

明 細 書

発明の名称： コロナウイルス感染性細胞及びその調製方法

技術分野

[0001] 本発明は、コロナウイルスの感染を評価するための細胞、その調製方法、及び該細胞を用いたコロナウイルスの感染の評価方法などに関する。

背景技術

[0002] 現在、全世界で猛威を振るうC o v i d 1 9 感染症候群に対して、治療薬・ワクチンの開発が行われている。このような開発において、C o v i d 1 9 感染症候群の原因ウイルスであるS A R S - C o V - 2 を継続的に増殖させる必要があり、そのために、S A R S - C o V - 2 を宿主細胞へ感染させることが必要となる。

[0003] 現在、S A R S - C o V - 2 は、アフリカミドリザル腎臓由来のV e r o E 6 細胞をはじめとして、腸管由来、胆管由来や肝臓由来の種々の細胞で感染・増殖することが報告されている（非特許文献1，2，3）。しかしながら、サイトカインの産生源となるヒトの血球系の免疫細胞におけるS A R S - C o V - 2 の感染モデルの報告は、いまだなされていない。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献1：P N A S， 2 0 2 0 M a r， 1 1 7 (1 3) 7 0 0 1 - 7 0 0 3

非特許文献2：C e l l S T E M C E L L， 2 0 2 0 J u l y 2 7， 1 2 5 - 1 3 6

非特許文献3：S c i e n c e， 2 0 2 0， 3 6 9， 5 0 - 5 4

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 本発明は、上記従来技術の有する課題に鑑みてなされたものであり、S A R S - C o V - 2 などのコロナウイルスの感染研究を行うヒト細胞として、

安定的にコロナウイルスを感染させることができるヒト細胞を提供することを目的とする。

[0006] 本発明はまた、サンプル中のコロナウイルスの存在を確認する方法、及びコロナウイルスの製造方法や被検サンプルの抗コロナウイルス活性もしくは被検サンプル中の抗コロナウイルス中和作用を有する物質の有無を評価する方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、SARS-CoV-2の感染に適した細胞について検討を行った結果、iPS細胞などに由来する増殖可能な不死化ヒト単球にACE2及びTMPRSS2を導入することにより、コロナウイルスが効率的に感染及び増殖する細胞を調製することに成功した。また、調製された細胞へのコロナウイルスの感染は炎症性サイトカインの産生を引き起こした。更に、本発明者らは、得られた細胞を分化させることにより、コロナウイルスの感染に伴うウイルス増殖やサイトカイン放出量が増加することを見出した。よって、これらの細胞を利用することにより、ウイルスレベルの増加及び／又は炎症性サイトカインの産生量を指標にウイルスの存在を確認可能であることを見出した。

