え、②抗マalaria 薬；ヒドロキシクロロキン 400mg 1 日 1 回 (SLE 治療薬としての用量) を開始した。第 2 病日 CT 検査を施行したが (Fig.3)，前医と比較して両肺のすりガラス影が増悪し右肺優位の肺炎像を生じていた。呼吸状態は改善なく、1 回換気量を抑制するため同日より筋弛緩薬を開始した。また、腎障害が進行し腎代替療法として CHDF を開始した (血液濾過器は第 2~7 病日は sepXiris® (バクスター社)，第 8 病日以降は UT フィルター® (ニプロ社) を選択した)。第 3 病日より酸素化能がやや改善し始め、第 4 病日には酸素化能が P/F 比 >200 まで改善し、PEEP を下げても酸素化の低下を認めなくなった。また、胸部 CT で右肺の肺炎像は改善した (Fig.4)。同日で筋弛緩薬は終了した。第 5 病日にはビリルビン値の上昇が続き LPV/r の副作用を考え中止した。その後も呼吸状態および画像所見は徐々に改善した (Fig.5)。呼吸状態が改善したため、第 9 病日にはヒドロキシクロロキンの内服を終了した。現在は、覚醒遅延が遷延し抜管時期を検討している。

経過中、第 3 病日と第 9 病日に喀痰の SARS-CoV-2 PCR 検査を施行したが、いずれも陽性であった。

Fig.4 : 第 4 病日の胸部 CT

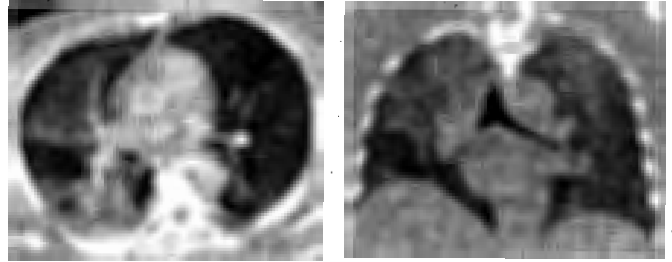


Fig.5 : 第 7 病日の胸部 CT

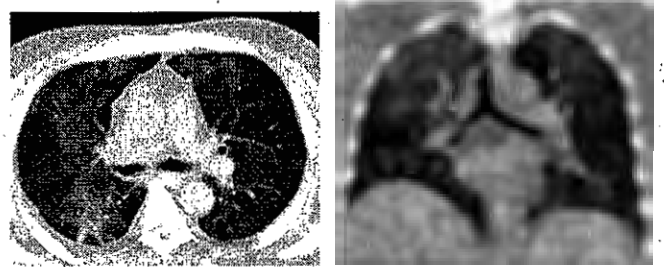
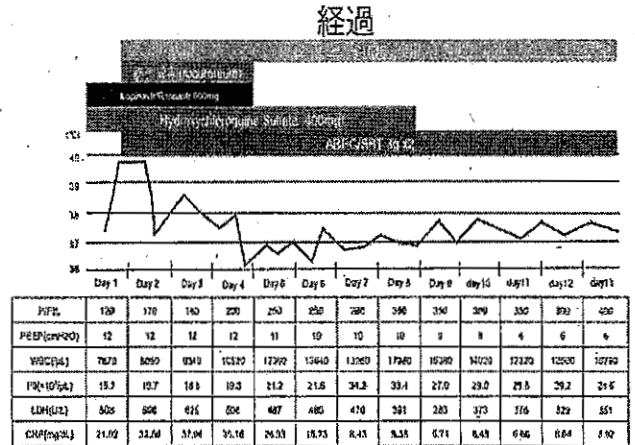


Fig 6



症例 2 : 66 歳，女性，症例 1 の妻。

主訴：発熱，倦怠感

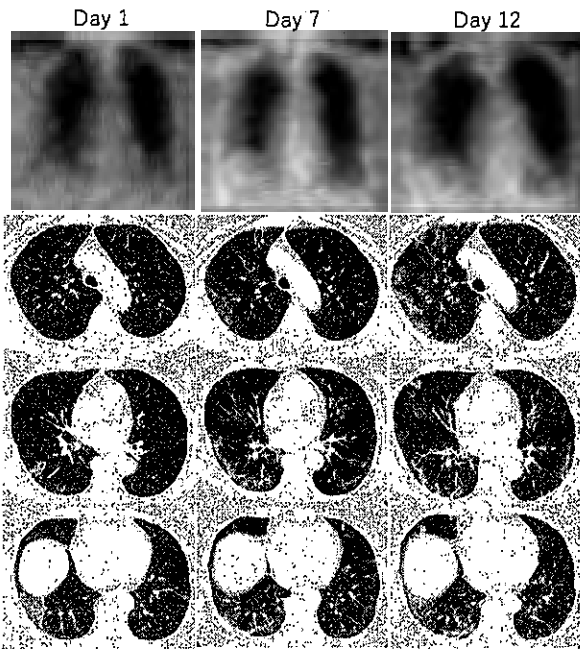
現病歴：入院 3 日前，悪寒と倦怠感が出現したため近医受診，感冒として対応された。3 日後，夫が COVID-19 と診断され，濃厚接触者として A 病院を受診した。SARS-CoV-2 PCR 検査の結果，COVID-19 と診断され入院した。

既往歴：なし

入院時現症：特記事項なし

画像検査：Fig.7

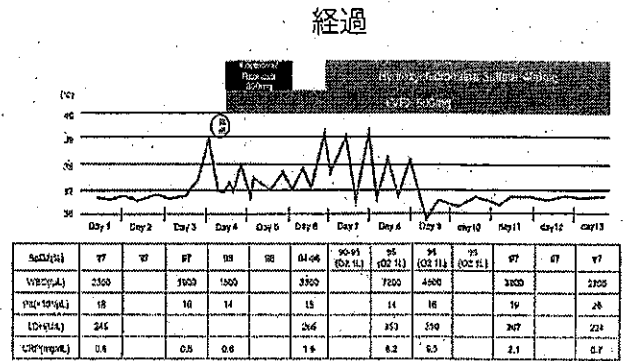
Fig.7 入院中の画像検査所見の経過



入院後経過(Fig.8)

入院時の全身状態は良好だったため、特に治療は行わず経過観察とした。第2病日までは発熱なく、経過良好だった。第3病日夜より38℃の発熱を認め、第4病日も発熱が持続していたため、血液培養を採取後にLVFX 500mgの内服を開始すると同時に、LPV/r 1回2錠(800/200mg)の内服を開始した。しかし、第5病日よりLPV/r内服に伴うものと考えられる食思不振および水様性下痢が出現した。第6病日も消化器症状持続し、高熱に伴う全身の消耗も顕著であったため、LPV/rの内服は中止した。第7病日の胸部レントゲンでは右肺の透過性が低下し、胸部CTでは入院時認められたすりガラス影は消退傾向だったが、新規に両肺の斑状すりガラス影が多発し、肺炎像の悪化を認めた。採血所見でも炎症の上昇を認め、低酸素血症も出現したため酸素1L/分の投与を開始した。そのため、新たな治療薬としてヒドロキシクロロキン 400mg 1日1回の内服を開始した。第9病日には解熱し、その後徐々に全身状態は改善した。画像所見では既報の通り、当初はすりガラス影を認めたが、徐々に浸潤影へと変化していった。第13および15病日に施行したSARS-CoV-2 PCRは陰性で、第16病日に退院した。

Fig.8



考 察

今回、LPV/rを早期に開始した後も症状が増悪したため、2症例ともヒドロキシクロロキンを開始した。ヒドロキシクロロキン開始後2日目より2症例とも症状が改善し始めており、ヒドロキシクロロキンが有効であった可能性が考えられた。抗マalaria薬であるリン酸クロロキンは中国国家衛生健康委員会より出されている新型コロナウイルス診療ガイドラインでは使用が推奨されている¹⁾が、本邦では生産されていない。しかし、同じ薬物動態を示すヒドロキシクロロキンは本邦でもSLEの治療薬として認可されており、中国では既にCOVID-19に対するリン酸クロロキンとヒドロキシクロロキンを比較した臨床試験が施行されている²⁾。リン酸クロロキンにおいては、100人以上の患者で肺炎像の改善、ウイルス排除率、有症状期間などで十分な差が得られたと報告がある²⁾。本薬はSLEに使用されているように抗炎症作用が知られた作用であるが、食胞内のpHを上昇させることや糖鎖付加を阻害することで、ウイルスの増殖を抑えることができる抗ウイルス作用も有すると考えられている²⁾⁵⁾。本薬の副作用は少ないが、一方でまれな重大副作用として網膜症が挙げられる。累積投与量が200g以上と長期使用する場合には危険性が考慮されるが、今回SLEに対する使用量でかつ短期間の使用に留まっておりCOVID-19に対して安全に使用が可能と考える。COVID-19の致死率については、最近の報告では1.4%と発症者の母数が増えるにつれ低下しているが³⁾、集中治療室に入室し人工呼吸管理を要するような重症例の28日以内の死亡率は61.5%と高く⁴⁾、ICU入室後死亡するまでの中央値も7日と短いこ

とから早期に有効な治療介入を行う必要があると考える。ヒドロキシクロロキンは今回重症例においても症状改善に寄与した可能性があり、副作用もほとんどなく安全に使えるため本感染症に対して第一選択薬あるいは併用薬として考慮すべき薬剤と考える。今後COVID-19が本邦で増加することが懸念されたため、治療の一助となる報告となれば幸いである。

文 献

- 1) 中国新型コロナウイルス診療ガイドライン（第6版）
（2020.2.18）（和訳）
http://www.kansensho.or.jp/uploads/files/topics/2019ncov/covid19_haien_200302.pdf
- 2) Gao J, Tian Z, Yang X. Breakthrough: Chloroquine phosphate has shown apparent efficacy in treatment of COVID-19 associated pneumonia in clinical studies. Biosci Trends. 2020 Feb 19. DOI: 10.5582/bst.2020.01047
- 3) Guan WJ, Ni ZY, Hu Y, *et al.* Clinical Characteristics of Corona Disease 2019 in China. NEJM. 2020 Feb 28. DOI: 10.1056/NEJMoa2002032
- 4) Yang X, Yu Y, Shu H, *et al.* Clinical Course and Outcomes of Critically Ill Patients With SARS-CoV-2 Pneumonia in Wuhan, China: A Single-Centered, Retrospective, Observational Study. Lancet Respir Med. 2020 Feb 24. DOI: 10.1016/S2213-2600(20)30079-5
- 5) Wang M, Cao R, Zhang L, Yang L, Xiao G, *et al.* Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) *in vitro*. Cell Res. 2020 Mar;30(3):269-271. doi: 10.1038/s41422-020-0282-0.

Journal Pre-proofs

COVID-19 infection: origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses

Muhammad Adnan Shereen, Suliman Khan, Abeer Kazmi, Nadia Bashir, Rabeea Siddique

PII: S2090-1232(20)30054-0
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.03.005>
Reference: JARE 784

To appear in: *Journal of Advanced Research*

Received Date: 15 March 2020
Accepted Date: 15 March 2020

Please cite this article as: Adnan Shereen, M., Khan, S., Kazmi, A., Bashir, N., Siddique, R., COVID-19 infection: origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses, *Journal of Advanced Research* (2020); doi: <https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.03.005>

This is a PDF file of an article that has undergone enhancements after acceptance, such as the addition of a cover page and metadata, and formatting for readability, but it is not yet the definitive version of record. This version will undergo additional copyediting, typesetting and review before it is published in its final form, but we are providing this version to give early visibility of the article. Please note that, during the production process, errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

© 2020 THE AUTHORS. Published by Elsevier BV on behalf of Cairo University

COVID-19 infection: origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses

Muhammad Adnan Shereen^{1,2*}, Suliman Khan^{1*}, Abeer Kazmi³, Nadia Bashir¹, Rabeea Siddique¹

¹The Department of Cerebrovascular Diseases, The Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, China

²State Key Laboratory of Virology, College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan, PR China

³College of life sciences, Wuhan University, Wuhan, PR China.

#Corresponding: S.K (suliman.khan18@mails.ucas.ac.cn).

*Contributed equally (M.A.S and S.K)

Abstract

The coronavirus disease 19 (COVID-19) is a highly transmittable and pathogenic viral infection caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), which emerged in Wuhan, China and spread around the world. Genomic analysis revealed that SARS-CoV-2 is phylogenetically related to severe acute respiratory syndrome-like (SARS-like) bat viruses, therefore bats could be the possible primary reservoir. The intermediate source of origin and transfer to humans is not known, however, the rapid human to human transfer has been confirmed widely. There is no clinically approved antiviral drug or vaccine available to be used against COVID-19. However, few broad-spectrum antiviral drugs have been evaluated against COVID-19 in clinical trials; resulted in clinical recovery. In the current review, we summarize and comparatively analyze the emergence and pathogenicity of COVID-19 infection and previous human coronaviruses severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) and middle east respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV). We also discuss the approaches for developing effective vaccines and therapeutic combinations to cope with this viral outbreak.

Keywords: Coronaviruses; COVID-19; Origin; Outbreak; Spread

Introduction

Coronaviruses belong to the Coronaviridae family in the Nidovirales order. Corona represents crown-like spikes on the outer surface of the virus; thus, it was named as a coronavirus. Coronaviruses are minute in size (65-125nm in diameter) and contain a single-stranded RNA as a nucleic material, size ranging from 26 to 32kbs in length (Fig. 1). The subgroups of coronaviruses family are alpha (α), beta (β), gamma (γ) and delta (δ) coronavirus. The severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV), H5N1 influenza A, H1N1 2009 and Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) cause acute lung injury (ALI) and acute respiratory distress syndrome (ARDS) which leads to pulmonary failure and result in fatality. These viruses were thought to infect only animals until the world witnessed a severe acute respiratory syndrome (SARS) outbreak caused by SARS-CoV, 2002 in Guangdong, China (1). Only a decade later, another pathogenic coronavirus, known as Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) caused an endemic in Middle Eastern countries (2).

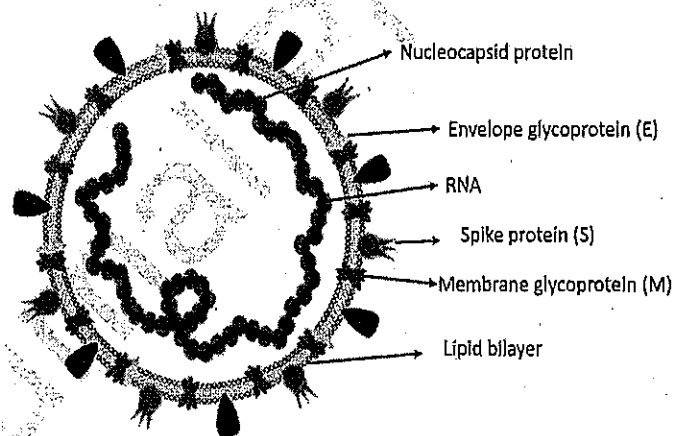


Figure 1: Structure of respiratory syndrome causing human coronavirus.

Recently at the end of 2019, Wuhan an emerging business hub of China experienced an outbreak of a novel coronavirus that killed more than eighteen hundred and infected over seventy thousand individuals within the first fifty days of the epidemic. This virus was reported to be a member of the β group of coronaviruses. The novel virus was named as Wuhan coronavirus or 2019 novel coronavirus (2019-nCov) by the Chinese researchers. The International Committee on Taxonomy

of Viruses (ICTV) named the virus as SARS-CoV-2 and the disease as COVID-19 (3-5). In the history, SRAS-CoV (2003) infected 8098 individuals with mortality rate of 9%, across 26 countries in the world, on the other hand, novel corona virus (2019) infected 120000 individuals with mortality rate of 2.9%, across 109 countries, till date of this writing. It shows that the transmission rate of SARS-CoV-2 is higher than SRAS-CoV and the reason could be genetic recombination event at S protein in the RBD region of SARS-CoV-2 may have enhanced its transmission ability. In this review article, we discuss the origination of human coronaviruses briefly. We further discuss the associated infectiousness and biological features of SARS and MERS with a special focus on COVID-19.

Comparative analysis of emergence and spreading of coronaviruses

In 2003, the Chinese population was infected with a virus causing Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) in Guangdong province. The virus was confirmed as a member of the Beta-coronavirus subgroup and was named SARS-CoV (6, 7). The infected patients exhibited pneumonia symptoms with a diffused alveolar injury which lead to acute respiratory distress syndrome (ARDS). SARS initially emerged in Guangdong, China and then spread rapidly around the globe with more than 8000 infected persons and 776 deceases. A decade later in 2012, a couple of Saudi Arabian nationals were diagnosed to be infected with another coronavirus. The detected virus was confirmed as a member of coronaviruses and named as the Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV). The World health organization reported that MERS-coronavirus infected more than 2428 individuals and 838 deaths (8). MERS-CoV is a member beta-coronavirus subgroup and phylogenetically diverse from other human-CoV. The infection of MERS-CoV initiates from a mild upper respiratory injury while progression leads to severe respiratory disease. Similar to SARS-coronavirus, patients infected with MERS-coronavirus suffer pneumonia, followed by ARDS and renal failure (9).

Recently, by the end of 2019, WHO was informed by the Chinese government about several cases of pneumonia with unfamiliar etiology. The outbreak was initiated from the Hunan seafood market in Wuhan city of China and rapidly infected more than 50 peoples. The live animals are frequently sold at the Hunan seafood market such as bats, frogs, snakes, birds, marmots and rabbits (10). On 12 January 2020, the National Health Commission of China released further details about the epidemic, suggested viral pneumonia (10). From the sequence-based analysis of

isolates from the patients, the virus was identified as a novel coronavirus. Moreover, the genetic sequence was also provided for the diagnosis of viral infection. Initially, it was suggested that the patients infected with Wuhan coronavirus induced pneumonia in China may have visited the seafood market where live animals were sold or may have used infected animals or birds as a source of food. However, further investigations revealed that some individuals contracted the infection even with no record of visiting the seafood market. These observations indicated a human to human spreading capability of this virus, which was subsequently reported in more than 100 countries in the world. The human to human spreading of the virus occurs due to close contact with an infected person, exposed to coughing, sneezing, respiratory droplets or aerosols. These aerosols can penetrate the human body (lungs) via inhalation through the nose or mouth (Fig 2) (11-14).

Primary reservoirs and hosts of coronaviruses

The source of origination and transmission are important to be determined in order to develop preventive strategies to contain the infection. In the case of SARS-CoV, the researchers initially focused on raccoon dogs and palm civets as a key reservoir of infection. However, only the samples isolated from the civets at the food market showed positive results for viral RNA detection, suggesting that the civet palm might be secondary hosts (15). In 2001 the samples were isolated from the healthy persons of Hongkong and the molecular assessment showed 2.5% frequency rate of anti-bodies against SARS-coronavirus. These indications suggested that SARS-coronavirus may be circulating in humans before causing the outbreak in 2003 (16). Later on, *Rhinolophus* bats were also found to have anti-SARS-CoV antibodies suggesting the bats as a source of viral replication (17). The Middle East respiratory syndrome (MERS) coronavirus first emerged in 2012 in Saudi Arabia (9). MERS-coronavirus also pertains to beta-coronavirus and having camels as a zoonotic source or primary host (18). In a recent study, MERS-coronavirus was also detected in *Pipistrellus* and *Perimyotis* bats (19), proffering that bats are the key host and transmitting medium of the virus (20, 21). Initially, a group of researchers suggested snakes be the possible host, however, after genomic similarity findings of novel coronavirus with SARS-like bat viruses supported the statement that not snakes but only bats could be the key reservoirs (Table 1) (22, 23). Further analysis of homologous recombination revealed that receptor binding spike

glycoprotein of novel coronavirus is developed from a SARS-CoV (CoVZXC21 or CoVZC45) and a yet unknown Beta-CoV (24). Nonetheless, to eradicate the virus, more work is required to

Journal Pre-proof

be done in the aspects of the identification of the intermediate zoonotic source that caused the transmission of the virus to humans.

