

背景説明：現在流行っている新型コロナウイルス(2019-nCov)のアウトブレイクは単離されていないサンプルも存在してなくて海外旅行者の間で思ったより感染範囲が思ったより拡大し、公共保険研究所で課題になっています。

狙い：我々はウィルスのサンプルがなくて、たくましい診断できる方法を作り出して公共保健局に配置し使用することです。

方法：人工の細胞核酸技術を使って、ここで 2019-nCov のために認定されたワークフローを差し出し、その仕組みは SARS コロナウイルスと 2019-nCov の遺伝子の近い関連を当てにします。

結果：ワークフローは 2019-nCov を正確に感知し、SARS-CoV と区別します。大学研究所と公共研究所の対等関係で人間の肺系ウイルスを含めた 297 種類のサンプルの分析を確認しています。コントロールサンプルは European Virus Archive – Global、EU インフラストラクチャープロジェクトから提出されました。

結論：この研究はユーロ研究ネットワークと大学病院と公共研究所の対等関係を大変うまく対応することを証明しています。

序論

WHO によると、2019年12月31日に WHO 中国局は病因論外の肺炎の患者が武漢市にいたと報告を受けました(1)。2020年1月7日に 2019-nCov と命名された新型コロナウイルスが病原として中国当局は発表されました。ウイルスのゲノム配列(Wuhan-Hu-1, GenBank accession number MN908947 [2])が1月10日に即公衆衛生サポートのために公開され、その後12日に GISAID のデータベースに登録された他に4つのゲノムも公開されました。

※※訳者コメント：

GenBank っていうサイトは誰でも見れるゲノムのデータベースです。研究者はゲノム配列をダウンロードし、パソコンでゲノムを作ることが出来ます（人間の液体無しで）。

このゲノム配列は2003年 SARS アウトブレイクに見つけた SARS-関連 CoV のウイルス系列にととても似ていると暗示されました[3,4]。この種類はアジアとヨーロッパにいるキクガシラコウモリで確認されている多くのウイルスも含めます。

2019年1月20日の時点で(この日付はとてもおかしい)、WHO が282人の研究所で確認された患者が報告されています[5]。武漢からの旅行者で確認されたケースはタイで1月13日と17日、日本で15日、韓国で19日に発表されています。この論文を書いている時点で人間と人間の間の感染は不透明ですが、感染はあると少しのエビデンスがあります。

もっとも優先するものは公衆衛生するために確かな検査室診断を行うことです。急性呼吸器感染症の場合、RT-PCR は肺の液体からウイルスを確認するためによく使われています。以前に大学研究所と公衆衛生研究所の対等関係で国際的な緊急健康事態の間に RT-PCR をもとにしたテクノロジーを使うことを証明しています[6-12]。その時の全ての研究は単離されたウイルスはアッセイコントロールとアッセイパフォーマンスのために主要な基質で利用出来ました。

2019-nCov の場合、単離されたウイルスか感染者からのサンプルは国際的に公開されていません。ここで単離されたウイルスがないことと患者さんからのサンプルがない場面で 2019-nCoV を診断出来るスクリーニングと特定の確認を報告します。デザインと確認は2003年の SARS-CoV に近いゲノム関連性と人工的細胞核酸テクノロジーの後援を元に使用しました。

方法：

初期段階分析のための臨床サンプルとコロナウィルス細胞培養液体

香港研究所とシャリテ大学からコロナウィルスや他の肺のウィルスの細胞培養用の液体が提供されました。肺のサンプルはシャリテ病院にいた患者さんから NxTAG 肺伝染パネル(同時に 20 種類の肺の病気を感知する分析方法) (Luminex, S' Hertogenbosch, The Netherlands)、または MERS-COV upE 分析キットで [10]より前に見つけた MERS-COV のケースです。他のサンプルは香港大学、PHE ロンドン、エラスマス大学病院の RIVM から選ばれました。全てのサンプルは瓶ありもなしも喉と鼻の綿棒と端でした。コウモリ SARS - COV サンプルを含めたフンのサンプル (GenBank で確認された番号) は実験されました: KC633203, Betacoronavirus BtCoV/Rhi_eur/BB98-98/BGR/2008; KC633204, Betacoronavirus BtCoV/Rhi_eur/BB98-92/BGR/2008; KC633201, Betacoronavirus BtCoV/Rhi_bla/BB98-22/BGR/2008; GU190221 Betacoronavirus Bat coronavirus BR98-19/BGR/2008; GU190222 Betacoronavirus Bat coronavirus BM98-01/BGR/2008; GU190223, Betacoronavirus Bat coronavirus BM98-13/BGR/2008.