[0008] 具体的には、本発明は以下の発明に関する。

(1) ACE2及びTMPRSS2をヒト不死化ミエロイド系細胞に導入することを含む、コロナウイルス感染性ヒト不死化ミエロイド系細胞の調製方法。

(2) 前記ヒト不死化ミエロイド系細胞が、M-CSF及び／又はGM-CSFを発現する細胞である、(1)に記載の調製方法。

(3) 前記不死化ミエロイド系細胞にM-CSF及び／又はGM-CSFを導入すること、及び、

得られたM-CSF及び／又はGM-CSFを発現する不死化ミエロイド系細胞にACE2及びTMPRSS2を導入することを含む、(1)に記載の調製方法。

(4) 前記ACE2及び前記TMPRSS2がレンチウイルスにより導入されることを特徴とする、(1)～(3)のいずれか1項に記載の調製方法。

(5) 前記ヒト不死化ミエロイド系細胞が、ヒト不死化単球である、(1)～(4)のいずれか1項に記載の調製方法。

(6) (5)の方法により得られたヒト不死化単球を樹状細胞へと分化させることを含む、ACE2及びTMPRSS2を発現する樹状細胞の調製方法。

(7) 前記コロナウイルスが、SARS-CoV-2である、(1)～(6)のいずれか1項に記載の調製方法。

(8) ACE2及びTMPRSS2を発現するヒト不死化ミエロイド系細胞。

(9) さらに、M-CSF及び／又はGM-CSFを発現する、(8)に記載のヒト不死化ミエロイド系細胞。

(10) 前記ヒト不死化ミエロイド系細胞が、ヒト不死化単球である、(8)又は(9)に記載の細胞。

(11) 前記ヒト不死化ミエロイド系細胞が、ヒト樹状細胞である、(8)又は(9)に記載の細胞。

(12) (9)～(11)のいずれか1項に記載のヒト不死化ミエロイド系細胞の培養液にサンプルを添加すること、及び

前記細胞の培養上清中のコロナウイルスを検出すること、又はコロナウイルスのレベルを測定することを含む、サンプル中のコロナウイルスの存在を判定する方法。

(13) 前記培養上清中の前記コロナウイルスの検出又は前記コロナウイルスのレベルの測定が、前記サンプルの添加から1～7日目に行われる、(12)に記載の方法。

(14) 前記コロナウイルスの検出又はコロナウイルスのレベルの測定が前記コロナウイルスのRNAの検出又はコロナウイルスのRNAレベルの測定により行われる、(12)又は(13)に記載の方法。

(15) 前記コロナウイルスのRNAの検出又はコロナウイルスのRNAレベルの測定が、定量PCRにより行われる、(14)に記載の方法。

(16) 前記コロナウイルスの検出又はコロナウイルスのレベルの測定が、前記培養上清中の炎症性サイトカインの検出又は炎症性サイトカインレベルの測定により行われる、(12)又は(13)に記載の方法。

(17) 前記炎症性サイトカインがIL-6である、(16)に記載の方法。

(18) (9)～(11)のいずれか1項に記載のヒト不死化ミエロイド系細胞の培養液にコロナウイルスを添加して該細胞に感染させること、及び前記細胞の前記培養液中のコロナウイルスを回収することを含む、コロナウイルスの製造方法。

(19) 前記培養液中の前記コロナウイルスの回収が、前記コロナウイルスの添加から1～7日目に行われる、(18)に記載の方法。

(20) 被検サンプルの抗コロナウイルス活性の評価方法であって、前記被検サンプルの存在下で(9)～(11)のいずれか1項に記載のヒト不死化ミエロイド系細胞の培養液にコロナウイルスを添加すること、及び前記細胞の培養上清中の前記コロナウイルスのレベルを測定することを含み、

ここで、前記被検サンプルの存在下で前記コロナウイルスを添加した前記培養上清中の前記コロナウイルスのレベルが、前記被検サンプルの非存在下で前記コロナウイルスを添加した前記培養上清中のコロナウイルスのレベルよりも低い場合、該被検サンプルは抗コロナウイルス活性作用を有すると評価される方法。

(21) 被検サンプル中にコロナウイルス中和作用を有する物質が含まれるか否かを同定する方法であって、

前記被検サンプルの存在下で(9)～(11)のいずれか1項に記載のヒト不死化ミエロイド系細胞の培養液にコロナウイルスを混和すること、及び前記細胞の培養上清中の前記コロナウイルスのレベルを測定することを含

み、

ここで、前記被検サンプルの存在下で前記コロナウイルスを添加した前記培養上清中の前記コロナウイルスのレベルが、前記被検サンプルの非存在下で前記コロナウイルスを添加した前記培養上清中のコロナウイルスのレベルよりも低い場合、該被検サンプルはコロナウイルス中和作用を有する物質を含有すると評価される方法。

(22) 前記被検サンプルが、血液サンプルである、(21)に記載の方法。

(23) 前記コロナウイルス中和作用を有する物質が、コロナウイルス中和抗体である、(21)又は(22)に記載の方法。

(24) コロナウイルスワクチンの中和抗体誘導能の評価方法であって、当該ワクチンを接種された哺乳動物由来の血液サンプルを被検サンプルとして(22)又は(23)に記載の方法を実施することを含む、方法。

(25) 前記培養上清中の前記コロナウイルスのレベルの測定が、前記被検サンプル又は前記サンプルの添加から1～7日目に行われる、(20)～(24)のいずれか1項に記載の方法。

(26) 前記コロナウイルスの検出又はコロナウイルスのレベルの測定が前記コロナウイルスのRNAの検出又はコロナウイルスのRNAレベルの測定により行われる、(20)～(25)のいずれか1項に記載の方法。