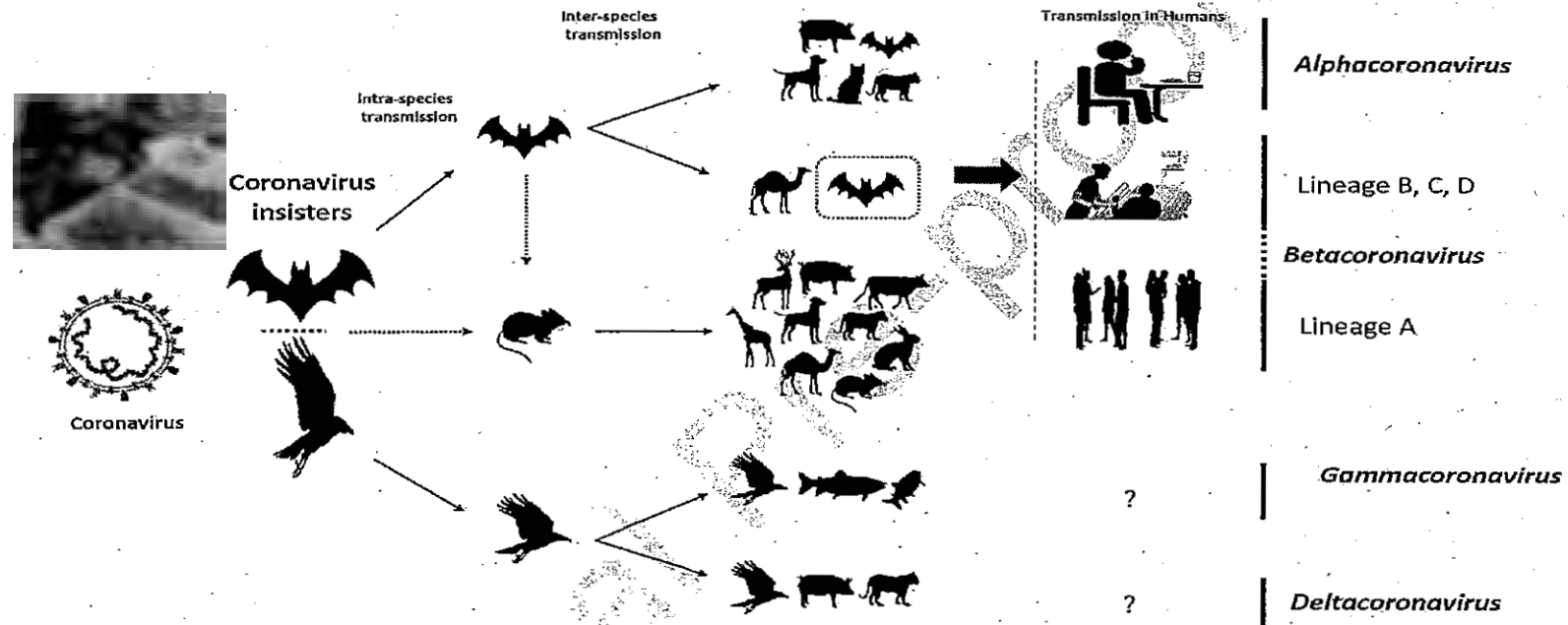


Figure 2: The key reservoirs and mode of transmission of coronaviruses (suspected reservoirs of SARS-CoV-2 are red encircled); only α and β coronaviruses have the ability to infect humans, the consumption of infected animal as a source of food is the major cause of animal to human transmission of the virus and due to close contact with an infected person, the virus is further transmitted to healthy persons. Dotted black arrow shows the possibility of viral transfer from bat whereas the solid black arrow represent the confirmed transfer.

Key features and entry mechanism of human coronaviruses

All coronaviruses contain specific genes in ORF1 downstream regions that encode proteins for viral replication, nucleocapsid and spikes formation (25). The glycoprotein spikes on the outer surface of coronaviruses are responsible for the attachment and entry of the virus to host cells (Fig 1). The receptor-binding domain (RBD) is loosely attached among virus, therefore, the virus may infect multiple hosts (26, 27). Other coronaviruses mostly recognize aminopeptidases or carbohydrates as a key receptor for entry to human cells while SARS-CoV and MERS-CoV recognize exopeptidases (2). The entry mechanism of a coronavirus depends upon cellular proteases which include, human airway trypsin-like protease (HAT), cathepsins and transmembrane protease serine 2 (TMPRSS2) that split the spike protein and establish further penetration changes (28, 29). MERS-coronavirus employs dipeptidyl peptidase 4 (DPP4), while HCoV-NL63 and SARS-coronavirus require angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) as a key receptor (2, 26).

SARS-CoV-2 possesses the typical coronavirus structure with spike protein and also expressed other polyproteins, nucleoproteins, and membrane proteins, such as RNA polymerase, 3-chymotrypsin-like protease, papain-like protease, helicase, glycoprotein, and accessory proteins (30, 31). The spike protein of SARS-CoV-2 contains a 3-D structure in the RBD region to maintain the van der Waals forces (32). The 394 glutamine residue in the RBD region of SARS-CoV-2 is recognized by the critical lysine 31 residue on the human ACE2 receptor (33). The entire mechanism of pathogenicity of SARS-CoV-2, from attachment to replication is well mentioned in Figure 3.

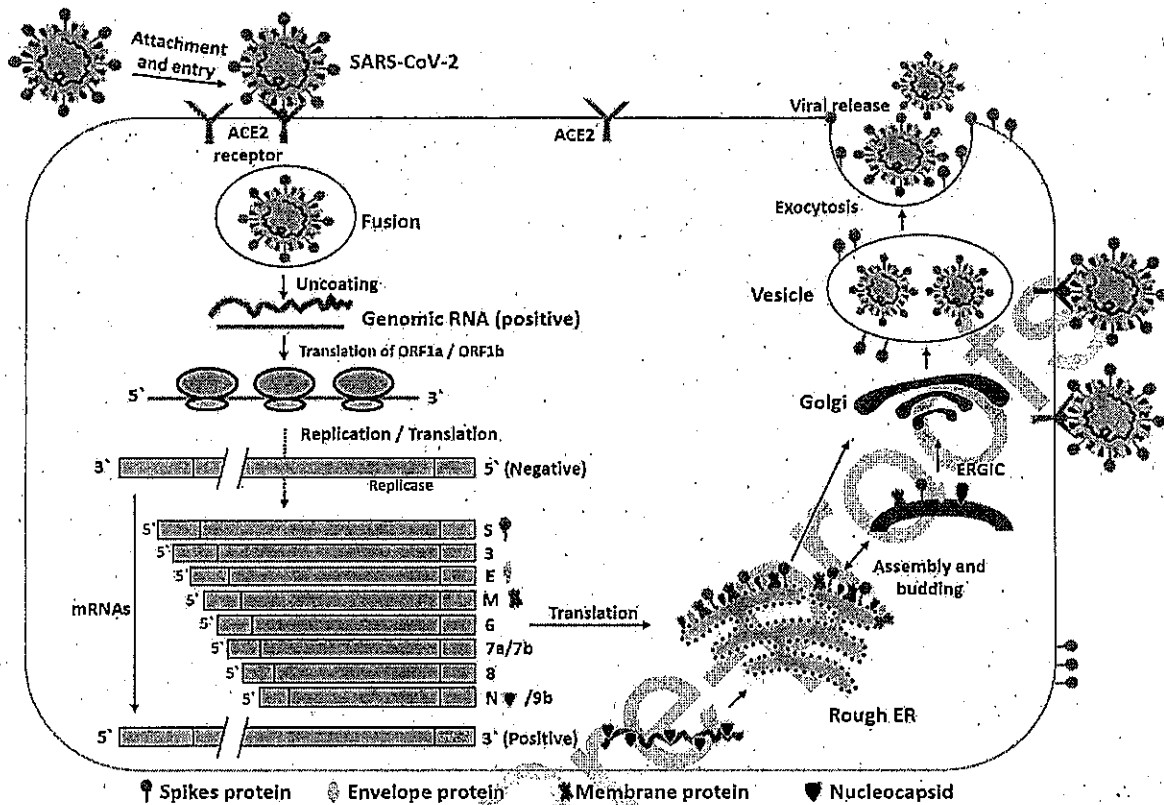


Figure 3: The life cycle of SARS-CoV-2 in host cells; begins its life cycle when S protein binds to the cellular receptor ACE2. After receptor binding, the conformation change in the S protein facilitates viral envelope fusion with the cell membrane through the endosomal pathway. Then SARS-CoV-2 releases RNA into the host cell. Genome RNA is translated into viral replicase polyproteins pp1a and 1ab, which are then cleaved into small products by viral proteinases. The polymerase produces a series of subgenomic mRNAs by discontinuous transcription and finally translated into relevant viral proteins. Viral proteins and genome RNA are subsequently assembled into virions in the ER and Golgi and then transported via vesicles and released out of the cell. ACE2, angiotensin-converting enzyme 2; ER, endoplasmic reticulum; ERGIC, ER-Golgi intermediate compartment.

Genomic variations in SARS-CoV-2

The genome of the SARS-CoV-2 has been reported over 80% identical to the previous human coronavirus (SARS-like bat CoV) (34). The Structural proteins are encoded by the four structural genes, including spike (S), envelope (E), membrane (M) and nucleocapsid (N) genes.

The *orf1ab* is the largest gene in SARS-CoV-2 which encodes the pp1ab protein and 15 nsps. The *orf1a* gene encodes for pp1a protein which also contains 10 nsps (34-36). According to the evolutionary tree, SARS-CoV-2 lies close to the group of SARS-coronaviruses (37, 38) (Fig. 5). Recent studies have indicated notable variations in SARS-CoV and SARS-CoV-2 such as the absence of 8a protein and fluctuation in the number of amino acids in 8b and 3c protein in SARS-CoV-2 (34) (Fig. 4). It is also reported that Spike glycoprotein of the Wuhan coronavirus is modified via homologous recombination. The spike glycoprotein of SARS-CoV-2 is the mixture of bat SARS-CoV and a not known Beta-CoV (38). In a fluorescent study, it was confirmed that the SARS-CoV-2 also uses the same ACE2 (angiotensin-converting enzyme 2) cell receptor and mechanism for the entry to host cell which is previously used by the SARS-CoV (39, 40). The single N501T mutation in SARS-CoV-2's Spike protein may have significantly enhanced its binding affinity for ACE2 (33).

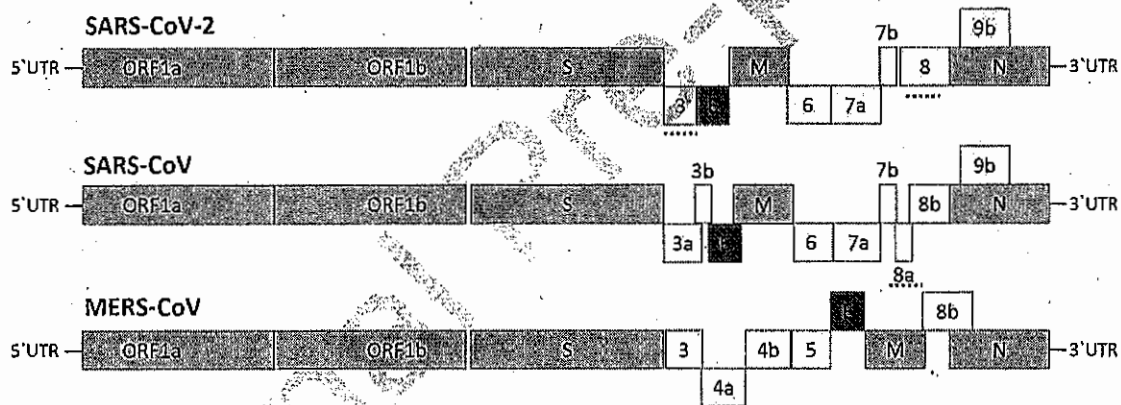


Figure 4: Betacoronaviruses genome organization; The Betacoronavirus for human (SARS-CoV-2, SARS-CoV and MERS-CoV) genome comprises of the 5'-untranslated region (5'-UTR), open reading frame (orf) 1a/b (green box) encoding non-structural proteins (nsp) for replication, structural proteins including spike (blue box), envelop (maroon box), membrane (pink box), and nucleocapsid (cyan box) proteins, accessory proteins (light gray boxes) such as orf 3, 6, 7a, 7b, 8 and 9b in the SARS-CoV-2 genome, and the 3'-untranslated region (3'-UTR). The dotted underlined in red are the protein which shows key variation between SARS-CoV-2 and SARS-CoV. The length of nsps and orfs are not drawn in scale.

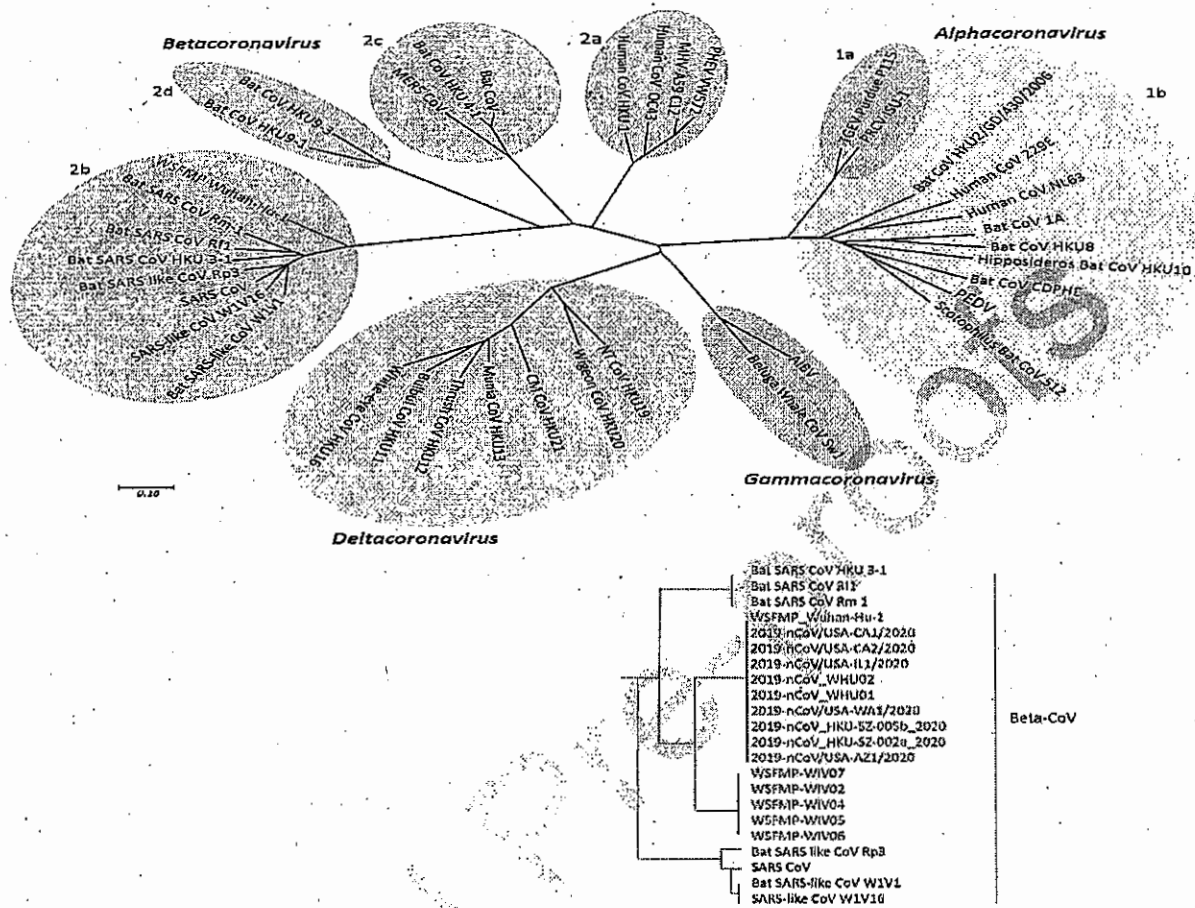


Figure 5: Phylogenetic tree of coronaviruses (content in red is the latest addition of newly emerged SARS-CoV-2 and WSFMP Wuhan-Hu-1 is used as a reference in the tree); The phylogenetic tree showing the relationship of Wuhan-Hu-1 (denoted as red) to selected coronavirus is based on nucleotide sequences of the complete genome. The viruses are grouped into four genera (prototype shown): Alphacoronavirus (sky blue), Betacoronavirus (pink), Gammacoronavirus (green) and Deltacoronavirus (light blue). Subgroup clusters are labeled as 1a and 1b for the Alphacoronavirus and 2a, 2b, 2c, and 2d for the Betacoronavirus. This tree is based on the published trees of Coronavirinae (3, 41) and reconstructed with sequences of the complete RNA- dependent RNA polymerase- coding region of the representative novel coronaviruses (maximum likelihood method using MEGA 7.2 software). severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS- CoV); SARS- related coronavirus (SARSr- CoV); the Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS- CoV); porcine enteric diarrhea virus (PEDV); Wuhan seafood market pneumonia (Wuhan-Hu-1). Bat CoV RaTG13 Showed high sequence identity to SARS-CoV-2 (42).

The major obstacle in research progress

Animal models play a vital role to uncover the mechanisms of viral pathogenicity from the entrance to the transmission and designing therapeutic strategies. Previously, to examine the replication of SARS-CoV, various animal models were used which showed the symptoms of severe infection (43). In contrast to SARS-CoV, no MERS-CoV pathogenesis was observed in small animals. Mice are not vulnerable to infection by MERS-coronavirus due to the non-compatibility of the DPP4 receptor (44). As the entire genome of the 2019-novel coronavirus is more than 80% similar to the previous human SARS-like bat CoV, previously used animal models for SARS-CoV can be utilized to study the infectious pathogenicity of SARS-CoV-2. The human ACE2 cell receptor is recognized by both SARS and Novel coronaviruses. Conclusively, TALEN or CRISPR-mediated genetically modified hamsters or other small animals can be utilized for the study of the pathogenicity of novel coronaviruses. SARS-CoV has been reported to replicate and cause severe disease in Rats (F344), where the sequence analysis revealed a mutation at spike glycoprotein (45). Thus, it could be another suitable option to develop spike glycoprotein targeting therapeutics against novel coronaviruses. Recently, mice models and clinical isolates were used to develop any therapeutic strategy against SARS-CoV-2 induced COVID-19 (46, 47). In a similar study, artificial intelligence prediction was used to investigate the inhibitory role of the drug against SARS-CoV-2 (48). SARS-CoV-2 infected patients were also used to conduct randomized clinical trials (46, 49, 50). It is now important that the scientists worldwide collaborate the design a suitable model and investigate the *in vivo* mechanisms associated with pathogenesis of SARS-CoV-2.

Potential therapeutic strategies against COVID-19

Initially, interferons- α nebulization, broad-spectrum antibiotics, and anti-viral drugs were used to reduce the viral load (49, 51, 52), however, only remdesivir has shown promising impact against the virus (53). Remdesivir only and in combination with chloroquine or interferon beta significantly blocked the SARS-CoV-2 replication and patients were declared as clinically recovered (46, 50, 52). Various other anti-virals are currently being evaluated against infection. Nafamostat, Nitazoxanide, Ribavirin, Penciclovir, Favipiravir, Ritonavir, AAK1, Baricitinib, and Arbidol exhibited moderate results when tested against infection in patients and *in-vitro* clinical isolates (46, 48, 50, 52). Several other combinations, such as combining the antiviral or antibiotics

with traditional Chinese medicines were also evaluated against SARS-CoV-2 induced infection in humans and mice (46). Recently in Shanghai, doctors isolated the blood plasma from clinically recovered patients of COVID-19 and injected it in the infected patients who showed positive results with rapid recovery (54). In a recent study, it was identified that monoclonal antibody (CR3022) binds with the spike RBD of SARS-CoV-2. This is likely due to the antibody's epitope not overlapping with the divergent ACE2 receptor-binding motif. CR3022 has the potential to be developed as a therapeutic candidate, alone or in combination with other neutralizing antibodies for the prevention and treatment of COVID-19 infection (55).

Vaccines for SARS-CoV-2

There is no available vaccine against COVID-19, while previous vaccines or strategies used to develop a vaccine against SARS-CoV can be effective. Recombinant protein from the Urbani (AY278741) strain of SARS-CoV was administered to mice and hamsters, resulted in the production of neutralizing antibodies and protection against SARS-CoV (56, 57). The DNA fragment, inactivated whole virus or live-vectored strain of SARS-CoV (AY278741), significantly reduced the viral infection in various animal models (58-63). Different other strains of SARS-CoV were also used to produce inactivated or live-vectored vaccines which efficiently reduced the viral load in animal models. These strains include, Tor2 (AY274119) (64, 65), Utah (AY714217) (66), FRA (AY310120) (59), HKU-39849 (AY278491) (57, 67), BJ01 (AY278488) (68, 69), NS1 (AY508724) (70), ZJ01 (AY297028) (70), GD01 (AY278489) (69) and GZ50 (AY304495) (71). However, there are few vaccines in the pipeline against SARS-CoV-2. The mRNA based vaccine prepared by the US National Institute of Allergy and Infectious Diseases against SARS-CoV-2 is under phase I trial (72). INO-4800-DNA based vaccine will be soon available for human testing (73). Chinese Centre for Disease Control and Prevention (CDC) working on the development of an inactivated virus vaccine (74, 75). Soon mRNA based vaccine's sample (prepared by Stemirna Therapeutics) will be available (76). GeoVax-BravoVax is working to develop a Modified Vaccina Ankara (MVA) based vaccine (77). While Clover Biopharmaceuticals is developing a recombinant 2019-nCoV S protein subunit-trimer based vaccine (78).