この研究で使われた全ての人工 RNA は測光法で確認されました。

RNA 抽出

RNA は MagNA Pure 96 システム(Roche, Penzberg, Germany)と細胞培養液体のウィルス RNA ミニキットから抽出されました(QIAGEN, Hilden, Germany)。

リアルタイム逆転写 PCR (RT-PCR)

※Invitrogen=ドイツにある会社

25 ミクロリットル (μL) に 5 ミクロリットル RNA、2 x 反応緩衝液 12.5 ミクロリットル Platinum Taq Polymerase を含む Superscript III one step RT-PCR(Invitrogen, Darmstadt, Germany; 0.4 mM の dNTP (DNA の 4 種類のヌクレオチドを指している)と 3.2 mM 硫酸マグネシウム) 1 ミクロリットルミニキットからの逆転写/Taq の混合物、50 mM 中の 0.4 ミクロリットル硫酸マグネシウム溶液 (Invitrogen)と、ウシ胎児血清 (ウシ胎児の血) 1 マイクログラムが含まれています。最適化された液体の濃度は Table 1 で表示されています。全てのオリゴヌクレオチド (DNA または RNA の短い分子) は Tib-Molbiol(会社名、ドイツベルリン市)から人工的に作られ、提供されました。温度サイクリングは逆転写の為に 10 分間 55℃で行い、その後 3 分間 95℃で行い 45 サイクルを 15 秒間で 95℃、30 秒間 58℃で行いました。参加されている研究所は Roche Light Cycler 480III か Applied Biosystems ViiA7 道具を使用しました。(Applied Biosystems 社、中国、香港)。

実施要綱と妥当性

査定に参加した研究所はオリゴヌクレオチド (DNA または RNA の短い分子) 濃度と CT 数を含めた TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix (Thermo Fisher 社)を使用しました。QIAGEN ワンステップ RT-PCR 検査キットも実験して互換性があるとわかりました。意図された交差反応性のある SARS-CoV のウィルス RNA (2003 年) のアッセイ (分析) のお陰で外部サンプルのない 2019-nCoV RNA のアッセイを依拠しなくて許されました。

基本手順のために最初のスクリーニングツールとして E 細胞アッセイを使って、その後、RdRp 遺伝子アッセイを利用して確認する為に推奨します。2 色テクノロジーで RdRp 細胞アッセイ (分析) の適用は SARS-CoV RNA と 2019-nCoV (両検査は陽性) は SARS-CoV RNA が陽性の対照実験として使ったら区別できます。

あるいは、研究所は 2019-nCoV のみの特定の検査の RdRp アッセイを使うことも出来ます。

論理陳述

内部使用サンプルは診断の適正化の為に全ての研究所パートナーそれぞれの医療ルールに従って決定されました。

結果

2019-nCoV のケースのウィルスの塩基配列が公表する前に、SNS（ソーシャルメディア）で SARS のようなウィルスが発見されたと嘘を聞きました。その噂を信じて SARS のようなウィルスがアウトブレイクの原因だと決めつけました。2020年1月1日現在、GenBank（データベース）にあった全て完全と一部（if > 400 nt）しか載っていない SARS 関連のウィルス塩基配列をダウンロードしました。そのリスト（n = 729）は全て手動で確認され、人工の配列（研究所から得た、人工的に作られたものなど）とダブった配列は除外されて、375の配列で最終リストが出来ました。

※※訳者コメント

アラインメント（Alignment）はパソコンで研究者が作った配列をサンプルのスープにある物と合わせる作業です。サンプルから見つけたものじゃなくて、研究者が作った配列に合わせて作るので、自然に存在しないもの、研究者がパソコンで作る作業は Alignment と言います。非科学的なことです。

この配列はアラインされて、そのアラインメントはアッセイ（分析）作成に使われました

（Supplementary Figure S1）。virological.org で最初の 2019-nCoV 配列が公表されてから、2019-nCoV ゲノムに一番近い3つのアッセイが選ばれました(Figure 1)。このアラインメントは GISAID で自主的に公表された追加配列で補足され、全ての配列がとてもいいマッチングしたプライマーが確認されました。2019-nCoV、SARS-CoV、とコウモリ関連の SARS のプライマーのアラインメントは Figure 2 で表示されています。