(27) 前記コロナウイルスのRNAレベルの測定が、定量PCRにより行われる、(26)に記載の方法。

(28) 前記コロナウイルスのレベルの測定が、前記培養上清中の炎症性サイトカインレベルの測定により行われる、(20)～(25)のいずれか1項に記載の方法。

(29) 前記炎症性サイトカインがIL-6である、(28)に記載の方法。

発明の効果

[0009] 本発明の細胞を使用することで、コロナウイルス感染性ヒト細胞を安定的

に供給することが可能となる。これにより、ヒト免疫系の細胞を使用してコロナウイルスの感染研究を行うことができる。またコロナウイルスの感染性を有する細胞を安定的に提供することができる。本発明のコロナウイルス感染性ヒト不死化ミエロイド系細胞を使用することで、SARS-CoV-2などのコロナウイルスをヒト免疫系細胞に感染させることが可能となり、よりヒト生体内に近い条件でコロナウイルスの感染を評価することができる。また、本発明のコロナウイルス感染性細胞を使用することにより、*in vitro*でのウイルスの感染実験が可能となる。これによりコロナウイルスがヒト免疫系細胞に感染するメカニズムや、免疫細胞が関与する増悪化やサイトカインストームを引き起こすメカニズムの解明に利用することができる。さらに、本発明により提供されるコロナウイルス感染性細胞は、治療薬やワクチンの開発に利用することができる。

図面の簡単な説明

[0010] [図1A]作製したヒト不死化ミエロイド細胞（K-ML2）及び、IL-4により誘導作製した樹状細胞における特徴的な細胞表面マーカーとして、フローサイトメーターでCD14、CD54、CD209の変化を測定した測定値である。

[図1B]作製したヒト不死化ミエロイド細胞（K-ML2）のギムザ染色図である。

[図2]調製したヒト不死化ミエロイド細胞（K-ML2）における、各種遺伝子（ACE2、TMPRSS2、ADAM17）の発現量を定量PCR法により確認した転写産物の電気泳動写真である。

[図3]TMPRSS2遺伝子と薬剤耐性遺伝子を含むベクターで遺伝子導入したK-ML2（TMPRSS2 transduction；下写真）、及び該遺伝子非導入K-ML2（Non-treated；上写真）を薬剤存在下で培養後の細胞の写真である。

[図4]K-ML2、及びTMPRSS2遺伝子を導入したK-ML2（K-ML2/TMPRSS2）における、TMPRSS2のRNA量を定量PCR

で測定した結果を表すグラフである。左図は1サンプルあたりのコピー数を示し、右図は該コピー数をK-ML 2で測定されたコピー数で除した数値（倍率変化）を示す。グラフの横軸は、細胞名を示し、グラフの縦軸はTMPRSS2のRNAのコピー数（左図）、及び倍率変化（右図）を示す。

[図5] ACE 2 及び TMPRSS 2 遺伝子を導入したヒト不死化ミエロイド細胞（K-ML 2 / TMPRSS 2 / ACE 2）における、ACE 2 のRNA量を定量PCRで測定した結果を表すグラフである。左図は1サンプルあたりのコピー数を示し、右図は該コピー数をK-ML 2で測定されたコピー数で除した数値（倍率変化）を示す。グラフの横軸は、細胞名を示し、グラフの縦軸はACE 2 のRNAのコピー数（左図）、及び倍率変化（右図）を示す。

[図6A] ACE 2 及び TMPRSS 2 を発現するK-ML 2（K-ML 2 / TMPRSS 2 / ACE 2）、及びK株由来のM-CSF及びGM-CSF発現ヒト不死化ミエロイド系細胞（K-ML 2）に、濃度依存的にSARS-CoV-2ウイルスを感染させてから3日目のウイルス量を示すグラフである。ポジティブコントロールとして、TMPRSS 2 発現Vero細胞（Vero / TMPRSS 2）を用い、ネガティブコントロール（None）として、細胞を含有しない培地にウイルスを播種した。横軸は、ウイルス添加時（0日目）のSARS-CoV-2のウイルス濃度（copy / μ L）を示し、縦軸は、培養3日目に定量PCRにより測定した培養上清中のSARS-CoV-2のウイルス濃度（copy / μ L）を示す。