Although research teams all over the world are working to investigate the key features, pathogenesis and treatment options, it is deemed necessary to focus on competitive therapeutic options and cross-resistance of other vaccines. For instance, there is a possibility that vaccines for

other diseases such as rubella or measles can create cross-resistance for SARS-CoV-2. This statement of cross-resistance is based on the observations that children in China were found less vulnerable to infection as compared to the elder population, while children are being largely vaccinated for measles in China.

Conclusion and perspective

The novel coronavirus originated from the Hunan seafood market at Wuhan, China where bats, snakes, raccoon dogs, palm civets, and other animals are sold, and rapidly spread up to 109 countries. The zoonotic source of SARS-CoV-2 is not confirmed, however, sequence-based analysis suggested bats as the key reservoir. DNA recombination was found to be involved at spike glycoprotein which assorted SARS-CoV (CoVZXC21 or CoVZC45) with the RBD of another Beta CoV, thus could be the reason for cross-species transmission and rapid infection. According to phylogenetic trees, SARS-CoV is closer to SARS-like bat CoVs. Until now, no promising clinical treatments or prevention strategies have been developed against human coronaviruses. However, the researchers are working to develop efficient therapeutic strategies to cope with the novel coronaviruses. Various broad-spectrum antivirals previously used against influenza, SARS and MERS coronaviruses have been evaluated either alone or in combinations to treat COVID-19 patients, mice models, and clinical isolates. Remdesivir, Lopinavir, Ritonavir, and Oseltamivir significantly blocked the COVID-19 infection in infected patients. It can be concluded that the homologous recombination event at the S protein of RBD region enhanced the transmission ability of the virus. While the decision of bring back the nationals from infected area by various countries and poor screening of passengers, become the leading cause of spreading virus in others countries.

Most importantly, human coronaviruses targeting vaccines and antiviral drugs should be designed that could be used against the current as well as future epidemics. There are many companies working for the development of effective SARS-CoV-2 vaccines, such as Moderna Therapeutics, Inovio Pharmaceuticals, Novavax, Vir Biotechnology, Stermirna Therapeutics, Johnson & Johnson, VIDO-InterVac, GeoVax-BravoVax, Clover Biopharmaceuticals, CureVac, and Codagenix. But there is a need for rapid human and animal-based trails as these vaccines still require 3 to 10 months for commercialization. There must be a complete ban on utilizing wild animals and birds as a source of food. Beside the development of most efficient drug, a strategy to rapidly diagnose SARS-CoV-2 in suspected patient is also required. The signs and symptoms of

SARS-CoV-2 induced COVID-19 are a bit similar to influenza and seasonal allergies (pollen allergies). Person suffering from influenza or seasonal allergy may also exhibit temperature which can be detected by thermo-scanners, hence the person will become suspected. Therefore, an accurate and rapid diagnostic kit or meter for detection of SARS-CoV-2 in suspected patients is required, as the PCR based testing is expensive and time consuming. Different teams of Chinese doctors should immediately be sent to European and other countries, especially Spain and Italy to control the over spread of COVID-19, because Chinese doctors have efficiently controlled the outbreak in China and limited the mortality rate to less than 3% only. The therapeutic strategies used by Chinese, should also be followed by other countries.

Acknowledgments: The authors acknowledge the Postdoctoral grant from The Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University (for S.K).

Declaration: The authors of this manuscript declare no conflict of interest

References

1. Zhong N, Zheng B, Li Y, Poon L, Xie Z, Chan K, et al. Epidemiology and cause of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangdong, People's Republic of China, in February, 2003. *The Lancet*. 2003;362(9393):1353-8.
2. Wang N, Shi X, Jiang L, Zhang S, Wang D, Tong P, et al. Structure of MERS-CoV spike receptor-binding domain complexed with human receptor DPP4. *Cell Research*. 2013;23(8):986.
3. Cui J, Li F, Shi Z-L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nature reviews Microbiology*. 2019;17(3):181-92.
4. Lai C-C, Shih T-P, Ko W-C, Tang H-J, Hsueh P-R. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and corona virus disease-2019 (COVID-19): the epidemic and the challenges. *International journal of antimicrobial agents*. 2020:105924.
5. Organization WH. Laboratory testing for coronavirus disease 2019 (COVID-19) in suspected human cases: interim guidance, 2 March 2020. World Health Organization, 2020.
6. Peiris J, Guan Y, Yuen K. Severe acute respiratory syndrome. *Nature medicine*. 2004;10(12):S88-S97.

7. Pyrc K, Berkhout B, Van Der Hoek L. Identification of new human coronaviruses. *Expert review of anti-infective therapy*. 2007;5(2):245-53.
8. Rahman A, Sarkar A. Risk Factors for Fatal Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Infections in Saudi Arabia: Analysis of the WHO Line List, 2013–2018. *American journal of public health*. 2019;109(9):1288-93.
9. Memish ZA, Zumla AI, Al-Hakeem RF, Al-Rabeeh AA, Stephens GM. Family cluster of Middle East respiratory syndrome coronavirus infections. *New England Journal of Medicine*. 2013;368(26):2487-94.
10. Wang C, Horby PW, Hayden FG, Gao GF. A novel coronavirus outbreak of global health concern. *The Lancet*. 2020.
11. Phan LT, Nguyen TV, Luong QC, Nguyen TV, Nguyen HT, Le HQ, et al. Importation and human-to-human transmission of a novel coronavirus in Vietnam. *New England Journal of Medicine*. 2020.
12. Riou J, Althaus CL. Pattern of early human-to-human transmission of Wuhan 2019 novel coronavirus (2019-nCoV), December 2019 to January 2020. *Eurosurveillance*. 2020;25(4).
13. Parry J. China coronavirus: cases surge as official admits human to human transmission. *British Medical Journal Publishing Group*; 2020.
14. Li Q, Guan X, Wu P, Wang X, Zhou L, Tong Y, et al. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus-infected pneumonia. *New England Journal of Medicine*. 2020.
15. Kan B, Wang M, Jing H, Xu H, Jiang X, Yan M, et al. Molecular evolution analysis and geographic investigation of severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in palm civets at an animal market and on farms. *Journal of virology*. 2005;79(18):11892-900.
16. Zheng BJ, Guan Y, Wong KH, Zhou J, Wong KL, Young BWY, et al. SARS-related virus predating SARS outbreak, Hong Kong. *Emerging infectious diseases*. 2004;10(2):176.
17. Shi Z, Hu Z. A review of studies on animal reservoirs of the SARS coronavirus. *Virus research*. 2008;133(1):74-87.
18. Paden C, Yusof M, Al Hammadi Z, Queen K, Tao Y, Eltahir Y, et al. Zoonotic origin and transmission of Middle East respiratory syndrome coronavirus in the UAE. *Zoonoses and public health*. 2018;65(3):322-33.

19. Annan A, Baldwin HJ, Corman VM, Klose SM, Owusu M, Nkrumah EE, et al. Human betacoronavirus 2c EMC/2012-related viruses in bats, Ghana and Europe. *Emerging infectious diseases*. 2013;19(3):456.
20. Huynh J, Li S, Yount B, Smith A, Sturges L, Olsen JC, et al. Evidence supporting a zoonotic origin of human coronavirus strain NL63. *Journal of virology*. 2012;86(23):12816-25.
21. Lau SK, Li KS, Tsang AK, Lam CS, Ahmed S, Chen H, et al. Genetic characterization of Betacoronavirus lineage C viruses in bats reveals marked sequence divergence in the spike protein of pipistrellus bat coronavirus HKU5 in Japanese pipistrelle: implications for the origin of the novel Middle East respiratory syndrome coronavirus. *Journal of virology*. 2013;87(15):8638-50.
22. Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet*. 2020.
23. Chan JF-W, Yuan S, Kok K-H, To KK-W, Chu H, Yang J, et al. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. *The Lancet*. 2020.
24. Chan JF-W, Kok K-H, Zhu Z, Chu H, To KK-W, Yuan S, et al. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerging Microbes & Infections*. 2020;9(1):221-36.
25. van Boheemen S, de Graaf M, Lauber C, Bestebroer TM, Raj VS, Zaki AM, et al. Genomic characterization of a newly discovered coronavirus associated with acute respiratory distress syndrome in humans. *MBio*. 2012;3(6):e00473-12.
26. Raj VS, Mou H, Smits SL, Dekkers DH, Müller MA, Dijkman R, et al. Dipeptidyl peptidase 4 is a functional receptor for the emerging human coronavirus-EMC. *Nature*. 2013;495(7440):251-4.
27. Perlman S, Netland J. Coronaviruses post-SARS: update on replication and pathogenesis. *Nature reviews Microbiology*. 2009;7(6):439-50.
28. Glowacka I, Bertram S, Müller MA, Allen P, Soilleux E, Pfefferle S, et al. Evidence that TMPRSS2 activates the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein for membrane fusion and reduces viral control by the humoral immune response. *Journal of virology*. 2011;85(9):4122-34.

29. Bertram S, Glowacka I, Müller MA, Lavender H, Gnirss K, Nehlmeier I, et al. Cleavage and activation of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein by human airway trypsin-like protease. *Journal of virology*. 2011;85(24):13363-72.
30. Wu F, Zhao S, Yu B, Chen Y-M, Wang W, Song Z-G, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*. 2020:1-5.
31. Zhou P, Yang X, Wang X, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* [Internet]. 2020 Feb 3.
32. Xu X, Chen P, Wang J, Feng J, Zhou H, Li X, et al. Evolution of the novel coronavirus from the ongoing Wuhan outbreak and modeling of its spike protein for risk of human transmission. *Science China Life Sciences*. 2020;63(3):457-60.
33. Wan Y, Shang J, Graham R, Baric RS, Li F. Receptor recognition by novel coronavirus from Wuhan: An analysis based on decade-long structural studies of SARS. *Journal of virology*. 2020.
34. Wu A, Peng Y, Huang B, Ding X, Wang X, Niu P, et al. Genome composition and divergence of the novel coronavirus (2019-nCoV) originating in China. *Cell Host & Microbe*. 2020.
35. Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet*. 2020;395(10224):565-74.
36. Chen Y, Liu Q, Guo D. Emerging coronaviruses: genome structure, replication, and pathogenesis. *Journal of Medical Virology*. 2020.
37. Hui DS, I Azhar E, Madani TA, Ntoumi F, Kock R, Dar O, et al. The continuing 2019-nCoV epidemic threat of novel coronaviruses to global health—The latest 2019 novel coronavirus outbreak in Wuhan, China. *International Journal of Infectious Diseases*. 2020;91:264-6.
38. Li B, Si H-R, Zhu Y, Yang X-L, Anderson DE, Shi Z-L, et al. Discovery of Bat Coronaviruses through Surveillance and Probe Capture-Based Next-Generation Sequencing. *mSphere*. 2020;5(1).
39. Graisinski LE, Menachery VD. Return of the Coronavirus: 2019-nCoV. *Viruses*. 2020;12(2):135.

40. Xu X, Chen P, Wang J, Feng J, Zhou H, Li X, et al. Evolution of the novel coronavirus from the ongoing Wuhan outbreak and modeling of its spike protein for risk of human transmission. *Science China Life Sciences*. 2020:1-4.
41. Corman VM, Ithete NL, Richards LR, Schoeman MC, Preiser W, Drosten C, et al. Rooting the phylogenetic tree of middle East respiratory syndrome coronavirus by characterization of a conspecific virus from an African bat. *Journal of virology*. 2014;88(19):11297-303.
42. Zhou P, Yang X-L, Wang X-G, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. Discovery of a novel coronavirus associated with the recent pneumonia outbreak in humans and its potential bat origin. *bioRxiv*. 2020.
43. Gretebeck LM, Subbarao K. Animal models for SARS and MERS coronaviruses. *Current opinion in virology*. 2015;13:123-9.
44. Cockrell AS, Peck KM, Yount BL, Agnihothram SS, Scobey T, Curnes NR, et al. Mouse dipeptidyl peptidase 4 is not a functional receptor for Middle East respiratory syndrome coronavirus infection. *Journal of virology*. 2014;88(9):5195-9.
45. Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Fukushi S, Yokoyama M, Harashima A, et al. Participation of both host and virus factors in induction of severe acute respiratory syndrome (SARS) in F344 rats infected with SARS coronavirus. *Journal of virology*. 2007;81(4):1848-57.
46. Sheahan TP, Sims AC, Leist SR, Schäfer A, Won J, Brown AJ, et al. Comparative therapeutic efficacy of remdesivir and combination lopinavir, ritonavir, and interferon beta against MERS-CoV. *Nature communications*. 2020;11(1):1-14.
47. Wang Z, Chen X, Lu Y, Chen F, Zhang W. Clinical characteristics and therapeutic procedure for four cases with 2019 novel coronavirus pneumonia receiving combined Chinese and Western medicine treatment. *BioScience Trends*. 2020.
48. Richardson P, Griffin I, Tucker C, Smith D, Oechsle O, Phelan A, et al. Baricitinib as potential treatment for 2019-nCoV acute respiratory disease. *The Lancet*. 2020.
49. Ng CS, Kasumba DM, Fujita T, Luo H. Spatio-temporal characterization of the antiviral activity of the XRN1-DCP1/2 aggregation against cytoplasmic RNA viruses to prevent cell death. *Cell Death & Differentiation*. 2020:1-20.
50. Holshue ML, DeBolt C, Lindquist S, Lofy KH, Wiesman J, Bruce H, et al. First case of 2019 novel coronavirus in the United States. *New England Journal of Medicine*. 2020.

51. Wang BX, Fish EN, editors. Global virus outbreaks: Interferons as 1st responders. Seminars in immunology; 2019: Elsevier.
52. Wang M, Cao R, Zhang L, Yang X, Liu J, Xu M, et al. Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro. Cell Research. 2020:1-3.
53. Agostini ML, Andres EL, Sims AC, Graham RL, Sheahan TP, Lu X, et al. Coronavirus susceptibility to the antiviral remdesivir (GS-5734) is mediated by the viral polymerase and the proofreading exoribonuclease. MBio. 2018;9(2):e00221-18.
54. Derebail VK, Falk RJ. ANCA-Associated Vasculitis—Refining Therapy with Plasma Exchange and Glucocorticoids. Mass Medical Soc; 2020.
55. Tian X, Li C, Huang A, Xia S, Lu S, Shi Z, et al. Potent binding of 2019 novel coronavirus spike protein by a SARS coronavirus-specific human monoclonal antibody. bioRxiv. 2020.
56. Bisht H, Roberts A, Vogel L, Subbarao K, Moss B. Neutralizing antibody and protective immunity to SARS coronavirus infection of mice induced by a soluble recombinant polypeptide containing an N-terminal segment of the spike glycoprotein. Virology. 2005;334(2):160-5.
57. Kam YW, Kien F, Roberts A, Cheung YC, Lamirande EW, Vogel L, et al. Antibodies against trimeric S glycoprotein protect hamsters against SARS-CoV challenge despite their capacity to mediate FcγRII-dependent entry into B cells in vitro. Vaccine. 2007;25(4):729-40.
58. Yang Z-y, Kong W-p, Huang Y, Roberts A, Murphy BR, Subbarao K, et al. A DNA vaccine induces SARS coronavirus neutralization and protective immunity in mice. Nature. 2004;428(6982):561-4.
59. Stadler K, Roberts A, Becker S, Vogel L, Eickmann M, Kolesnikova L, et al. SARS vaccine protective in mice. Emerging infectious diseases. 2005;11(8):1312.
60. Kapadia SU, Rose JK, Lamirande E, Vogel L, Subbarao K, Roberts A. Long-term protection from SARS coronavirus infection conferred by a single immunization with an attenuated VSV-based vaccine. Virology. 2005;340(2):174-82.
61. Bisht H, Roberts A, Vogel L, Bukreyev A, Collins PL, Murphy BR, et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein expressed by attenuated vaccinia virus protectively immunizes mice. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2004;101(17):6641-6.

62. Buchholz UJ, Bukreyev A, Yang L, Lamirande EW, Murphy BR, Subbarao K, et al. Contributions of the structural proteins of severe acute respiratory syndrome coronavirus to protective immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004;101(26):9804-9.
63. Bukreyev A, Lamirande EW, Buchholz UJ, Vogel LN, Elkins WR, St Claire M, et al. Mucosal immunisation of African green monkeys (*Cercopithecus aethiops*) with an attenuated parainfluenza virus expressing the SARS coronavirus spike protein for the prevention of SARS. *The Lancet*. 2004;363(9427):2122-7.
64. See RH, Zakhartchouk AN, Petric M, Lawrence DJ, Mok CP, Hogan RJ, et al. Comparative evaluation of two severe acute respiratory syndrome (SARS) vaccine candidates in mice challenged with SARS coronavirus. *Journal of General Virology*. 2006;87(3):641-50.
65. Weingartl H, Czub M, Czub S, Neufeld J, Marszal P, Gren J, et al. Immunization with modified vaccinia virus Ankara-based recombinant vaccine against severe acute respiratory syndrome is associated with enhanced hepatitis in ferrets. *Journal of virology*. 2004;78(22):12672-6.
66. Spruth M, Kistner O, Savidis-Dacho H, Hitter E, Crowe B, Gerencer M, et al. A double-inactivated whole virus candidate SARS coronavirus vaccine stimulates neutralising and protective antibody responses. *Vaccine*. 2006;24(5):652-61.
67. Takasuka N, Fujii H, Takahashi Y, Kasai M, Morikawa S, Itamura S, et al. A subcutaneously injected UV-inactivated SARS coronavirus vaccine elicits systemic humoral immunity in mice. *International immunology*. 2004;16(10):1423-30.
68. Tang L, Zhu Q, Qin E, Yu M, Ding Z, Shi H, et al. Inactivated SARS-CoV vaccine prepared from whole virus induces a high level of neutralizing antibodies in BALB/c mice. *DNA and cell biology*. 2004;23(6):391-4.
69. Qin E, Shi H, Tang L, Wang C, Chang G, Ding Z, et al. Immunogenicity and protective efficacy in monkeys of purified inactivated Vero-cell SARS vaccine. *Vaccine*. 2006;24(7):1028-34.
70. Zhou J, Wang W, Zhong Q, Hou W, Yang Z, Xiao S-Y, et al. Immunogenicity, safety, and protective efficacy of an inactivated SARS-associated coronavirus vaccine in rhesus monkeys. *Vaccine*. 2005;23(24):3202-9.

71. Qu D, Zheng B, Yao X, Guan Y, Yuan Z-H, Zhong N-S, et al. Intranasal immunization with inactivated SARS-CoV (SARS-associated coronavirus) induced local and serum antibodies in mice. *Vaccine*. 2005;23(7):924-31.
72. McKay BLP. Drugmakers rush to develop vaccines against china virus the wall street journal. [cited 2020 28 January]; Available from: <https://www.wsj.com/articles/drugmakers-rush-to-develop-vaccines-against-china-virus-11579813026>
73. Inovio IP. Inovio selected by cepi to develop vaccine against new coronavirus inovio. [cited 2020 29 January]; Available from: <http://ir.inovio.com/news-and-media/news/press-release-details/2020/Inovio-Selectedby-CEPI-to-Develop-Vaccine-Against-NewCoronavirus/default.aspx>.
74. J.-H.Z.W. Lee LZ. Chinese scientists race to develop vaccine as coronavirus death toll jumps: South china morning post. [cited 2020 29 January]; Available from: <https://www.scmp.com/news/china/society/article/3047676/numbercoronavirus-cases-china-doubles-spread-rate-accelerates>.
75. Cheung E. China coronavirus: Hong kong researchers have already developed vaccine but need time to test it, expert reveals: South china morning post. [cited 2020 29 January]; Available from: <https://www.scmp.com/news/hongkong/health-environment/article/3047956/china-coronavirus-hong-kong-researchers-have>.
76. Xinhua. China fast-tracks novel coronavirus vaccine development xinhua. [cited 202 29 January]; Available from: http://www.xinhuanet.com/english/2020-01/28/c_138739378.htm.
77. Geo-Vax. Geovax and bravovax (wuhan, china) to collaborate on development of coronavirus vaccine. [cited 2020 3 March]; Available from: <https://www.geovax.com/news/geovax-and-bravovax-wuhan-china-to-collaborate-ondevelopment-of-coronavirus-vaccine>.
78. Clover B. Clover initiates development of recombinant subunit- trimer vaccine for wuhan coronavirus (2019-ncov). [cited 2020 6 March]; Available from: <http://www.cloverbiopharma.com/index.php?m=content&c=index&a=show&catid=11&id=40>.
79. Huang Y. The SARS epidemic and its aftermath in China: a political perspective. *Learning from SARS: Preparing for the next disease outbreak*. 2004:116-36.
80. Holmes KV. SARS coronavirus: a new challenge for prevention and therapy. *The Journal of clinical investigation*. 2003;111(11):1605-9.