SARS コロナウィルス粒子によるアッセイ感度

初期段階の診断感度を確認するために、Vero 細胞で培養した SARS-CoV Frankfurt-1 ウィルス粒子を含めた細胞培養の純粋化液体を使用しました。

※※訳者コメント

細胞培養の液体は色々な物が混ざったスープなので「純粋化」出来ません。詳しくは John Enders, 1954 の論文を読むとわかります。

細胞培養の液体は限外濾過され、ca 20 倍細胞培養液体から濃縮されました。濃縮ステップは裏にある核酸（例：完成ウィルス粒子じゃないウィルス RNA）を減らします。ウィルス粒子の準備は RT-PCR Drosten et al[8]で説明された RNA 定量基準を使って特定の試験管内で確認されました。全てのアッセイはそれぞれのアッセイの最終ポイントで確率的な感知回数を複製されました（Figure 3A, 3B）。全てのアッセイはとても敏感で、特に E 遺伝子と RdRp 細胞アッセイ（95%の感度で1反応で5.2と3.8コピー）でベストな効果が出ました。追加実験の為に、この2つアッセイは選ばれました。一つの外部査定に参加した研究所は他の基本の RT-PCR 試薬(TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix)を使用し感度実験を再度行い、おなじような結果を確認しました(E gene: 3.2 RNA copies/reaction (95% CI: 2.2–6.8); RdRp: 3.7 RNA copies/reaction (95% CI: 2.8–8.0). N 細胞アッセイはよく出来ましたが、感度は少し低かった為、もっと細かく実験を行いませんでした(Supplementary Figure S2)。

2019 新型コロナウイルスターゲット配列に似ている試験管内で作られた RNA による感度

両アッセイはオグリオヌクレオチド接着場所(Figure 2)で遺伝子多型無しの 2019-nCoV を感知しましたが、その上に完全定量化を完璧に合った試験管内 2019-nCoV の RNA 基準を作って検出限界 (LOD) を確認しました。初期段階の希釈液実験で感知ポイントの周りの濃度で複製した反応を確認しました。その複製した LOD の結果は、E 遺伝子アッセイは 3.9 コピー/1 反応と RdRp 遺伝子アッセイは 3.6 コピー/1 反応でした(Figure 3C and D)。ポアソン分布によって、RNA 分子が感知の予想通りにこの数字は 2.9 コピー/1 反応の 95% ヒット率に近かった。

RdRp アッセイによる SARS コロナウイルスと 2019 新型コロナウイルスの区別

SARS-CoV RNA が研究所 procedure 全体のための陽コントロールとして使われることができる正当性の後、このように 2019-nCoV RNA を取り扱う必要を不要にして、それが 2 つの調査を含むように、我々は RdRp 分析を明確に述べました：

SARS-CoV と 2019-nCoV で反応している幅広い範囲の調査と 2019-nCoV だけで反応するさらなるプローブ。希釈実験を制限することによって、我々は個別に、または、組合せで使ったかどうかにかかわらず、両方の調査が目標ウイルスごとに同じ LOD を提供したことを確認しました。

特定の調査 RdRp_SARSr-P2 は、SARS-CoV RNA でなく 2019-nCoV RNA コピーだけを見つけました。

コウモリから SARS 関連コロナウイルスの検出範囲

現在、早期発見されたケースで増大なシーケンス変異で人獣感染症の可能性があるかもしれません[5]。アッセイは他のコウモリの SARS 関連のコロナウイルスを感知できることを証明する為に、E 遺伝子アッセイを使って 6 件の Drexler et al.[13]と Muth et al. [14]から取ったコウモリ糞便サンプルをテストしました。このウイルス陽性のサンプルはヨーロッパキクガシラコウモリから取りました。この SARS 関連の CoV の中の系統発生のはズレサンプルの確認は全てのアジア系統のウイルスは確認できるでしょう。理論的に動物性のウイルス変異種の獲得でも幅広く確認できるでしょう。

特殊性実験

人工的な蛍光性の反応がないよう、非特定オリゴヌクレオチドを除外する為に、全てのアッセイは水と使っているオリゴヌクレオチド以外の核酸無しで 120 回をテストしました。全ては陽性が出ませんでした。