[図6B] 図6AにおいてSARS-CoV-2ウイルス（ 1×10^3 copy / μ L）感染させたときのウイルス増殖能を解析した結果である。図6Aのネガティブコントロール（None）の値を1として、図6AのACE 2 及び TMPRSS 2 を発現するK-ML 2（K-ML 2 / TMPRSS 2 / ACE 2）、及びK株由来のM-CSF及びGM-CSF発現ヒト不死化ミエロイド系細胞（K-ML 2）における培養上清中のウイルス濃度の割合として示した。横軸はサンプル名を示し、縦軸は、各細胞における培養上清中の

ウイルス濃度を、細胞を含有しない培地に添加したサンプル中のウイルス量で除した値 (Fold expression (relative to no TD)) を示す。

[図7] M-CSF 及び GM-CSF 発現ヒト不死化ミエロイド系細胞 (My1c; K-ML2), My1c を分化させることにより得られた樹状細胞 (My1c-DC), ACE2 及び TMPRSS2 を発現する My1c (cMy1c), 並びに cMy1c を分化させることにより得られた樹状細胞 (cMy1c-DC) に SARS-CoV-2 を感染させてから3日目の培養上清中のウイルス量を示すグラフである。ポジティブコントロールとして, TMPRSS2 発現 Vero 細胞 (Vero/TMPRSS2) を用い, ネガティブコントロール (None) として, 細胞を含有しない培地を使用した。横軸は, ウイルス添加時 (0日目) の SARS-CoV-2 ウイルス濃度 (copy/μL) を示し, 縦軸は, 培養72時間後に定量PCRにより測定した SARS-CoV-2 ウイルス濃度 (copy/μL) を示す。

[図8] My1c, My1c-DC, ACE2 及び TMPRSS2 を発現する, M-CSF 及び GM-CSF 発現ヒト不死化ミエロイド系細胞 (cMy1c), 及び該細胞を分化させることにより得られた樹状細胞 (cMy1c-DC) に SARS-CoV-2 を添加し, これらの細胞を72時間培養することにより得られた培養上清中の IL-6 の産生量を ELISA によって測定したグラフである。グラフの縦軸は, ELISA の測定値を示し, グラフの横軸は, 72時間培養した上清の希釈率を示す。例えば, cMy1c-DC において, 白色抜き点の線グラフはあらかじめ Vero 細胞にて培養した SARS-CoV-2 ウイルスを含む上清を100倍希釈 (×100) し cMy1c-DC に添加後, 72時間培養したのち, 上清をそのまま ELISA で測定した群 (横軸100) は縦軸1.10程度を示し, 上清を測定前に10倍希釈した群 (横軸10) は, 縦軸0.20程度を示した。

発明を実施するための形態

[0011] <用語の定義>

本明細書において、「ミエロイド系細胞」は、骨髓細胞とも呼ばれ、CD 11b分子又はCD 33分子を発現する細胞として定義され、その由来は特に限定されるものではないが、例えば、多能性幹細胞に由来するミエロイド系細胞、又は生体（例えば、末梢血）から採取されたミエロイド系細胞がある。具体的には、ミエロイド系細胞としては、白血球の顆粒球細胞（好中球、好酸球、好塩基球）、単球、樹状細胞、マクロファージ、又はこれらの細胞に分化することが運命づけられているより未分化な細胞（ミエロイド前駆細胞等）が挙げられる。

[0012] 本明細書において、「コロナウイルス」は、コロナウイルス科に属する一本鎖RNAウイルスとして定義され、発熱、空咳等の呼吸器感染症を起こす。具体的には、SARS-CoV, SARS-CoV-2, 中東呼吸器症候群関連ウイルス (MARS-CoV), HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63, HCoV-HKU1等が挙げられるが、好ましくは、SARS-CoV-2である。また、コロナウイルスはヒトに限らず家畜やペット、野生動物などにも感染する種類も含まれる。ヒト以外に感染するコロナウイルスとして具体的には、ブタ流行性下痢ウイルス (PEDV) や猫伝染性腹膜炎ウイルス (FIPV) 等も挙げられる。例えば、SARS-CoV-2としては、神奈川県衛生研究所で分離された「SARS-CoV-2/Hu/DP/Kng/19-020 (GenBank: LC528232)」を用いることができる。