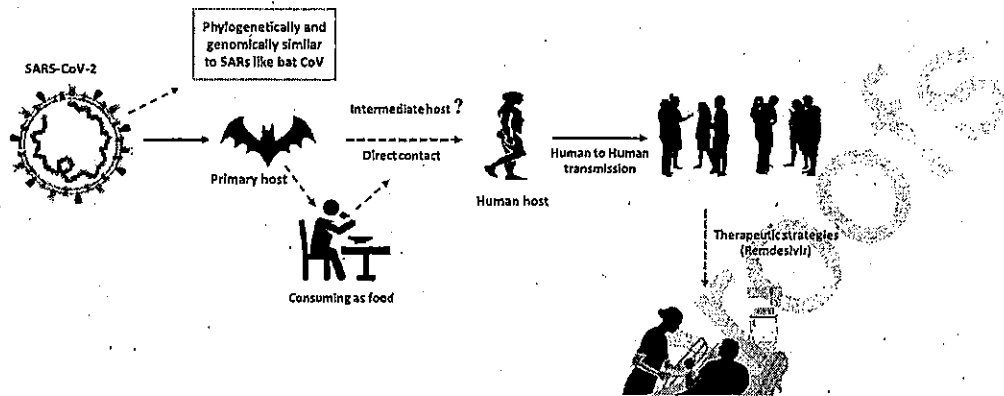
81. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*. 2020.
82. Perlman S. Another decade, another coronavirus. *Mass Medical Soc*; 2020.
83. Bolles M, Donaldson E, Baric R. SARS-CoV and emergent coronaviruses: viral determinants of interspecies transmission. *Current opinion in virology*. 2011;1(6):624-34.
84. Vara V. Coronavirus outbreak: The countries affected. 11 MARCH 2020; Available from: <https://www.pharmaceutical-technology.com/features/coronavirus-outbreak-the-countries-affected/>.
85. Shi Y, Yi Y, Li P, Kuang T, Li L, Dong M, et al. Diagnosis of severe acute respiratory syndrome (SARS) by detection of SARS coronavirus nucleocapsid antibodies in an antigen-capturing enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of clinical microbiology*. 2003;41(12):5781-2.
86. Dong N, Yang X, Ye L, Chen K, Chan EW-C, Yang M, et al. Genomic and protein structure modelling analysis depicts the origin and infectivity of 2019-nCoV, a new coronavirus which caused a pneumonia outbreak in Wuhan, China. *bioRxiv*. 2020.

Table 1: Comparative analysis of biological features of SARS-CoV and SARS-CoV-2

Features	SARS-CoV	SARS-CoV-2	Reference
Emergence date	November, 2002	December, 2019	
Area of emergence	Guangdong, China	Wuhan, China	(37, 79-
Date of fully controlled	July, 2003	Not controlled yet	81)
Key hosts	Bat, palm civets and Raccoon dogs	Bat	(22, 82, 83)
Number of countries infected	26	109	(84)
Entry receptor in humans	ACE2 receptor	ACE2 receptor	(22, 55, 85)

Sign and symptoms	fever, malaise, myalgia, headache, diarrhoea, shivering, cough and shortness of breath	Cough, fever and shortness of breath	(12, 23, 85)
Disease caused	SARS, ARDS	SARS, COVID-19	(85, 86)
Total infected patients	8098	123882	
Total recovered patients	7322	67051	(84)
Total died patients	776 (9.6% mortality rate)	4473 (3.61% mortality rate)	

Graphical abstract



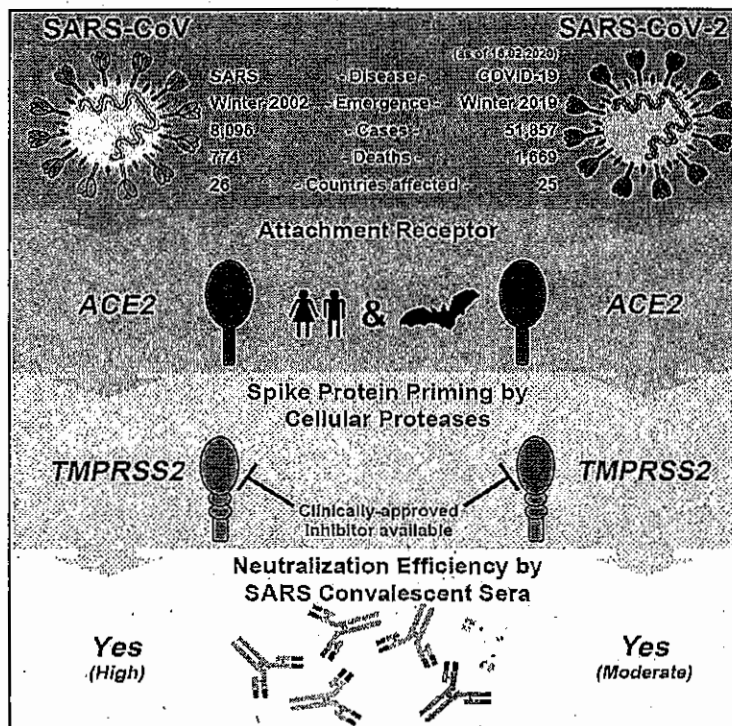
Authors Biography

1. Muhammad Adnan Shereen is a PhD researcher at Wuhan University, working on Zika virus and coronavirus in the aspects of pathogenesis, drug screening and molecular mechanisms. He is an author in 8 articles published in journals with impact factor more than 5 including the recently accepted paper in Nature microbiology.
2. Suliman Khan has completed his PhD degree from Chinese Academy of Sciences and currently working at second affiliated hospital of Zhengzhou university as postdoctoral scientist. He has published more than 25 articles and 5 on SARS-CoV-2 in well reputed journals including Clinical microbiology and infection (CMI) and Journal of clinical microbiology (ASM-JCM) as first and corresponding author.
3. Abeer Kazmi is a PhD student at Wuhan University.
4. Nadia Bashir is a PhD student at Wuhan University working on coronaviruses. She is an author in more than 5 papers published or accepted in renowned journals.
5. Rabeea Siddique is a PhD student at Zhengzhou university. She has published more than 10 papers in well reputed journals as first or coauthor.

Cell

SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor

Graphical Abstract



Authors

Markus Hoffmann, Hannah Kleine-Weber, Simon Schroeder, ..., Marcel A. Müller, Christian Drosten, Stefan Pöhlmann

Correspondence

mhoffmann@dpz.eu (M.H.),
spoehlmann@dpz.eu (S.P.)

In Brief

The emerging SARS-coronavirus 2 (SARS-CoV-2) threatens public health. Hoffmann and coworkers show that SARS-CoV-2 infection depends on the host cell factors ACE2 and TMPRSS2 and can be blocked by a clinically proven protease inhibitor. These findings might help to establish options for prevention and treatment.

Highlights

- SARS-CoV-2 uses the SARS-CoV receptor ACE2 for host cell entry
- The spike protein of SARS-CoV-2 is primed by TMPRSS2
- Antibodies against SARS-CoV spike may offer some protection against SARS-CoV-2

Article

SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor

Markus Hoffmann,^{1,13,*} Hannah Kleine-Weber,^{1,2,13} Simon Schroeder,^{3,4} Nadine Krüger,^{5,6} Tanja Herrler,⁷ Sandra Erichsen,^{8,9} Tobias S. Schiergens,¹⁰ Georg Herrler,⁵ Nai-Huei Wu,⁵ Andreas Nitsche,¹¹ Marcel A. Müller,^{3,4,12} Christian Drosten,^{3,4} and Stefan Pöhlmann^{1,2,14,*}

¹Infection Biology Unit, German Primate Center – Leibniz Institute for Primate Research, Göttingen, Germany

²Faculty of Biology and Psychology, University Göttingen, Göttingen, Germany

³Charité-Universitätsmedizin Berlin, corporate member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin, and Berlin Institute of Health, Institute of Virology, Berlin, Germany

⁴German Centre for Infection Research, associated partner Charité, Berlin, Germany

⁵Institute of Virology, University of Veterinary Medicine Hannover, Hannover, Germany

⁶Research Center for Emerging Infections and Zoonoses, University of Veterinary Medicine Hannover, Hannover, Germany

⁷BG Unfallklinik Murnau, Murnau, Germany

⁸Institute for Biomechanics, BG Unfallklinik Murnau, Murnau, Germany

⁹Institute for Biomechanics, Paracelsus Medical University Salzburg, Salzburg, Austria

¹⁰Biobank of the Department of General, Visceral, and Transplant Surgery, Ludwig-Maximilians-University Munich, Munich, Germany

¹¹Robert Koch Institute, ZBS 1 Highly Pathogenic Viruses, WHO Collaborating Centre for Emerging Infections and Biological Threats, Berlin, Germany

¹²Martinsonsky Institute of Medical Parasitology, Tropical and Vector Borne Diseases, Sechenov University, Moscow, Russia

¹³These authors contributed equally

¹⁴Lead Contact

*Correspondence: mhoffmann@dpz.eu (M.H.), spoehmann@dpz.eu (S.P.)

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052>

SUMMARY

The recent emergence of the novel, pathogenic SARS-coronavirus 2 (SARS-CoV-2) in China and its rapid national and international spread pose a global health emergency. Cell entry of coronaviruses depends on binding of the viral spike (S) proteins to cellular receptors and on S protein priming by host cell proteases. Unravelling which cellular factors are used by SARS-CoV-2 for entry might provide insights into viral transmission and reveal therapeutic targets. Here, we demonstrate that SARS-CoV-2 uses the SARS-CoV receptor ACE2 for entry and the serine protease TMPRSS2 for S protein priming. A TMPRSS2 inhibitor approved for clinical use blocked entry and might constitute a treatment option. Finally, we show that the sera from convalescent SARS patients cross-neutralized SARS-2-S-driven entry. Our results reveal important commonalities between SARS-CoV-2 and SARS-CoV infection and identify a potential target for antiviral intervention.

INTRODUCTION

Several members of the family *Coronaviridae* constantly circulate in the human population and usually cause mild respiratory

disease (Corman et al., 2019). In contrast, the severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) and the Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) are transmitted from animals to humans and cause severe respiratory diseases in afflicted individuals, SARS and MERS, respectively (Fehr et al., 2017). SARS emerged in 2002 in Guangdong province, China, and its subsequent global spread was associated with 8,096 cases and 774 deaths (de Wit et al., 2016; WHO, 2004). Chinese horseshoe bats serve as natural reservoir hosts for SARS-CoV (Lau et al., 2005; Li et al., 2005a). Human transmission was facilitated by intermediate hosts like civet cats and raccoon dogs, which are frequently sold as food sources in Chinese wet markets (Guan et al., 2003). At present, no specific antivirals or approved vaccines are available to combat SARS, and the SARS pandemic in 2002 and 2003 was finally stopped by conventional control measures, including travel restrictions and patient isolation.

In December 2019, a new infectious respiratory disease emerged in Wuhan, Hubei province, China (Huang et al., 2020; Wang et al., 2020; Zhu et al., 2020). An initial cluster of infections was linked to Huanan seafood market, potentially due to animal contact. Subsequently, human-to-human transmission occurred (Chan et al., 2020) and the disease, now termed coronavirus disease 19 (COVID-19) rapidly spread within China. A novel coronavirus, SARS-coronavirus 2 (SARS-CoV-2), which is closely related to SARS-CoV, was detected in patients and is believed to be the etiologic agent of the new lung disease (Zhu et al., 2020). On February 12, 2020, a total of 44,730 laboratory-confirmed infections were reported in China, including 8,204

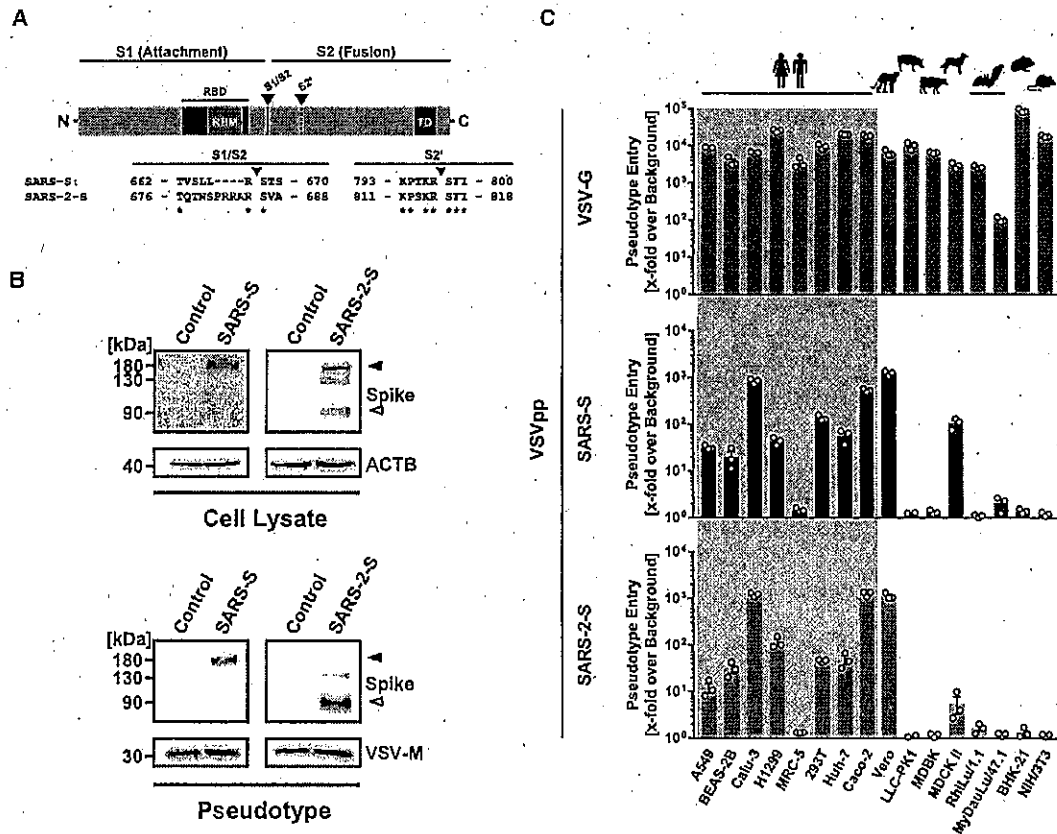


Figure 1. SARS-2-S and SARS-S Facilitate Entry into a Similar Panel of Mammalian Cell Lines

(A) Schematic illustration of SARS-S including functional domains (RBD, receptor binding domain; RBM, receptor binding motif; TD, transmembrane domain) and proteolytic cleavage sites (S1/S2, S2'). Amino acid sequences around the two protease recognition sites (red) are indicated for SARS-S and SARS-2-S (asterisks indicate conserved residues). Arrow heads indicate the cleavage site.

(B) Analysis of SARS-2-S expression (upper panel) and pseudotype incorporation (lower panel) by western blot using an antibody directed against the C-terminal hemagglutinin (HA) tag added to the viral S proteins analyzed. Shown are representative blots from three experiments. β -Actin (cell lysates) and VSV-M (particles) served as loading controls (M, matrix protein). Black arrow heads indicate bands corresponding to uncleaved S proteins (S₀) whereas gray arrow heads indicate bands corresponding to the S₂ subunit.

(C) Cell lines of human and animal origin were inoculated with pseudotyped VSV harboring VSV-G, SARS-S, or SARS-2-S. At 16 h postinoculation, pseudotype entry was analyzed by determining luciferase activity in cell lysates. Signals obtained for particles bearing no envelope protein were used for normalization. The average of three independent experiments is shown. Error bars indicate SEM. Unprocessed data from a single experiment are presented in Figure S1.

severe cases and 1,114 deaths (WHO, 2020). Infections were also detected in 24 countries outside China and were associated with international travel. At present, it is unknown whether the sequence similarities between SARS-CoV-2 and SARS-CoV translate into similar biological properties, including pandemic potential (Munster et al., 2020).

The spike (S) protein of coronaviruses facilitates viral entry into target cells. Entry depends on binding of the surface unit, S1, of the S protein to a cellular receptor, which facilitates viral attachment to the surface of target cells. In addition, entry requires S protein priming by cellular proteases, which entails S protein cleavage at the S1/S2 and the S2' site and allows fusion of viral and cellular membranes, a process driven by the S2 subunit (Figure 1A). SARS-S engages angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) as the entry receptor (Li et al., 2003) and employs the

cellular serine protease TMPRSS2 for S protein priming (Glowacka et al., 2011; Matsuyama et al., 2010; Shulla et al., 2011). The SARS-S/ACE2 interface has been elucidated at the atomic level, and the efficiency of ACE2 usage was found to be a key determinant of SARS-CoV transmissibility (Li et al., 2005a, 2005b). SARS-S and SARS-2-S share ~76% amino acid identity. However, it is unknown whether SARS-2-S like SARS-S employs ACE2 and TMPRSS2 for host cell entry.

RESULTS

Evidence for Efficient Proteolytic Processing of SARS-2-S

The goal of our study was to obtain insights into how SARS-2-S facilitates viral entry into target cells and how this process can be

blocked. For this, we first asked whether SARS-2-S is robustly expressed in a human cell line, 293T, commonly used for experimentation because of its high transfectability. Moreover, we analyzed whether there is evidence for proteolytic processing of the S protein because certain coronavirus S proteins are cleaved by host cell proteases at the S1/S2 cleavage site in infected cells (Figure 1A). Immunoblot analysis of 293T cells expressing SARS-2-S protein with a C-terminal antigenic tag revealed a band with a molecular weight expected for unprocessed S protein (S0) (Figure 1B). A band with a size expected for the S2 subunit of the S protein was also observed in cells and, more prominently, in vesicular stomatitis virus (VSV) particles bearing SARS-2-S (Figure 1B). In contrast, an S2 signal was largely absent in cells and particles expressing SARS-S (Figure 1B), as previously documented (Glowacka et al., 2011; Hoffmann et al., 2004b). These results suggest efficient proteolytic processing of SARS-2-S in human cells, in keeping with the presence of several arginine residues at the S1/S2 cleavage site of SARS-2-S but not SARS-S (Figure 1A). In contrast, the S2' cleavage site of SARS-2-S was similar to that of SARS-S.

SARS-2-S and SARS-S Mediate Entry into a Similar Spectrum of Cell Lines

Replication-defective VSV particles bearing coronavirus S proteins faithfully reflect key aspects of coronavirus host cell entry (Kleine-Weber et al., 2019). We employed VSV pseudotypes bearing SARS-2-S to study cell entry of SARS-CoV-2. Both SARS-2-S and SARS-S were robustly incorporated into VSV particles (Figure 1B), allowing a meaningful side-by-side comparison; although, formally, comparable particle incorporation of the S1 subunit remains to be demonstrated. We first asked which cell lines were susceptible to SARS-2-S-driven entry, using a panel of well-characterized cell lines of human and animal origin, respectively. All cell lines were readily susceptible to entry driven by the glycoprotein of the pantropic VSV (VSV-G) (Figure 1C; Figure S1), as expected. Most human cell lines and the animal cell lines Vero and MDCKII were also susceptible to entry driven by SARS-S (Figure 1C). Moreover, SARS-2-S facilitated entry into an identical spectrum of cell lines as SARS-S (Figure 1C), suggesting similarities in choice of entry receptors.

SARS-CoV-2 Employs the SARS-CoV Receptor for Host Cell Entry

In order to elucidate why SARS-S and SARS-2-S mediated entry into the same cell lines, we next determined whether SARS-2-S harbors amino acid residues required for interaction with the SARS-S entry receptor ACE2. Sequence analysis revealed that SARS-CoV-2 clusters with SARS-CoV-related viruses from bats (SARSr-CoV), of which some but not all can use ACE2 for host cell entry (Figure 2A; Figure S2). Analysis of the receptor binding motif (RBM), a portion of the receptor binding domain (RBD) that makes contact with ACE2 (Li et al., 2005a), revealed that most amino acid residues essential for ACE2 binding by SARS-S were conserved in SARS-2-S (Figure 2B). In contrast, most of these residues were absent from S proteins of SARS-CoV previously found not to use ACE2 for entry (Figure 2B) (Ge et al., 2013; Hoffmann et al., 2013; Menachery et al., 2020). In agreement with these findings, directed expression of human

and bat (*Rhinolophus alcyone*) ACE2 but not human DPP4, the entry receptor used by MERS-CoV (Raj et al., 2013), or human APN, the entry receptor used by HCoV-229E (Yeager et al., 1992), allowed SARS-2-S- and SARS-S-driven entry into otherwise non-susceptible BHK-21 cells (Figure 3A). Moreover, antiserum raised against human ACE2 blocked SARS-S- and SARS-2-S- but not VSV-G- or MERS-S-driven entry (Figure 3B). Finally, authentic SARS-CoV-2 infected BHK-21 cells transfected to express ACE2 cells but not parental BHK-21 cells with high efficiency (Figure 3C), indicating that SARS-2-S, like SARS-S, uses ACE2 for cellular entry.