他のコロナウイルスとの交差反応性

(HCoV)229E, NL63, OC43, HKU1 と MERS-CoV を含めた全ての細胞培養液体は 2 回も 3 種のアッセイでテストされました。栽培できない HCoV-HKU1 の場合は人間気道栽培が使われました。全てのサンプルのウイルス RNA 濃度は転写された RNA 基準を使って定量化のウイルス量を RT-PCR と試験管内で確認されました。他に薄めていない (定量化されていない) 細胞培養液体がテストされたことは Table 2 でまとめました。これらは陰性の唾サンプルと混ぜられました。テストされたウイルスはどのアッセイでも陽性反応は出ませんでした。

他の呼吸器ウイルスの予備実験サンプルによる 2019 新型コロナウイルスの排他性

E と RdRp 遺伝子アッセイを使って、診断を協力している 5 箇所の研究所から 297 件の呼吸器疾患のサンプルをテストしました (ドイツに 1 箇所、オランダに 2 箇所、香港に 1 箇所、イギリスに 1 箇所)。

※※訳者コメント

呼吸器疾患という病気は SARS や他の「コロナウイルス」に関係のない病気なのにサンプルをテストす

ることはおかしくないですか？更に、中国でも正式に発見されていない「ウィルス」なのになぜドイツやイギリスでサンプルをテストできますか？中国ではっきりわかっていないのに？

我々は、（ドイツ、香港、オランダ）の大学病院の集中治療室、一般病院と小児科の患者さんから198件のサンプルを選びました。残りのサンプルは監視研究をした衛生保健局（RIVM, PHE）からもらい、その中の主に医者から提出されました。このサンプルは一番幅広く呼吸器病原体の範囲が含まれ、この国の研究所でのウィルスの量の一般範囲内を示されています（Table 2）。全体でこのテストは偽陽性はありませんでした。4件のテスト反応で弱い最初の反応性が見られましたが、同じアッセイで再テストで陰性が出ました。この合図は特定のウィルスと関係する物じゃなくて、陽性反応が出たウィルスでも他のサンプルで同じウィルスでより高い濃度はありましたが陽性反応は出ませんでした。この上で説明した広い範囲の条件の結果はこの研究のケミカルの不安定性じゃなくてこんな早く新しいテストとコントロールの操作問題だと思われます。

討論

このレポートは実物のウィルス核酸のサンプルのない環境で新しい診断の成立を示しています。有効なアッセイ作成は中国の研究者の正式発表よりゲノムの情報を分担して頂いたお陰で出来て、それに15年間の動物性のSARS関連ウィルスの知識を利用できるようにして頂いたことで作れました。2003年のSARS-CoVに比べてこんな簡単にこのウィルスの為にアッセイを作れてウィルスゲノムの多様性と病原体の自然環境は共同の研究はとても価値があると証明しています[8,15-17]。

リアルタイムRT-PCRはウィルス学で広く使われています。公衆衛生の緊急事態の場合、アッセイが公表する前に研究所は新しくとても信用性の高い診断テストを作れるでしょう。試薬とオグリオヌクレオチドと陽コントロールの他に、品質管理プログラム下で研究所は外部テストのデータとアッセイ書類に頼りにならないといけません。EVA gプロジェクトで大学研究コレクションからのウィルス関連試薬おコントロールRNAテンプレートはうまく実施するように提供します[18]。SARS-CoVのRNAは今回のアウトブレイクよりEVA gから獲れて、ここで説明されたRNA転写物などの製品は2020年1月14日より前EVA gのオンラインカタログ(<https://www.european-virus-archive.com>)から入手可能でした。と細胞培養の原料と人工の物による技術条件データと、75件のサンプルの排他性テストからの結果はWHOに2020年1月13日に最初の診断テスト（PCR）を含めて提出されました。非公式の研究所の効率のいい協力によって、このデータは1週間以内に自然感染のサンプルの広い範囲の呼吸器病原体のテストは利用されました。普段の評価研究は試験管内の診断アッセイは法律的な導入や構成がアウトブレイクのピークを過ぎて、数ヶ月がかかります。今回の早さと効率のいい導入と診断は大学研究所と公衆研究所の協力は国際的な公衆衛生危機で最近の数年に創立されたヨーロッパ研究ネットワークや国立研究所で可能にさせられました[18-22]。この研究所容量は急な公衆衛生の問題だけでなくすぐに研究に患者を参加させることも出来ます。