[0013] 本明細書において、「コロナウイルス感染性」とは、コロナウイルスによる感染を受ける能力を意味する。よって、コロナウイルス感染性細胞とは、コロナウイルスにより感染を受ける細胞を意味する。

[0014] 本明細書において、「レベル」とは、数値化された存在量に関する指標を意味し、例えば、濃度、量あるいはその代わりとして用いることができる指標を含む。また、レベルは、絶対的な数値（すなわち、測定された存在量）であってもよいし、又は必要に応じて設定された対照と比較した相対的な数値であってもよい。

[0015] <コロナウイルス感染性ヒト不死化ミエロイド系細胞の調製方法>

一態様において、本発明は、ACE2及びTMPRSS2をヒト不死化ミエロイド系細胞に導入することを含む、コロナウイルス感染性ヒト不死化ミエロイド系細胞の調製方法に関する。本方法で使用するヒト不死化ミエロイド系細胞は、不死化単球であってもよく、又は不死化単球にM-CSF及びGM-CSFを導入することにより調製された細胞であってもよい。

[0016] 単球の調製は、末梢血から採取する方法、多能性幹細胞から分化誘導させる方法、繊維芽細胞などの他の体細胞を未分化状態としてから分化誘導させるか、あるいはダイレクトリプログラミングにより直接分化誘導する方法により行うことができる。

[0017] 末梢血から単球を採取する場合、ヒトの末梢血中のCD14分子を発現する細胞として、公知の分離・調製方法により単球を得ることができる。例えば、ヒト末梢血を等量の生理的食塩水、リン酸緩衝生理的食塩水、又は、ハンス緩衝溶液などで穏やかに希釈し、遠心管中のフィコール（登録商標）（GEヘルスケア社）上に静かに積層し、15～30℃、500～1000×gで20分間遠心分離して、黄色がかった血漿と透明のフィコールとの中間の白い帯状の層をリンパ球・単球から成る末梢血単核細胞（PBMC）画分として回収することができる。回収された末梢血単核細胞画分は必要に応じて更に洗浄して用いてもよい。回収されたPBMC画分から更にCD14分子を発現する細胞を回収することにより、単球を得ることができる。例えば、抗CD14抗体が結合している固相とPBMCとを接触させて当該固相に単球を結合させ、非結合の細胞を洗浄して除去することにより、単球を分離回収することができる。例えば、このような固相として磁気ビーズを用いる方法などが知られている（Dynabeads（登録商標）CD14（Thermo Fisher Scientific Inc.）など）。また、末梢血からPBMCを分離することなく、末梢血を直接抗CD14抗体が結合している固相と接触させることにより単球を得ることもできる。

[0018] 単球を多能性細胞から分化させて得る場合、多能性細胞から単球を誘導す

る方法は公知である。本明細書において、「多能性幹細胞」とは、多能性及び自己複製能を有する細胞を意味する。本明細書において、「多能性」とは、多分化能と同義であり、分化により複数の系統の細胞に分化可能な細胞の状態を意味する。本明細書における「多能性幹細胞」は、幹細胞、胚性幹（ES）細胞、核移植により得られるクローン胚由来の胚性幹細胞（「nt ES細胞」）、生殖幹細胞（「GS細胞」）、胚性生殖細胞（「EG細胞」）、及び人工多能性幹（iPS）細胞、及び造血幹細胞を含む。ある細胞が多能性幹細胞であるかどうかは、たとえば、被検細胞が体外培養系において胚様体（embryoid body）を形成する場合、又は、分化誘導条件下で培養（分化処理）した後に所望の細胞に分化する場合、当該細胞は多能性幹細胞であると判定することができる。