The Cellular Serine Protease TMPRSS2 Primes SARS-2-S for Entry, and a Serine Protease Inhibitor Blocks SARS-CoV-2 Infection of Lung Cells

We next investigated protease dependence of SARS-CoV-2 entry. SARS-CoV can use the endosomal cysteine proteases cathepsin B and L (CatB/L) (Simmons et al., 2005) and the serine protease TMPRSS2 (Glowacka et al., 2011; Matsuyama et al., 2010; Shulla et al., 2011) for S protein priming in cell lines, and inhibition of both proteases is required for robust blockade of viral entry (Kawase et al., 2012). However, only TMPRSS2 activity is essential for viral spread and pathogenesis in the infected host whereas CatB/L activity is dispensable (Iwata-Yoshikawa et al., 2019; Shirato et al., 2016; Shirato et al., 2018; Zhou et al., 2015).

In order to determine whether SARS-CoV-2 can use CatB/L for cell entry, we initially employed ammonium chloride, which elevates endosomal pH and thereby blocks CatB/L activity. 293T cells (TMPRSS2⁻, transfected to express ACE2 for robust S protein-driven entry) and Caco-2 cells (TMPRSS2⁺) were used as targets. Ammonium chloride blocked VSV-G-dependent entry into both cell lines whereas entry driven by Nipah virus F and G proteins was not affected (Figure S3A; data not shown), consistent with Nipah virus but not VSV being able to fuse directly with the plasma membrane (Bossart et al., 2002). Ammonium chloride treatment strongly inhibited SARS-2-S- and SARS-S-driven entry into TMPRSS2⁻ 293T cells (Figure S3 A), suggesting CatB/L dependence. Inhibition of entry into TMPRSS2⁺ Caco-2 cells was less efficient compared to 293T cells (Figure S3 A), which would be compatible with SARS-2-S priming by TMPRSS2 in Caco-2 cells. Indeed, the clinically proven serine protease inhibitor camostat mesylate, which is active against TMPRSS2 (Kawase et al., 2012), partially blocked SARS-2-S-driven entry into Caco-2 (Figure S3 B) and Vero-TMPRSS2 cells (Figure 4A). Full inhibition was attained when camostat mesylate and E-64d, an inhibitor of CatB/L, were added (Figure 4A; Figure S3B), indicating that SARS-2-S can use both CatB/L as well as TMPRSS2 for priming in these cell lines. In contrast, camostat mesylate did not interfere with SARS-2-S-driven entry into the TMPRSS2⁻ cell lines 293T (Figure S3B) and Vero (Figure 4A), which was efficiently blocked by E-64d and therefore is CatB/L dependent. Moreover, directed expression of TMPRSS2 rescued SARS-2-S-driven entry from inhibition by E-64d (Figure 4B), confirming that SARS-2-S can employ TMPRSS2 for S protein priming.

We next analyzed whether TMPRSS2 usage is required for SARS-CoV-2 infection of lung cells. Indeed, camostat mesylate significantly reduced MERS-S-, SARS-S-, and SARS-2-S- but

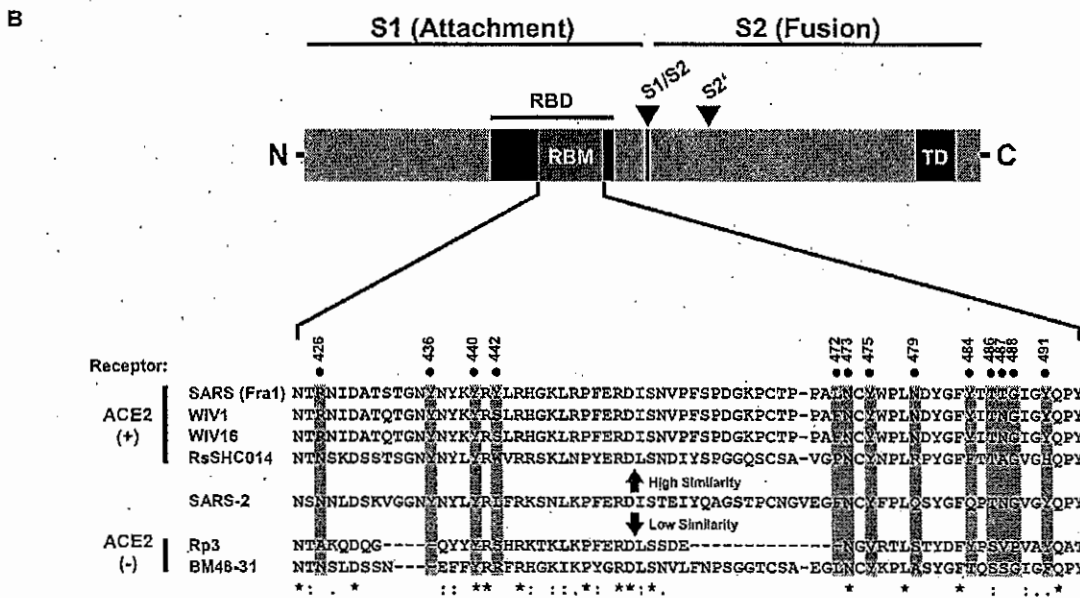
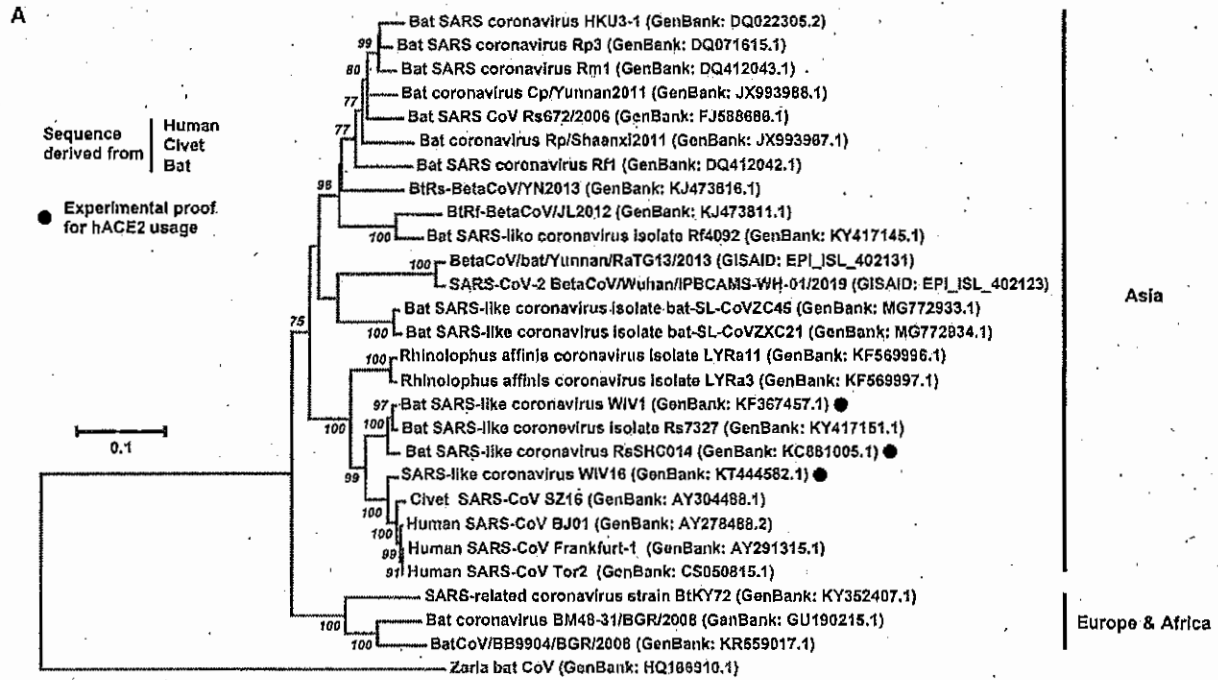


Figure 2. SARS-2-S Harbors Amino Acid Residues Critical for ACE2 Binding

(A) The S protein of SARS-CoV-2 clusters phylogenetically with S proteins of known bat-associated betacoronaviruses (see Figure S2 for more details).

(B) Alignment of the receptor binding motif of SARS-S with corresponding sequences of bat-associated betacoronavirus S proteins, which are able or unable to use ACE2 as cellular receptor, reveals that SARS-CoV-2 possesses crucial amino acid residues for ACE2 binding.

not VSV-G-driven entry into the lung cell line Calu-3 (Figure 4C) and exerted no unwanted cytotoxic effects (Figure S3 C). Similarly, camostat mesylate treatment significantly reduced Calu-3

infection with authentic SARS-CoV-2 (Figure 4D). Finally, camostat mesylate treatment inhibited SARS-S- and SARS-2-S- but not VSV-G-driven entry into primary human lung cells (Figure 4E).

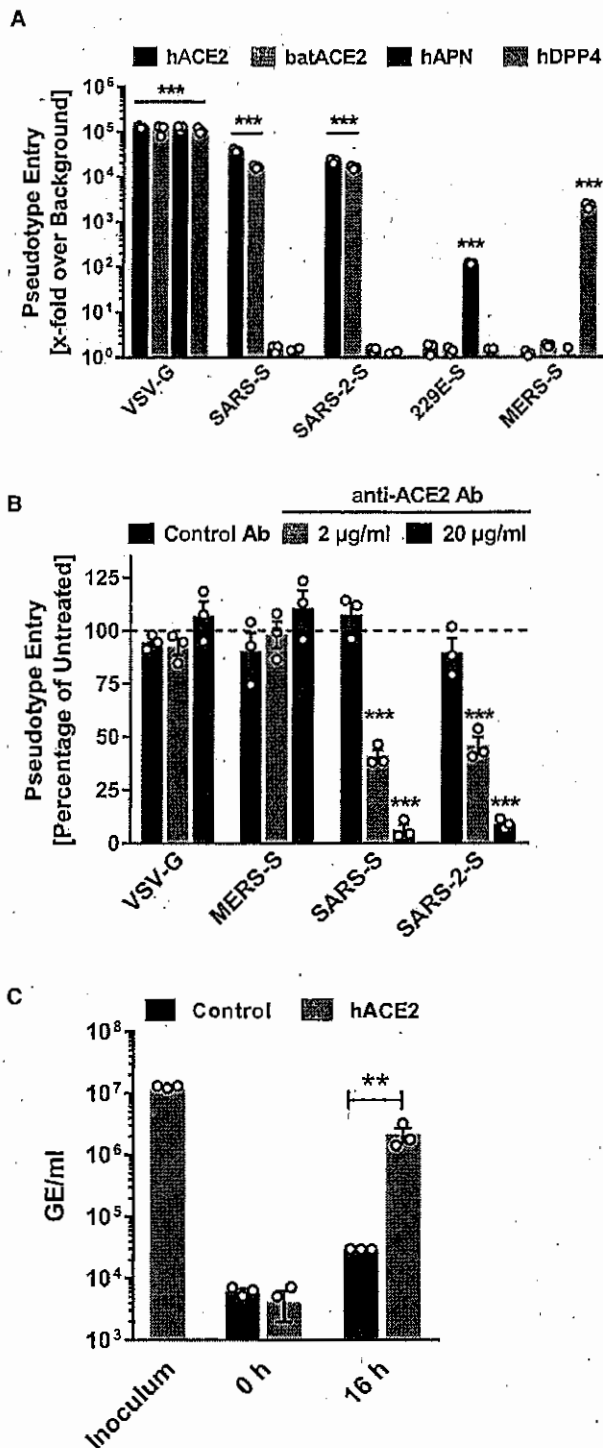


Figure 3. SARS-2-S Utilizes ACE2 as Cellular Receptor
 (A) BHK-21 cells transiently expressing ACE2 of human or bat origin, human APN, or human DPP4 were inoculated with pseudotyped VSV harboring VSV-G, SARS-S, SARS-2-S, MERS-S, or 229E-S. At 16 h postinoculation, pseu-

Collectively, SARS-CoV-2 can use TMPRSS2 for S protein priming and camostat mesylate, an inhibitor of TMPRSS2, blocks SARS-CoV-2 infection of lung cells.

Evidence that Antibodies Raised against SARS-CoV Will Cross-Neutralize SARS-CoV-2

Convalescent SARS patients exhibit a neutralizing antibody response directed against the viral S protein (Liu et al., 2006). We investigated whether such antibodies block SARS-2-S-driven entry. Four sera obtained from three convalescent SARS patients inhibited SARS-S- but not VSV-G-driven entry in a concentration-dependent manner (Figure 5). In addition, these sera also reduced SARS-2-S-driven entry, although with lower efficiency compared to SARS-S (Figure 5). Similarly, rabbit sera raised against the S1 subunit of SARS-S reduced both SARS-S- and SARS-2-S-driven entry with high efficiency, and again inhibition of SARS-S-driven entry was more efficient. Thus, antibody responses raised against SARS-S during infection or vaccination might offer some level of protection against SARS-CoV-2 infection.

DISCUSSION

The present study provides evidence that host cell entry of SARS-CoV-2 depends on the SARS-CoV receptor ACE2 and can be blocked by a clinically proven inhibitor of the cellular serine protease TMPRSS2, which is employed by SARS-CoV-2 for S protein priming. Moreover, it suggests that antibody responses raised against SARS-CoV could at least partially protect against SARS-CoV-2 infection. These results have important implications for our understanding of SARS-CoV-2 transmissibility and pathogenesis and reveal a target for therapeutic intervention.

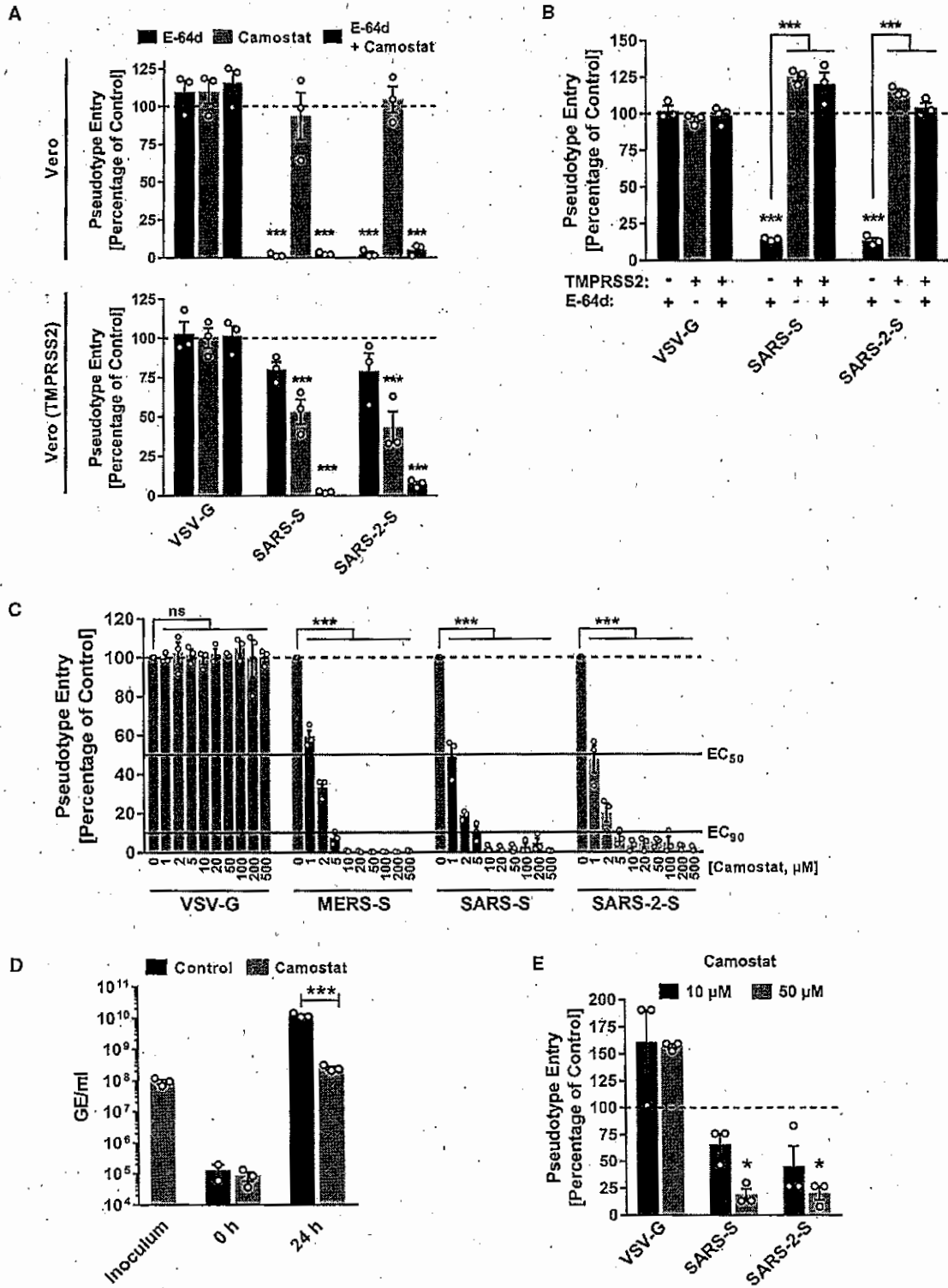
The finding that SARS-2-S exploits ACE2 for entry, which was also reported by Zhou and colleagues (Zhou et al., 2020) while the present manuscript was in revision, suggests that the virus might target a similar spectrum of cells as SARS-CoV. In the lung, SARS-CoV infects mainly pneumocytes and macrophages (Shieh et al., 2005). However, ACE2 expression is not limited to the lung, and extrapulmonary spread of SARS-CoV in ACE2⁺ tissues was observed (Ding et al., 2004; Gu et al., 2005; Hamming et al., 2004). The same can be expected for SARS-CoV-2, although affinity of SARS-S and SARS-2-S for ACE2 remains

dotype entry was analyzed (normalization against particles without viral envelope protein).

(B) Untreated Vero cells as well as Vero cells pre-incubated with 2 or 20 µg/mL of anti-ACE2 antibody or unrelated control antibody (anti-DC-SIGN, 20 µg/mL) were inoculated with pseudotyped VSV harboring VSV-G, SARS-S, SARS-2-S, or MERS-S. At 16 h postinoculation, pseudotype entry was analyzed (normalization against untreated cells).

(C) BHK-21 cells transfected with ACE2-encoding plasmid or control transfected with DsRed-encoding plasmid were infected with SARS-CoV-2 and washed, and genome equivalents in culture supernatants were determined by quantitative RT-PCR.

The average of three independent experiments conducted with triplicate samples is shown in (A–C). Error bars indicate SEM. Statistical significance was tested by two-way ANOVA with Dunnett posttest. Cells transfected with empty vector served as reference in (A) whereas cells that were not treated with antibody served as reference in (B).



(legend on next page)

to be compared. It has been suggested that the modest ACE2 expression in the upper respiratory tract (Bertram et al., 2012; Hamming et al., 2004) might limit SARS-CoV transmissibility. In light of the potentially increased transmissibility of SARS-CoV-2 relative to SARS-CoV, one may speculate that the new virus might exploit cellular attachment-promoting factors with higher efficiency than SARS-CoV to ensure robust infection of ACE2⁺ cells in the upper respiratory tract. This could comprise binding to cellular glycans, a function ascribed to the S1 domain of certain coronaviruses (Li et al., 2017; Park et al., 2019). Finally, it should be noted that ACE2 expression protects from lung injury and is downregulated by SARS-S (Haga et al., 2008; Imai et al., 2005; Kuba et al., 2005), which might promote SARS. It will thus be interesting to determine whether SARS-CoV-2 also interferes with ACE2 expression.

Priming of coronavirus S proteins by host cell proteases is essential for viral entry into cells and encompasses S protein cleavage at the S1/S2 and the S2' sites. The S1/S2 cleavage site of SARS-2-S harbors several arginine residues (multibasic), which indicates high cleavability. Indeed, SARS-2-S was efficiently cleaved in cells, and cleaved S protein was incorporated into VSV particles. Notably, the cleavage site sequence can determine the zoonotic potential of coronaviruses (Menachery et al., 2020; Yang et al., 2014, 2015), and a multibasic cleavage site was not present in RaTG13, the coronavirus most closely related to SARS-CoV-2. It will thus be interesting to determine whether the presence of a multibasic cleavage site is required for SARS-CoV-2 entry into human cells and how this cleavage site was acquired.

The S proteins of SARS-CoV can use the endosomal cysteine proteases CatB/L for S protein priming in TMPRSS2⁻ cells (Simmons et al., 2005). However, S protein priming by TMPRSS2 but not CatB/L is essential for viral entry into primary target cells and for viral spread in the infected host (Iwata-Yoshikawa et al., 2019; Kawase et al., 2012; Zhou et al., 2015). The present study indicates that SARS-CoV-2 spread also depends on TMPRSS2 activity, although we note that SARS-CoV-2 infection of Calu-3 cells was inhibited but not abrogated by camostat mesylate, likely reflecting residual S protein priming by CatB/L. One can speculate that furin-mediated precleavage at the S1/S2 site in infected cells might promote subsequent TMPRSS2-dependent entry into target cells, as reported for MERS-CoV (Kleine-Weber et al.,

2018; Park et al., 2016). Collectively, our present findings and previous work highlight TMPRSS2 as a host cell factor that is critical for spread of several clinically relevant viruses, including influenza A viruses and coronaviruses (Gierer et al., 2013; Glowacka et al., 2011; Iwata-Yoshikawa et al., 2019; Kawase et al., 2012; Matsuyama et al., 2010; Shulla et al., 2011; Zhou et al., 2015). In contrast, TMPRSS2 is dispensable for development and homeostasis (Kim et al., 2006) and thus constitutes an attractive drug target. In this context, it is noteworthy that the serine protease inhibitor camostat mesylate, which blocks TMPRSS2 activity (Kawase et al., 2012; Zhou et al., 2015), has been approved in Japan for human use, but for an unrelated indication. This compound or related ones with potentially increased antiviral activity (Yamamoto et al., 2016) could thus be considered for off-label treatment of SARS-CoV-2-infected patients.

Convalescent SARS patients exhibit a neutralizing antibody response that can be detected even 24 months after infection (Liu et al., 2006) and that is largely directed against the S protein. Moreover, experimental SARS vaccines, including recombinant S protein (He et al., 2006) and inactivated virus (Lin et al., 2007), induce neutralizing antibody responses. Although confirmation with infectious virus is pending, our results indicate that neutralizing antibody responses raised against SARS-S could offer some protection against SARS-CoV-2 infection, which may have implications for outbreak control.

In sum, this study provided key insights into the first step of SARS-CoV-2 infection, viral entry into cells, and defined potential targets for antiviral intervention.

STAR★METHODS

Detailed methods are provided in the online version of this paper and include the following:

- KEY RESOURCES TABLE
- LEAD CONTACT AND MATERIALS AVAILABILITY
- EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS
 - Cell cultures, primary cells, viral strains
- METHOD DETAILS
 - Plasmids
 - Pseudotyping of VSV and transduction experiments
 - Quantification of cell viability

Figure 4. SARS-2-S Employs TMPRSS2 for S Protein Priming in Human Lung Cells

(A) Importance of activity of CatB/L or TMPRSS2 for host cell entry of SARS-CoV-2 was evaluated by adding inhibitors to target cells prior to transduction. E-64d and camostat mesylate block the activity of CatB/L and TMPRSS2, respectively (additional data for 293T cells transiently expressing ACE2 and Calu-3 cells are shown in Figure S3).

(B) To analyze whether TMPRSS2 can rescue SARS-2-S-driven entry into cells that have low CatB/L activity, 293T cells transiently expressing ACE2 alone or in combination with TMPRSS2 were incubated with CatB/L inhibitor E-64d or DMSO as control and inoculated with pseudotypes bearing the indicated viral surface proteins.

(C) Calu-3 cells were pre-incubated with the indicated concentrations of camostat mesylate and subsequently inoculated with pseudoparticles harboring the indicated viral glycoproteins.

(D) Calu-3 cells were pre-incubated with camostat mesylate and infected with SARS-CoV-2. Subsequently, the cells were washed and genome equivalents in culture supernatants were determined by quantitative RT-PCR.

(E) In order to investigate whether serine protease activity is required for SARS-2-S-driven entry into human lung cells, primary human airway epithelial cells were incubated with camostat mesylate prior to transduction.

The average of three independent experiments conducted with triplicate or quadruplicate samples is shown in (A–E). Error bars indicate SEM. Statistical significance was tested by two-way ANOVA with Dunnett posttest. Cells that did not receive inhibitor served as reference in (A), (C), (D), and (E) whereas cells transfected with empty vector and not treated with inhibitor served as reference in (B).

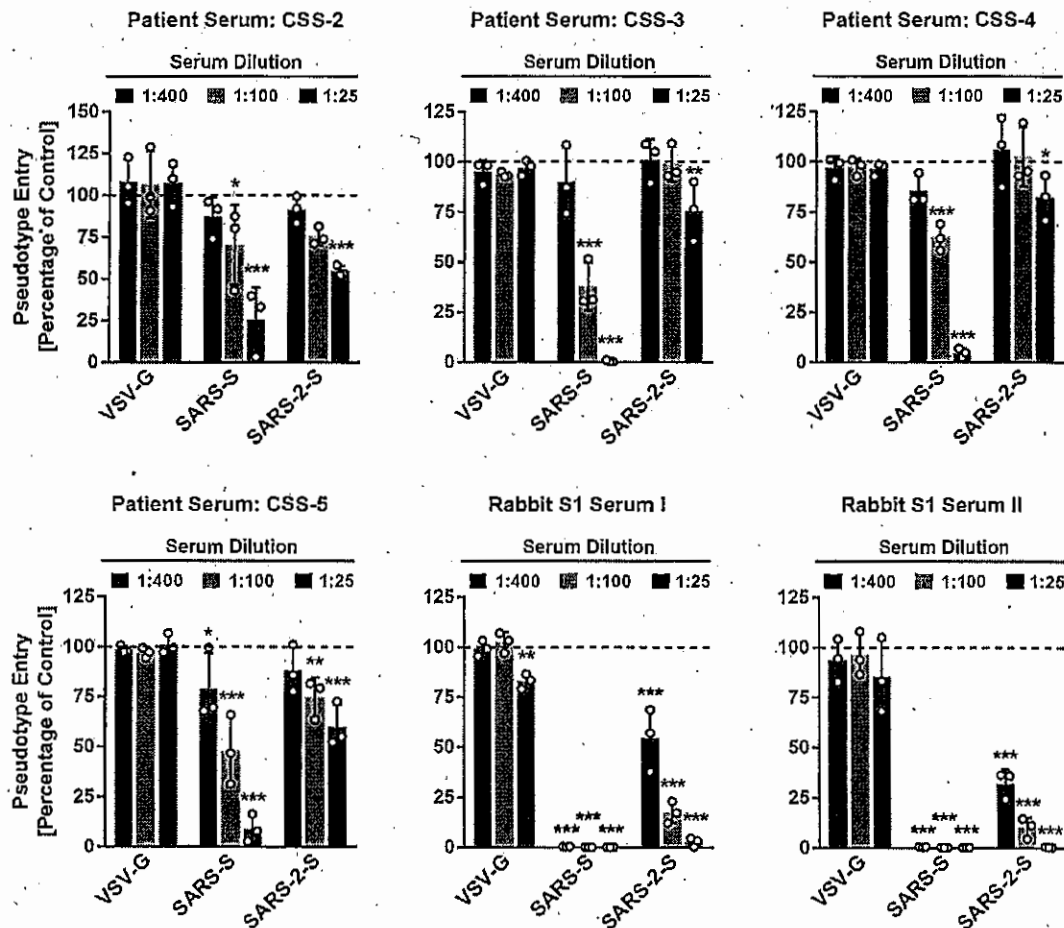


Figure 5. Sera from Convalescent SARS Patients Cross-Neutralize SARS-2-S-Driven Entry

Pseudotypes harboring the indicated viral surface proteins were incubated with different dilutions of sera from three convalescent SARS patients or sera from rabbits immunized with the S1 subunit of SARS-S and subsequently inoculated onto Vero cells in order to evaluate cross-neutralization potential. The average of three independent experiments performed with triplicate samples is shown. Error bars indicate SEM. Statistical significance was tested by two-way ANOVA with Dunnett posttest.

- Analysis of SARS-2-S expression and particle incorporation
- Infection with authentic SARS-CoV-2
- Sera
- Phylogenetic analysis
- QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS
- DATA AND CODE AVAILABILITY

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Heike Hofmann-Winkler for discussion, Andrea Maisner for Nipah F and G expression plasmids, Anette Teichmann for technical assistance, and Roberto Cattaneo for plasmid pCG1. We acknowledge the support of the non-profit foundation HTCR, which holds human tissue on trust, making it broadly available for research on an ethical and legal basis. We gratefully acknowledge the authors and the originating and submitting laboratories for their sequence and metadata shared through GISAID, on which this research is based. This work was supported by BMBF (RAPID Consortium, 01KI1723D

and 01KI1723A to C.D. and S.P.) and German Research Foundation (DFG) (WU 929/1-1 to N.-H.W.).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization, M.H. and S.P.; Formal analysis, M.H., H.K.-W., M.A.M., and S.P.; Investigation, M.H., H.K.-W., S.S., N.K., T.H., N.-H.W., and M.A.M.; Resources, T.H., S.E., T.S.S., G.H., A.N., M.A.M., and C.D.; Writing – Original Draft, M.H. and S.P.; Writing – Review & Editing, all authors; Funding acquisition, S.P., N.-H.W., and C.D.

DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare no competing interests.

Received: February 6, 2020
 Revised: February 13, 2020
 Accepted: February 25, 2020
 Published: March 5, 2020

REFERENCES

- Berger-Rentsch, M., and Zimmer, G. (2011). A vesicular stomatitis virus replication-based bioassay for the rapid and sensitive determination of multi-species type I Interferon. *PLoS ONE* 6, e25858.
- Bertram, S., Glowacka, I., Blazejewska, P., Soilleux, E., Allen, P., Danisch, S., Steffen, I., Choi, S.Y., Park, Y., Schneider, H., et al. (2010). TMPRSS2 and TMPRSS4 facilitate trypsin-independent spread of influenza virus in Caco-2 cells. *J. Virol.* 84, 10016–10025.
- Bertram, S., Heurich, A., Lavender, H., Gierer, S., Danisch, S., Perin, P., Lucas, J.M., Nelson, P.S., Pöhlmann, S., and Soilleux, E.J. (2012). Influenza and SARS-coronavirus activating proteases TMPRSS2 and HAT are expressed at multiple sites in human respiratory and gastrointestinal tracts. *PLoS ONE* 7, e35976.
- Bossart, K.N., Wang, L.F., Flora, M.N., Chua, K.B., Lam, S.K., Eaton, B.T., and Broder, C.C. (2002). Membrane fusion tropism and heterotypic functional activities of the Nipah virus and Hendra virus envelope glycoproteins. *J. Virol.* 76, 11186–11198.
- Brinkmann, C., Hoffmann, M., Lübke, A., Nehmeier, I., Krämer-Kühl, A., Winkler, M., and Pöhlmann, S. (2017). The glycoprotein of vesicular stomatitis virus promotes release of virus-like particles from tetherin-positive cells. *PLoS ONE* 12, e0189073.
- Buchholz, U., Müller, M.A., Nitsche, A., Sanewski, A., Wevering, N., Bauer-Balci, T., Bonin, F., Drosten, C., Schweiger, B., Wolff, T., et al. (2013). Contact investigation of a case of human novel coronavirus infection treated in a German hospital, October–November 2012. *Euro Surveill.* 18, 20406.
- Chan, J.F., Yuan, S., Kok, K.H., To, K.K., Chu, H., Yang, J., Xing, F., Liu, J., Yip, C.C., Poon, R.W., et al. (2020). A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. *Lancet* 395, 514–523.
- Corman, V.M., Lienau, J., and Witzenerath, M. (2019). [Coronaviruses as the cause of respiratory infections]. *Internist (Berl.)* 60, 1136–1145.
- Corman, V.M., Landt, O., Kaiser, M., Molenkamp, R., Meijer, A., Chu, D.K., Bleicker, T., Brünink, S., Schneider, J., Schmidt, M.L., et al. (2020). Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill.* 25 <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>.
- de Wit, E., van Doremalen, N., Falzarano, D., and Munster, V.J. (2016). SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 523–534.
- Ding, Y., He, L., Zhang, Q., Huang, Z., Che, X., Hou, J., Wang, H., Shen, H., Qiu, L., Li, Z., et al. (2004). Organ distribution of severe acute respiratory syndrome (SARS) associated coronavirus (SARS-CoV) in SARS patients: implications for pathogenesis and virus transmission pathways. *J. Pathol.* 203, 622–630.
- Fehr, A.R., Channappanavar, R., and Perlman, S. (2017). Middle East Respiratory Syndrome: Emergence of a Pathogenic Human Coronavirus. *Annu. Rev. Med.* 68, 387–399.
- Ge, X.Y., Li, J.L., Yang, X.L., Chmura, A.A., Zhu, G., Epstein, J.H., Mazet, J.K., Hu, B., Zhang, W., Peng, C., et al. (2013). Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor. *Nature* 503, 535–538.
- Gierer, S., Bertram, S., Kaup, F., Wensch, F., Heurich, A., Krämer-Kühl, A., Welsch, K., Winkler, M., Meyer, B., Drosten, C., et al. (2013). The spike protein of the emerging betacoronavirus EMC uses a novel coronavirus receptor for entry, can be activated by TMPRSS2, and is targeted by neutralizing antibodies. *J. Virol.* 87, 5502–5511.
- Glowacka, I., Bertram, S., Müller, M.A., Allen, P., Soilleux, E., Pfefferle, S., Steffen, I., Tsegaye, T.S., He, Y., Gnirss, K., et al. (2011). Evidence that TMPRSS2 activates the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein for membrane fusion and reduces viral control by the humoral immune response. *J. Virol.* 85, 4122–4134.
- Gu, J., Gong, E., Zhang, B., Zheng, J., Gao, Z., Zhong, Y., Zou, W., Zhan, J., Wang, S., Xia, Z., et al. (2005). Multiple organ infection and the pathogenesis of SARS. *J. Exp. Med.* 202, 415–424.
- Guan, Y., Zheng, B.J., He, Y.Q., Liu, X.L., Zhuang, Z.X., Cheung, C.L., Luo, S.W., Li, P.H., Zhang, L.J., Guan, Y.J., et al. (2003). Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China. *Science* 302, 276–278.
- Haga, S., Yamamoto, N., Nakai-Murakami, C., Osawa, Y., Tokunaga, K., Sata, T., Yamamoto, N., Sasazuki, T., and Ishizaka, Y. (2008). Modulation of TNF-alpha-converting enzyme by the spike protein of SARS-CoV and ACE2 induces TNF-alpha production and facilitates viral entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 7809–7814.
- Hamming, I., Timens, W., Bultuis, M.L., Lely, A.T., Navis, G., and van Goor, H. (2004). Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *J. Pathol.* 203, 631–637.
- He, Y., Li, J., Heck, S., Lustigman, S., and Jiang, S. (2006). Antigenic and immunogenic characterization of recombinant baculovirus-expressed severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein: implication for vaccine design. *J. Virol.* 80, 5757–5767.
- Hoffmann, M., Müller, M.A., Drexler, J.F., Glende, J., Erdt, M., Gützkow, T., Loesemann, C., Binger, T., Deng, H., Schwegmann-Weßels, C., et al. (2013). Differential sensitivity of bat cells to infection by enveloped RNA viruses: coronaviruses, paramyxoviruses, filoviruses, and influenza viruses. *PLoS ONE* 8, e72942.
- Hofmann, H., Geler, M., Marzi, A., Krumbiegel, M., Peipp, M., Fey, G.H., Gramberg, T., and Pöhlmann, S. (2004a). Susceptibility to SARS coronavirus S protein-driven infection correlates with expression of angiotensin converting enzyme 2 and infection can be blocked by soluble receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 319, 1216–1221.
- Hofmann, H., Hattermann, K., Marzi, A., Gramberg, T., Geler, M., Krumbiegel, M., Kuate, S., Uberla, K., Niedrig, M., and Pöhlmann, S. (2004b). S protein of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus mediates entry into hepatoma cell lines and is targeted by neutralizing antibodies in infected patients. *J. Virol.* 78, 6134–6142.
- Hofmann, H., Pyrc, K., van der Hoek, L., Geler, M., Berkhout, B., and Pöhlmann, S. (2005). Human coronavirus NL63 employs the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor for cellular entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 7988–7993.
- Huang, C., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Zhao, J., Hu, Y., Zhang, L., Fan, G., Xu, J., Gu, X., et al. (2020). Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan (China). *Lancet*.
- Imai, Y., Kuba, K., Rao, S., Huan, Y., Guo, F., Guan, B., Yang, P., Sarao, R., Wada, T., Leon-Poi, H., et al. (2005). Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure. *Nature* 436, 112–116.
- Iwata-Yoshikawa, N., Okamura, T., Shimizu, Y., Hasegawa, H., Takeda, M., and Nagata, N. (2019). TMPRSS2 Contributes to Virus Spread and Immunopathology in the Airways of Murine Models after Coronavirus Infection. *J. Virol.* 93 <https://doi.org/10.1128/JVI.01815-18>.
- Kawase, M., Shirato, K., van der Hoek, L., Taguchi, F., and Matsuyama, S. (2012). Simultaneous treatment of human bronchial epithelial cells with serine and cysteine protease inhibitors prevents severe acute respiratory syndrome coronavirus entry. *J. Virol.* 86, 6537–6545.
- Kim, T.S., Heinlein, C., Hackman, R.C., and Nelson, P.S. (2006). Phenotypic analysis of mice lacking the *Tmprss2*-encoded protease. *Mol. Cell. Biol.* 26, 965–975.
- Kleine-Weber, H., Elzayat, M.T., Hoffmann, M., and Pöhlmann, S. (2018). Functional analysis of potential cleavage sites in the MERS-coronavirus spike protein. *Sci. Rep.* 8, 16597.
- Kleine-Weber, H., Elzayat, M.T., Wang, L., Graham, B.S., Müller, M.A., Drosten, C., Pöhlmann, S., and Hoffmann, M. (2019). Mutations in the Spike Protein of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Transmitted in Korea Increase Resistance to Antibody-Mediated Neutralization. *J. Virol.* 93 <https://doi.org/10.1128/JVI.01381-18>.
- Kuba, K., Imai, Y., Rao, S., Gao, H., Guo, F., Guan, B., Huan, Y., Yang, P., Zhang, Y., Deng, W., et al. (2005). A crucial role of angiotensin converting

- enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury. *Nat. Med.* **11**, 875–879.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., and Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol* **35**, 1547–1549.
- Lau, S.K., Woo, P.C., Li, K.S., Huang, Y., Tsoi, H.W., Wong, B.H., Wong, S.S., Leung, S.Y., Chan, K.H., and Yuen, K.Y. (2005). Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 14040–14045.
- Li, W., Moore, M.J., Vasilieva, N., Sui, J., Wong, S.K., Berne, M.A., Somasundaran, M., Sullivan, J.L., Luzuriaga, K., Greenough, T.C., et al. (2003). Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature* **426**, 450–454.
- Li, F., Li, W., Farzan, M., and Harrison, S.C. (2005a). Structure of SARS coronavirus spike receptor-binding domain complexed with receptor. *Science* **309**, 1864–1868.
- Li, W., Zhang, C., Sui, J., Kühn, J.H., Moore, M.J., Luo, S., Wong, S.K., Huang, I.C., Xu, K., Vasilieva, N., et al. (2005b). Receptor and viral determinants of SARS-coronavirus adaptation to human ACE2. *EMBO J.* **24**, 1634–1643.
- Li, W., Hulsweil, R.J.G., Widjaja, I., Raj, V.S., McBride, R., Peng, W., Widagdo, W., Tortorici, M.A., van Dieren, B., Lang, Y., et al. (2017). Identification of sialic acid-binding function for the Middle East respiratory syndrome coronavirus spike glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **114**, E8508–E8517.
- Lin, J.T., Zhang, J.S., Su, N., Xu, J.G., Wang, N., Chen, J.T., Chen, X., Liu, Y.X., Gao, H., Jia, Y.P., et al. (2007). Safety and immunogenicity from a phase I trial of inactivated severe acute respiratory syndrome coronavirus vaccine. *Antivir. Ther. (Lond.)* **12**, 1107–1113.
- Liu, W., Fontanet, A., Zhang, P.H., Zhan, L., Xin, Z.T., Baril, L., Tang, F., Lv, H., and Cao, W.C. (2006). Two-year prospective study of the humoral immune response of patients with severe acute respiratory syndrome. *J. Infect. Dis.* **193**, 792–795.
- Matsuyama, S., Nagata, N., Shirato, K., Kawase, M., Takeda, M., and Taguchi, F. (2010). Efficient activation of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein by the transmembrane protease TMPRSS2. *J. Virol.* **84**, 12658–12664.
- Menachery, V.D., Dinnon, K.H., III, Yount, B.L., Jr., McAnamey, E.T., Grafinski, L.E., Hale, A., Graham, R.L., Scobey, T., Anthony, S.J., Wang, L., et al. (2020). Trypsin treatment unlocks barrier for zoonotic bat coronavirus infection. *J. Virol.* **94** <https://doi.org/10.1128/JVI.01774-19>.
- Munster, V.J., Koopmans, M., van Doremalen, N., van Riel, D., and de Wit, E. (2020). A Novel Coronavirus Emerging in China - Key Questions for Impact Assessment. *N. Engl. J. Med.* **382**, 692–694.
- Park, J.E., Li, K., Barlan, A., Fehr, A.R., Perlman, S., McCray, P.B., Jr., and Gallagher, T. (2016). Proteolytic processing of Middle East respiratory syndrome coronavirus spikes expands virus tropism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **113**, 12262–12267.
- Park, Y.J., Walls, A.C., Wang, Z., Sauer, M.M., Li, W., Tortorici, M.A., Bosch, B.J., DiMaio, F., and Veesele, D. (2019). Structures of MERS-CoV spike glycoprotein in complex with sialoside attachment receptors. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **26**, 1151–1157.
- Raj, V.S., Mou, H., Smits, S.L., Dekkers, D.H., Müller, M.A., Dijkman, R., Muth, D., Demmers, J.A., Zakí, A., Fouchier, R.A., et al. (2013). Dipeptidyl peptidase 4 is a functional receptor for the emerging human coronavirus-EMC. *Nature* **496**, 251–254.
- Shieh, W.J., Hsiao, C.H., Paddock, C.D., Guamer, J., Goldsmith, C.S., Tatti, K., Packard, M., Mueller, L., Wu, M.Z., Rollin, P., et al. (2005). Immunohistochemical, in situ hybridization, and ultrastructural localization of SARS-associated coronavirus in lung of a fatal case of severe acute respiratory syndrome in Taiwan. *Hum. Pathol.* **36**, 303–309.
- Shirato, K., Kanou, K., Kawase, M., and Matsuyama, S. (2016). Clinical Isolates of Human Coronavirus 229E Bypass the Endosome for Cell Entry. *J. Virol.* **91** <https://doi.org/10.1128/JVI.01387-16>.
- Shirato, K., Kawase, M., and Matsuyama, S. (2018). Wild-type human coronaviruses prefer cell-surface TMPRSS2 to endosomal cathepsins for cell entry. *Virology* **517**, 9–15.
- Shulla, A., Heald-Sargent, T., Subramanya, G., Zhao, J., Perlman, S., and Gallagher, T. (2011). A transmembrane serine protease is linked to the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor and activates virus entry. *J. Virol.* **85**, 873–882.
- Simmons, G., Gosalia, D.N., Rennekamp, A.J., Reeves, J.D., Diamond, S.L., and Bates, P. (2005). Inhibitors of cathepsin L prevent severe acute respiratory syndrome coronavirus entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 11876–11881.
- Wang, C., Horby, P.W., Hayden, F.G., and Gao, G.F. (2020). A novel coronavirus outbreak of global health concern. *Lancet* **395**, 470–473.
- WHO (2004). Summary of probable SARS cases with onset of illness from 1 November 2002 to 31 July 2003. https://www.who.int/csr/sars/country/table2004_04_21/en/.
- WHO (2020). Novel Coronavirus(2019-nCoV) Situation Report 23. https://www.who.int/docs/default-source/coronavirus/situation-reports/20200212-sitrep-23-ncov.pdf?sfvrsn=41e9fb78_4.
- Wu, N.H., Yang, W., Beineke, A., Dijkman, R., Matrosovich, M., Baumgärtner, W., Thiel, V., Valentin-Weigand, P., Meng, F., and Herler, G. (2016). The differentiated airway epithelium infected by influenza viruses maintains the barrier function despite a dramatic loss of ciliated cells. *Sci. Rep.* **6**, 39668.
- Yamamoto, M., Matsuyama, S., Li, X., Takeda, M., Kawaguchi, Y., Inoue, J.I., and Matsuda, Z. (2016). Identification of Nefamostat as a Potent Inhibitor of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus S Protein-Mediated Membrane Fusion Using the Split-Protein-Based Cell-Cell Fusion Assay. *Antimicrob. Agents Chemother.* **60**, 6532–6539.
- Yang, Y., Du, L., Liu, C., Wang, L., Ma, C., Tang, J., Baric, R.S., Jiang, S., and Li, F. (2014). Receptor usage and cell entry of bat coronavirus HKU4 provide insight into bat-to-human transmission of MERS coronavirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111**, 12516–12521.
- Yang, Y., Liu, C., Du, L., Jiang, S., Shi, Z., Baric, R.S., and Li, F. (2015). Two Mutations Were Critical for Bat-to-Human Transmission of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus. *J. Virol.* **89**, 9119–9123.
- Yeager, C.L., Ashmun, R.A., Williams, R.K., Cardellicchio, C.B., Shapiro, L.H., Look, A.T., and Holmes, K.V. (1992). Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E. *Nature* **357**, 420–422.
- Zhou, Y., Vedantham, P., Lu, K., Agudelo, J., Carrion, R., Jr., Nunneley, J.W., Barnard, D., Pöhlmann, S., McKerrow, J.H., Renso, A.R., and Simmons, G. (2015). Protease inhibitors targeting coronavirus and filovirus entry. *Antiviral Res.* **116**, 76–84.
- Zhou, P., Yang, X.L., Wang, X.G., Hu, B., Zhang, L., Zhang, W., Si, H.R., Zhu, Y., Li, B., Huang, C.L., et al. (2020). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>.
- Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., Zhao, X., Huang, B., Shi, W., Lu, R., et al. (2020). A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med.* **382**, 727–733.

STAR★METHODS

KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies		
Monoclonal anti-HA antibody produced in mouse	Sigma-Aldrich	Cat.#: H3663; RRID: AB_262051
Monoclonal anti-β-actin antibody produced in mouse	Sigma-Aldrich	Cat.#: A5441; RRID: AB_476744
Monoclonal anti-VSV-M (23H12) antibody	KeraFast	Cat.#: EB0011; RRID: AB_2734773
Polyclonal anti-ACE2 antibody	R&D Systems	Cat.#: AF933; RRID: AB_355722
Polyclonal anti-DC-SIGN antibody	Santa Cruz	Cat.#: sc-11038; RRID: AB_639038
Monoclonal anti-mouse, peroxidase-coupled	Dianova	Cat.#: 115-035-003; RRID: AB_10015289
Anti-VSV-G antibody (I1, produced from CRL-2700 mouse hybridoma cells)	ATCC	Cat.#: CRL-2700; RRID: CVCL_G654
Bacterial and Virus Strains		
VSV-ΔG-FLuc	(Berger-Bentsch and Zimmer, 2011)	N/A
SARS-CoV-2 isolate Munich 929	Laboratory of Christian Drosten	N/A
One Shot™ OmniMAX™ 2 T1R Chemically Competent <i>E. coli</i>	ThermoFisher Scientific	Cat.#: C854003
Biological Samples		
Patient serum, CSS-2	Laboratory of Christian Drosten	N/A
Patient serum, CSS-3	Laboratory of Andreas Nitsche	N/A
Patient serum, CSS-4	Laboratory of Andreas Nitsche	N/A
Patient serum, CSS-5	Laboratory of Andreas Nitsche	N/A
Rabbit serum, anti-SARS-S1 rabbit I	Laboratory of Stefan Pöhlmann	N/A
Rabbit serum, anti-SARS-S1 rabbit II	Laboratory of Stefan Pöhlmann	N/A
Chemicals, Peptides, and Recombinant Proteins		
Camostat mesylate	Sigma-Aldrich	SML0057
F-64d	Sigma-Aldrich	F8640
Ammonium chloride	Carl Roth	Cat.#: 5050.2
Critical Commercial Assays		
Beate Juice Kit	PJK	Cat.#: 102511
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	Promega	Cat.#: G7570
Experimental Models: Cell Lines		
A549	Laboratory of Georg Herrler	ATCC Cat# CRM-CCL-185; RRID: CVCL_0023
BEAS-2B	Laboratory of Stefan Pöhlmann	ATCC Cat# CRL-9609; RRID: CVCL_0168
Calu-3	Laboratory of Stephan Ludwig	ATCC Cat# HTB-55; RRID: CVCL_0609
NCI-H1299	Laboratory of Stefan Pöhlmann	ATCC Cat# CRL-5803; RRID: CVCL_0060
Huh-7	Laboratory of Thomas Pietschmann	JCRB Cat# JCRB0403; RRID: CVCL_0336
Caco-2	Laboratory of Stefan Pöhlmann	ATCC Cat# HTB-37; RRID: CVCL_0025

(Continued on next page)

Continued

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Vero	Laboratory of Andrea Malsner	ATCC Cat# CRL-1586; RRID:CVCL_0574
Vero-TMPRSS2	This paper	N/A
LLC-PK1	Laboratory of Georg Herfler	ATCC Cat# CRL-1392; RRID:CVCL_0391
MDBK	Laboratory of Georg Herfler	ATCC Cat# CCL-22; RRID:CVCL_0421
MDCKII	Laboratory of Georg Herfler	ATCC Cat# CRL-2936; RRID:CVCL_B034
RhILu/1.1	Laboratory of Christian Drosten, Laboratory of Marcel A. Müller	N/A; RRID:CVCL_BX22
MyDauLu/47.1	Laboratory of Christian Drosten, Laboratory of Marcel A. Müller	N/A; RRID:CVCL_BX18
BHK-21	Laboratory of Georg Herfler	ATCC Cat# CCL-10; RRID:CVCL_1915
NIH/3T3	Laboratory of Stefan Pöhlmann	ATCC Cat# CRL-1658; RRID:CVCL_0594
HAE	HTCR Foundation (Human Tissue and Cell Research)	N/A
293T	DSMZ	Cat.#: ACC-635; RRID:CVCL_0063
Oligonucleotides		
SARS-2-S (BamHI) F AAGGCCGGATCCGCCACCATGTTCT GCTGACCACCAAGC	Sigma-Aldrich	N/A
SARS-2-S (XbaI) R AAGGCCCTAGATTAGGTGTAGTGCAG TTTCACG	Sigma-Aldrich	N/A
SARS-2-S-HA (XbaI) R AAGGCCCTAGATTACGCATAATCC GGCACATCATACGGATAGGTGTAGTGCAGTTTCACG	Sigma-Aldrich	N/A
WH-Ssyn_651F CAAGATCTACAGCAAGCACACC	Sigma-Aldrich	N/A
WH-Ssyn_1380F GTCGGCGGCAACTACAATTAC	Sigma-Aldrich	N/A
WH-Ssyn_1992F CTGCTCTGATCGGAGCCGAGCAC	Sigma-Aldrich	N/A
WH-Ssyn_2648F TGAGATGATCGCCAGTACAC	Sigma-Aldrich	N/A
WH-Ssyn_3286F GCCATCTGCCACGACGGCAAAG	Sigma-Aldrich	N/A
Recombinant DNA		
Synthetic, codon-optimized (humanized) SARS-2-S	ThermoFisher Scientific (GeneArt)	N/A
Plasmid: pCG1-SARS-S	(Hoffmann et al., 2013)	N/A
Plasmid: pCG1-SARS-S-HA	This paper	N/A
Plasmid: pCG1-SARS-2-S	This paper	N/A
Plasmid: pCG1-SARS-2-S-HA	This paper	N/A
Plasmid: pCAGGS-229E-S	(Hoffmann et al., 2005)	N/A
Plasmid: pCAGGS-MEBS-S	(Glarer et al., 2013)	N/A
Plasmid: pCAGGS-VSV-G	(Brinkmann et al., 2017)	N/A
Plasmid: pCAGGS-NIV-F	Laboratory of Andrea Malsner	N/A
Plasmid: pCAGGS-NIV-G	Laboratory of Andrea Malsner	N/A
Plasmid: pCG1-hACE2	(Hoffmann et al., 2013)	N/A
Plasmid: pCG1-hatACE2	(Hoffmann et al., 2013)	N/A
Plasmid: pCG1-hARN	(Hoffmann et al., 2004a)	N/A
Plasmid: pQCXIP-DsRed-hDPP4	(Kleine-Weber et al., 2018)	N/A
Plasmid: pQCXIBL-hTMPRSS2	(Kleine-Weber et al., 2018)	N/A
Plasmid: pCG1	Laboratory of Roberto Cattaneo	N/A
Plasmid: pCAGGS-DsRed	Laboratory of Stefan Pöhlmann	N/A

(Continued on next page)

Continued

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Plasmid: pCAGGS-aGFP	Laboratory of Stefan Pöhlmann	N/A
Software and Algorithms		
Hydrex Sense Microplate Reader Software	Hydrex Deutschland Vertrieb GmbH	https://www.hydrex.de/
ChemoStar Imager Software (version v.0.3.23)	Intas Science Imaging Instruments GmbH	https://www.intas.de/
MEGA 7.0.26	Kumar et al., 2018	https://www.megasoftware.net
Adobe Photoshop CS5 Extended (version 12.0 x 32)	Adobe	https://www.adobe.com/
GraphPad Prism (version 8.3.0(538))	GraphPad Software	https://www.graphpad.com/
Microsoft Office Standard 2010 (version 14.0.7232.5000)	Microsoft Corporation	https://products.office.com/

LEAD CONTACT AND MATERIALS AVAILABILITY

Requests for material can be directed to Markus Hoffmann (mhoffmann@dpz.eu) and the lead contact, Stefan Pöhlmann (spoehlmann@dpz.eu). All materials and reagents will be made available upon installation of a material transfer agreement (MTA).

EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS

Cell cultures, primary cells, viral strains

All cell lines were incubated at 37°C and 5% CO₂ in a humidified atmosphere. 293T (human, kidney), BHK-21 (Syrian hamster, kidney cells), Huh-7 (human, liver), LLC-PK1 (pig, kidney), MRC-5 (human, lung), MyDauLu/47.1 (Daubenton's bat [*Myotis daubentonii*], lung), NIH/3T3 (Mouse, embryo), RhiLu/1.1 (Hairywood horseshoe bat [*Rhinolophus alcyon*], lung) and Vero (African green monkey, kidney) cells were incubated in Dulbecco's modified Eagle medium (PAN-Biotech). Calu-3 (human, lung), Caco-2 (human, colon), MDBK (cattle, kidney) and MDCKII (Dog, kidney) cells were incubated in Minimum Essential Medium (ThermoFisher Scientific). A549 (human, lung), BEAS-2B (human, bronchus) and NCI-H1299 (human, lung) cells were incubated in DMEM/F-12 Medium with Nutrient Mix (ThermoFisher Scientific). Vero cells stably expressing human TMPRSS2 were generated by retroviral transduction and blasticidin-based selection. All media were supplemented with 10% fetal bovine serum (Biocrom), 100 U/mL of penicillin and 0.1 mg/mL of streptomycin (PAN-Biotech), 1x non-essential amino acid solution (10x stock, PAA) and 10 mM sodium pyruvate (ThermoFisher Scientific). For seeding and subcultivation, cells were first washed with phosphate buffered saline (PBS) and then incubated in the presence of trypsin/EDTA solution (PAN-Biotech) until cells detached. Transfection was carried out by calcium-phosphate precipitation. Lung tissue samples were obtained and experimental procedures were performed within the framework of the non-profit foundation HTCR, including the informed patient's consent.

For preparation of human airway epithelial cells, bronchus tissue was derived from patients undergoing pulmonary resection and was provided by the Biobank of the Department of General, Visceral, and Transplant Surgery, Ludwig-Maximilians-University Munich. Primary human airway epithelial cells were subsequently isolated as described (Wu et al., 2016). In brief, tissue with a length of approximately 10 mm and a diameter of 8 mm was collected and incubated for 24 h at 4°C with DMEM (GIBCO) containing 1 mg/mL protease type XIV and 10 µg/mL DNase I, 100 units/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin, 2.5 µg/mL amphotericin B, and 50 µg/mL gentamicin (GIBCO). The epithelial cells were then harvested from the mucosal surface using the scalpel and were resuspended in growth medium. After incubation at 37°C, 5% CO₂ for 2 h to remove adherent fibroblast cells, non-adherent cells were seeded on a collagen I coated flask and maintained at 37°C, 5% CO₂. The growth medium was refreshed every 2 days and consisted of a 1:1 mixture of DMEM (GIBCO) and Airway Epithelial Cell basal medium (Promocell, Heidelberg, Germany) supplemented with 52 µg/mL bovine pituitary extract, 15 ng/mL retinoic acid, 5 µg/mL insulin, 0.5 µg/mL hydrocortisone, 0.5 µg/mL epinephrine, 10 µg/mL transferrin, 1 ng/mL human epidermal growth factor (Corning), 1.5 ng/mL bovine serum albumin, 100 units/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin, with or without 5 µM Rho-associated protein kinase inhibitor (Y-27632), as previously described (Wu et al., 2016). If not stated otherwise all materials were purchased from Sigma-Aldrich.

For infection experiments with SARS-CoV-2, the SARS-CoV-2 isolate Munich 929 was propagated in VeroE6 cells (passage 1) after primary isolation from patient material on Vero-TMPRSS2 cells (passage 0).

METHOD DETAILS

Plasmids

Expression plasmids for vesicular stomatitis virus (VSV, serotype Indiana) glycoprotein (VSV-G), Nipah virus (NiV) fusion (F) and attachment glycoprotein (G), SARS-S (derived from the Frankfurt-1 isolate) with or without a C-terminal HA epitope tag, HCoV-229E-S, MERS-S, human and bat angiotensin converting enzyme 2 (ACE2), human aminopeptidase N (APN), human

dipeptidyl-peptidase 4 (DPP4) and human TMPRSS2 have been described elsewhere (Bertram et al., 2010; Brinkmann et al., 2017; Gierer et al., 2013; Hoffmann et al., 2013; Hofmann et al., 2005; Kleine-Weber et al., 2019). For generation of the expression plasmids for SARS-2-S with or without a C-terminal HA epitope tag we PCR-amplified the coding sequence of a synthetic, codon-optimized (for human cells) SARS-2-S DNA (GeneArt Gene Synthesis, ThermoFisher Scientific) based on the publicly available protein sequence in the National Center for Biotechnology Information database (NCBI Reference Sequence: YP_009724390.1) and cloned in into the pCG1 expression vector via BamHI and XbaI restriction sites.

Pseudotyping of VSV and transduction experiments

For pseudotyping, VSV pseudotypes were generated according to a published protocol (Berger Rentsch and Zimmer, 2011). In brief, 293T transfected to express the viral surface glycoprotein under study were inoculated with a replication-deficient VSV vector that contains expression cassettes for eGFP (enhanced green fluorescent protein) and firefly luciferase instead of the VSV-G open reading frame, VSV Δ G-fLuc (kindly provided by Gert Zimmer, Institute of Virology and Immunology, Mittelhäusern/Switzerland). After an incubation period of 1 h at 37°C, the inoculum was removed and cells were washed with PBS before medium supplemented with anti-VSV-G antibody (I1, mouse hybridoma supernatant from CRL-2700; ATCC) was added in order to neutralize residual input virus (no antibody was added to cells expressing VSV-G). Pseudotyped particles were harvested 16 h postinoculation, clarified from cellular debris by centrifugation and used for experimentation.

For transduction, target cells were grown in 96-well plates until they reached 50%–75% confluency before they were inoculated with respective pseudotyped VSV. For experiments addressing receptor usage, cells were transfected with expression plasmids 24 h before transduction. In order to block ACE2 on the cell surface, cells were pretreated with 2 or 20 μ g/mL anti-ACE2 antibody (R&D Systems, goat, AF933). As control, an unrelated anti-DC-SIGN antibody (Serotec, goat, 20 μ g/mL) was used. For experiments involving ammonium chloride (final concentration 50 mM) and protease inhibitors (E-64d, 25 μ M; camostat mesylate, 1–500 μ M), target cells were treated with the respective chemical 2 h before transduction. For neutralization experiments, pseudotypes were pre-incubated for 30 min at 37°C with different serum dilutions. Transduction efficiency was quantified 16 h posttransduction by measuring the activity of firefly luciferase in cell lysates using a commercial substrate (Beetle-Juice, PJK) and a Hidex Sense plate luminometer (Hidex).

Quantification of cell viability

Cell viability following treatment of Calu-3 cells with camostat mesylate was analyzed using the CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay (Promega). In brief, Calu-3 cells grown to 50% confluency in 96-well plates were incubated for 24 h in the absence or presence of different concentrations (1–500 μ M) of camostat mesylate. Next, the culture medium was aspirated and 100 μ l of fresh culture medium was added before an identical volume of the assay substrate was added. Wells containing only culture medium served as a control to determine the assay background. After 2 min of incubation on a rocking platform and additional 10 min without movement, samples were transferred into white opaque-walled 96-well plates and luminescent signal were recorded using a Hidex Sense plate luminometer (Hidex).

Analysis of SARS-2-S expression and particle incorporation

To analyze S protein expression in cells, 293T cells were transfected with expression vectors for HA-tagged SARS-2-S or SARS-S or empty expression vector (negative control). The culture medium was replaced at 16 h posttransfection and the cells were incubated for an additional 24 h. Then, the culture medium was removed and cells were washed once with PBS before 2x SDS-sample buffer (0.03 M Tris-HCl, 10% glycerol, 2% SDS, 0.2% bromophenol blue, 1 mM EDTA) was added and cells were incubated for 10 min at room temperature. Next, the samples were heated for 15 min at 96°C and subjected to SDS-PAGE and immunoblotting.

For analysis of S protein incorporation into pseudotyped particles, 1 mL of the respective VSV pseudotypes were loaded onto a 20% (w/v) sucrose cushion (volume 50 μ l) and subjected to high-speed centrifugation (25,000 g for 120 min at 4°C). Thereafter, 1 mL of supernatant was removed and the residual volume was mixed with 50 μ l of 2x SDS-sample buffer, heated for 15 min at 96°C and subjected to SDS-PAGE and immunoblotting. After protein transfer, nitrocellulose membranes were blocked in 5% skim milk solution (5% skim milk dissolved in PBS containing 0.05% Tween-20, PBS-T) for 1 h at room temperature and then incubated overnight at 4°C with the primary antibody (diluted in in skim milk solution). Following three washing intervals of 10 min in PBS-T the membranes were incubated for 1 h at room temperature with the secondary antibody (diluted in in skim milk solution), before the membranes were washed and imaged using an in house-prepared enhanced chemiluminescent solution (0.1 M Tris-HCl [pH 8.6], 250 μ g/mL luminol, 1 mg/mL para-hydroxycoumaric acid, 0.3% H₂O₂) and the ChemoCam imaging system along with the ChemoStar Professional software (Intas Science Imaging Instruments GmbH). The following primary antibodies were used: Mouse anti-HA tag (Sigma-Aldrich, H3663, 1:2,500), mouse anti- β -actin (Sigma-Aldrich, A5441, 1:2,000), mouse anti-VSV matrix protein (Kerafast, EB0011, 1:2,500). As secondary antibody we used a peroxidase-coupled goat anti-mouse antibody (Dianova, 115-035-003, 1:10000).

Infection with authentic SARS-CoV-2

BHK-21 cells (1.6 $\times 10^5$ cells/mL) were transfected with ACE2 and DsRed as a negative control. After 24 h, cells were washed with PBS and infected with 8 $\times 10^7$ genome equivalents (GE) per 24-well of SARS-CoV-2 isolate Munich 929 for 1 h at 37°C. Calu-3 cells (5 $\times 10^5$ cells/mL) were mock treated or treated with 100 μ M camostat mesylate (Sigma Aldrich) 2 h prior to infection with SARS-CoV-2

isolate Munich 929 at a multiplicity of infection (MOI) of 0.001 for 1 h at 37°C. After infection, cells were washed three times with PBS before 500 μ l of DMEM medium was added. At 16 or 24 h post infection, 50 μ l culture supernatant was subjected to viral RNA extraction using a viral RNA kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's instructions. GE per ml were detected by real time RT-PCR using a previously reported protocol (Corman et al., 2020).

Sera

The convalescent human anti-SARS-CoV sera (CSS-2 to CSS-5) stemmed from the serum collection of the national consiliary laboratory for coronavirus diagnostics at Charité, Berlin, Germany or the Robert Koch Institute, Berlin, Germany. All sera were previously tested positive using a recombinant S-based immunofluorescence test (Buchholz et al., 2013). CSS-2 was taken from a SARS patient 3.5 years post onset of disease. CSS-3 and CSS-4 originated from a second SARS patient 24 and 36 days post onset of disease. CSS-5 was collected from a third SARS patient 10 days post onset of disease. Rabbit sera were obtained by immunizing rabbits with purified SARS-S1 protein fused to the Fc portion of human immunoglobulin.

Phylogenetic analysis

Phylogenetic analysis (neighbor-joining tree, bootstrap method with 5,000 iterations, Poisson substitution model, uniform rates among sites, complete deletion of gaps/missing data) was performed using the MEGA7.0.26 software. Reference sequences were obtained from the National Center for Biotechnology Information and GISAID (Global Initiative on Sharing All Influenza Data) databases. Reference numbers are indicated in the figures.

QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

One-way or two-way analysis of variance (ANOVA) with Dunnett posttest was used to test for statistical significance. Only p values of 0.05 or lower were considered statistically significant ($p > 0.05$ [ns, not significant], $p \leq 0.05$ [*], $p \leq 0.01$ [**], $p \leq 0.001$ [***]). For all statistical analyses, the GraphPad Prism 7 software package was used (GraphPad Software).

DATA AND CODE AVAILABILITY

The study did not generate unique datasets or code.

Supplemental Figures

Cell

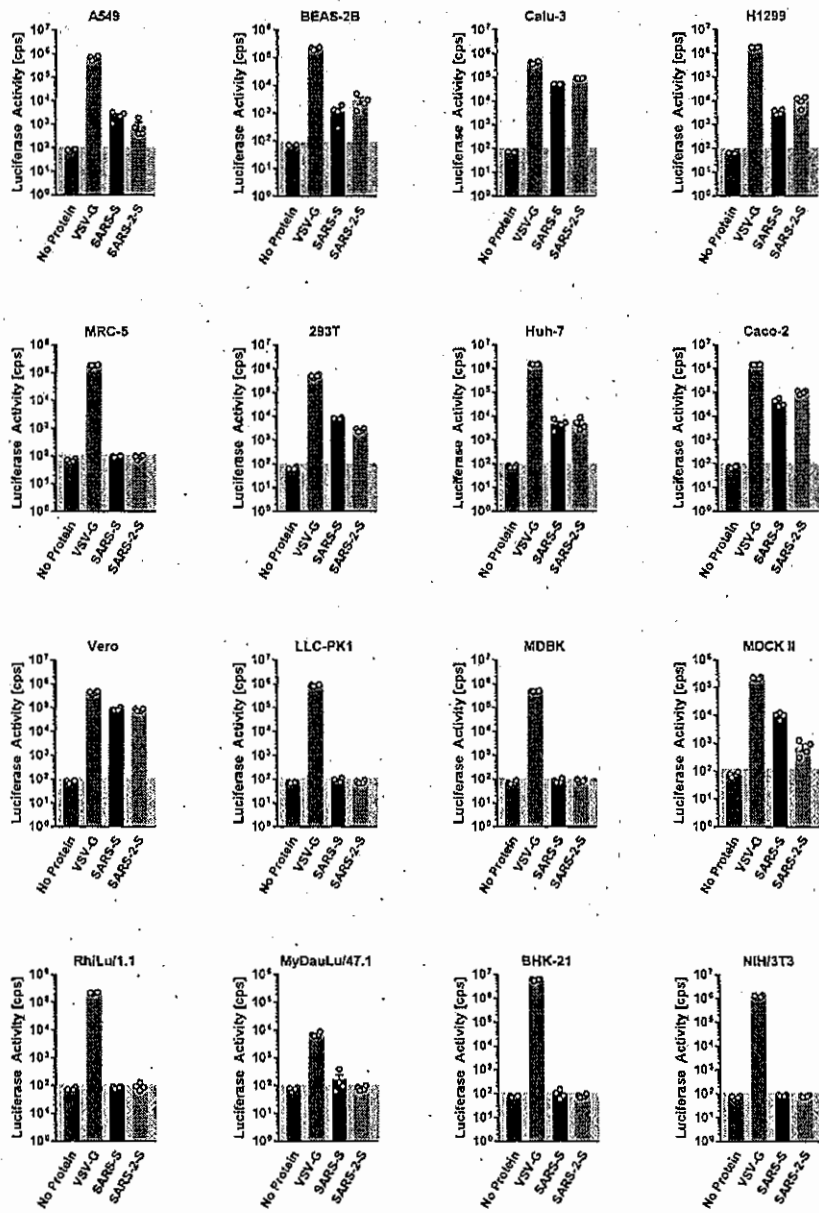


Figure S1. Representative Experiment Included in the Average, Related to Figure 1C

The indicated cells lines were inoculated with pseudoparticles harboring the indicated viral glycoprotein or harboring no glycoprotein (no protein) and luciferase activities in cell lysates were determined at 16 h posttransduction. The experiment was performed with quadruplicate samples, the average \pm SD is shown.

Sequence derived from
 Human
 Civet/
 Raccoon dog
 Bat

● Experimental proof for hACE2 usage

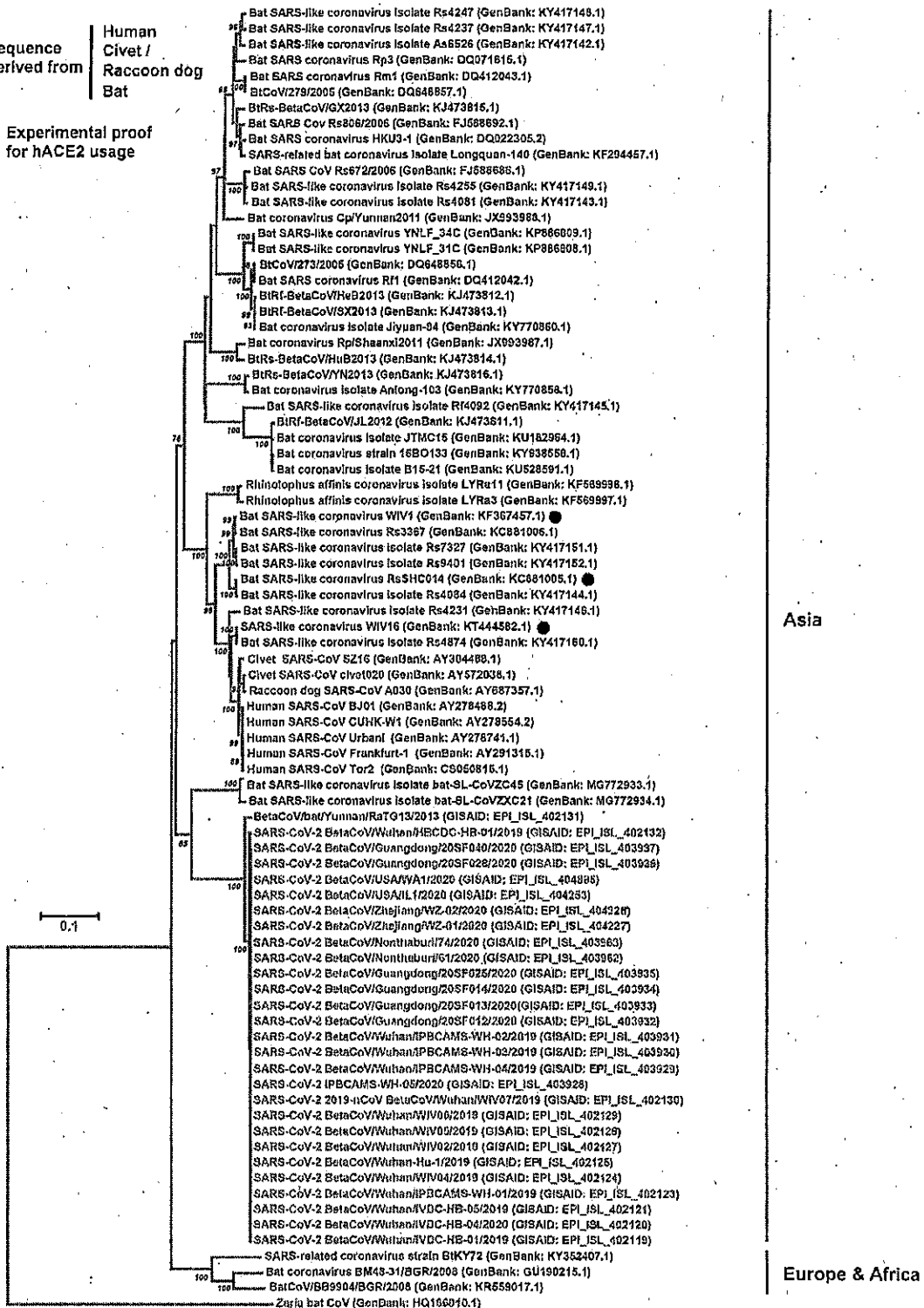


Figure S2. Extended Version of the Phylogenetic Tree, Related to Figure 2B

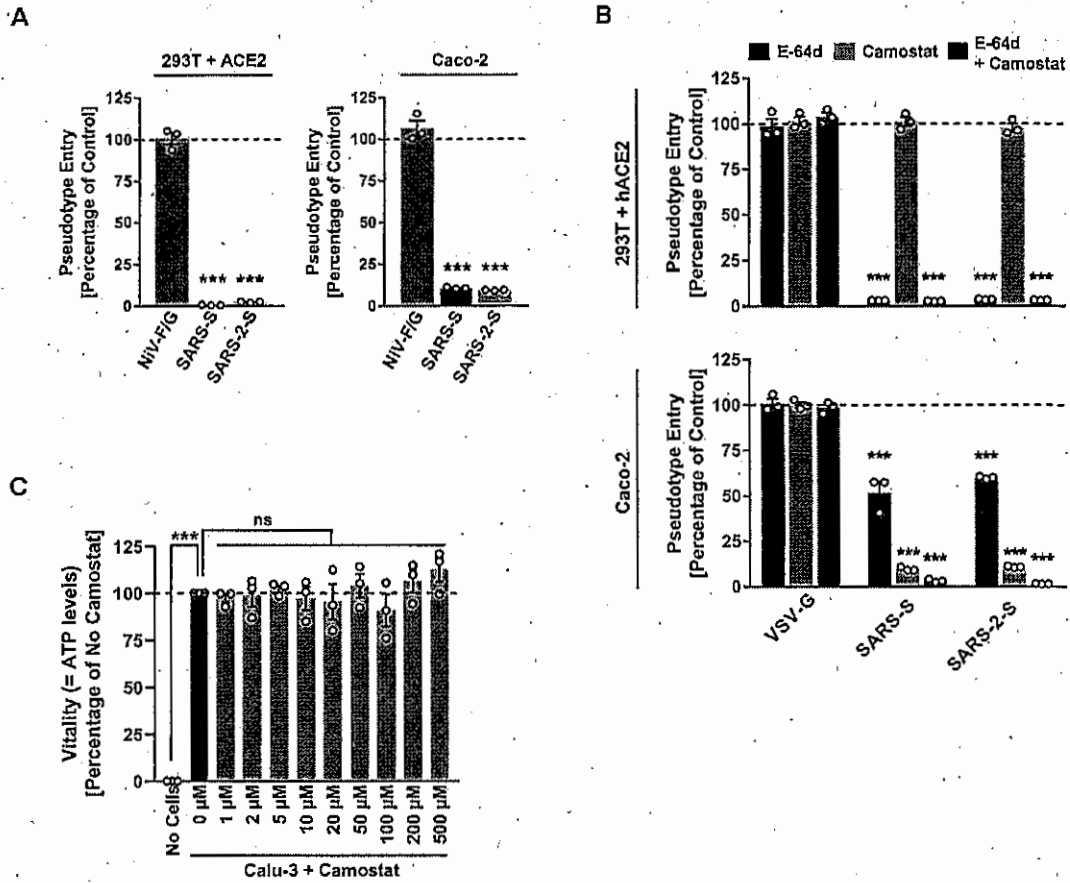


Figure S3. Protease Requirement for SARS-2-S-Driven Entry and Absence of Unwanted Cytotoxicity of Camostat Mesylate, Related to Figure 4

(A and B) Importance of endosomal low pH (A) and activity of CatB/L or TMPRSS2 (B) for host cell entry of SARS-CoV-2 was evaluated by adding inhibitors to target cells prior to transduction. Ammonium chloride (A) blocks endosomal acidification while E-64d and camostat mesylate (B) block the activity of CatB/L and TMPRSS2, respectively. Entry into cells not treated with inhibitor was set as 100%.

(C) Absence of cytotoxic effects of camostat mesylate. Calu-3 cells were treated with camostat mesylate identically as for infection experiments and cell viability was measured using a commercially available assay (CellTiter-Glo, Promega).

covid-19@fujita-hu.ac.jp <covid-19@fujita-hu.ac.jp> 2020年3月19日 11:09

高島市民病院 副院長
土居健太郎 先生
御侍史

お問い合わせありがとうございます。

アビガンも、臨床的に必要とおかんがえになられましたら、供給されるよう厚労省とつなぎますので、ご安心ください。

今回ご案内している観察研究は、社会的要請に応じ、COVID-19に対するファビピラビル（アビガン）・シクレソニド（オルベスコ）の使用状況を速報するためのものであります。薬剤投与後の診療情報を既存の情報としてWeb入力いただき、ご提供いただくという、人を対象とする医学系研究に関する倫理指針に適合した観察研究です。この速報は、日本感染症学会のホームページなどを通じて定期的に公開される予定です。なお、学術的知見を更に深めるための詳細なレジストリーは国立国際医療センター（NCGM）が別途行うこととなっております。

病院／先生のご判断でファビピラビル（アビガン）・シクレソニド（オルベスコ）を compassionate use として使用していただけます。使用に先立ち、薬剤を適応外で使用することを院内で必要な手続きを行った上で、各施設の取り扱いに準じて患者さんの同意取得をお願いします。なお、口頭同意の場合は、診療録に同意取得の旨を記載してください。

また、薬剤部の担当者の方をご紹介下さい。

研究の流れ

- 1.倫理審査関連資料をご拝読いただき、研究にご参加されるかを判断
(別添資料 1-1～1-3)
- 2.機関の長への既存の情報提供にかかる届出※を行い、写しを事務局に送付
(別添資料 2 あるいは所属医療機関書式による)
- 3.医療機関内の規定に基づき患者・薬剤ごとに適用外使用の可否を判断

※本研究では、人を対象とする医学系研究に関する倫理指針に従い、貴院を「既存試料・情報の提供のみを行う者」としているため、貴院で倫理審査委員会の意見を聴くことを求めています。情報の提供に先立ち、機関の長への届出を行ってくださいますようお願いいたします。

ファビピラビル（アビガン）の compassionate use の場合

- 4.事務局から厚労省経由で富士フィルム富山化にコンタクトの依頼

5.富士フィルム富山化学からアビガン搬入

注) 富士フィルム富山化学と別途契約締結の必要があります。富士フィルム富山化学への安全性情報提供も必要です。

6.患者同意・投与

7.CRF 記載し事務局に送付

(別添資料3：現在各学会と調整中のため後日お送りします)

注) REDCap が構築されましたら、Web 登録が可能となります。その際には改めてメール差し上げます。

なお、アビガン搬入後、使用状況などをお問い合わせすることがあります。

シクレソニド (オルベスコ) の compassionate use の場合

4.使用予定患者 1 名あたり 2 本程度を目途にオルベスコ必要数を算出

5.オルベスコ購入票をご所属の医療機関から薬剤卸に発注

(別添資料4：購入希望書)

注) シクレソニド (オルベスコ) につきましては、搬送数・在庫管理のため、薬品卸を指定しております。添付の購入希望書 (zip にも入っております) に必要量を記載の上 (1 医療機関あたり 20 本を上限として仮に設定しております。これを超える必要がある場合には、事務局にご相談ください)、薬剤部から薬剤卸のアルフレッサ (株) に Fax あるいはメールでオーダーをかけてください。アルフレッサ (株) さまとは話がついており、この観察研究のための手続きがなされます。オルベスコの費用は AMED 研究費より支出されますので、藤田医科大学に請求がなされます。

6.卸からオルベスコ搬入

7.患者同意・投与

8.CRF 記載し事務局に送付

(別添資料3：現在各学会と調整中のため後日お送りします)

注) REDCap が構築されましたら、Web 登録が可能となります。その際には改めてメール差し上げます。オルベスコ搬入後、使用状況などお問い合わせすることがあります。

統括事務局は covid-19@fujita-hu.ac.jp です。ご不明な点がございましたらお尋ねください。

※) 「SARS-CoV2 感染無症状・軽症患者におけるウイルス量低減効果の検討を目的としたファビピラビルの多施設非盲検ランダム化臨床試験およびファビピラビ

ルを投与された中等症・重症患者における臨床経過の検討を目的とした多施設観察研究」(藤田医科大学病院 湯澤病院長)