[0019] 多能性幹細胞から単球への分化誘導は、例えば、マクロファージコロニー刺激因子（M-CSF）及びインターロイキン3（IL-3）（Fernando O. Martinezら、Experimental Hematology（2008）；36：1167-1175参照）、IFN- γ 又はPMA（Annabelle Grolleauら、J Immunol 1999；162：3491-3497参照）、あるいはマクロファージコロニー刺激因子（M-CSF）及び顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）（WO2012/043651、特開2017-131136及び特開2018-171005参照）を多能性幹細胞に接触させることにより行うことができる。分化誘導された単球は必要に応じて前述の方法によりCD14を発現する細胞のみ回収して精製してもよい。

[0020] 単球の不老化は、上述により得られた単球に、BMI1遺伝子、EZH2遺伝子、MDM2遺伝子、MDM4遺伝子、HIF1A遺伝子、BCL2遺伝子、及びLYL1遺伝子から選択される少なくとも1つの遺伝子と、cMYC遺伝子とを導入することにより、単球の機能を維持しながら増殖能を付加させて行うことができる。好ましくは、BMI1遺伝子、EZH2遺伝子、MDM2遺伝子、MDM4遺伝子、及びBCL2遺伝子から選択される少

なくとも1つの遺伝子と、cMYC遺伝子との組み合わせか、あるいは、B
M11遺伝子とcMYC遺伝子との組み合わせを使用する。単球へのこれら
の遺伝子の導入は、WO2012/043651及び特開2017-131
136号の記載を参酌して行うことができる。遺伝子の導入は、以下に記載
の遺伝子の導入方法により行うことができる。

[0021] 不死化単球は、更にM-CSF及びGM-CSFを導入することにより、
その増殖能を維持することができる。よって、本発明の方法は、不死化ミエ
ロイド細胞又は不死化単球に、更にM-CSF及びGM-CSFを導入する
ことを含んでもよい。あるいは、不死化ミエロイド細胞又は不死化単球
単球としてM-CSF及びGM-CSFを発現する細胞を使用してもよい。
不死化ミエロイド細胞又は不死化単球単球へのこれらの遺伝子の導入は、特
開2018-171005の記載を参酌して行うことができる。

[0022] 上述で得たヒト不死化単球に対して、以下の遺伝子の導入方法に記載した
方法に従い、ACE2及びTMPRSS2の遺伝子を導入することによって
コロナウイルス感染性ヒト不死化ミエロイド系細胞を調製することができる。
より具体的には、これらの遺伝子は、レンチウイルスベクターにより導入
されてもよい。

[0023] ACE2は、アンジオテンシン変換酵素IIの略称であり、心血管ホメオ
スタシスの重要な調節因子であるレニン-アンジオテンシンホルモン系の必
須の逆調節性カルボキシペプチダーゼである。ヒトACE2タンパク質は代
表的には表2又は配列番号10に記載のアミノ酸配列を有する。

[0024] TMPRSS2は、II型膜貫通型セリンプロテアーゼの略称であり、前
立腺の正常な生理学的機能に関連するタンパク質分解カスケードに関与する
原形質膜に固定されたセリンプロテアーゼである。ヒトTMPRSS2タン
パク質は代表的には表2又は配列番号8に記載のアミノ酸配列を有する。

[0025] なお、細胞に導入されるACE2及びTMPRSS2は、導入された細胞
がコロナウイルスに対する感染性を獲得し又は感染性が向上する限り、その
アイソフォーム及びバリエーション、1～5個又は1～3個のアミノ酸が置換さ

れ、挿入され、欠失し、又は付加された変異体、あるいは、導入されるACE2及びTMPRSS2は、前記ACE2及びTMPRSS2と80%又はそれ以上、85%又はそれ以上、90%又はそれ以上、95%又はそれ以上、98%又はそれ以上、又は99%又はそれ以上の同一性を有する変異体であってもよい。

[0026] 例えば、ACE2は、ADAM17により切断されてコロナウイルスとの結合が阻害されることから、ADAM17による切断サイトに変異を有するACE2を用いてもよい。このような変異の例としては、表2の配列番号10に記載のアミノ酸配列における706番目のメチオニンがプロリンに置換された変異を挙げることができる。また、アミノ酸配列における26、27番目のリジン及びトレオニンの変異が、ACE2に対するSARS-CoV-2の結合を増強させる報告があることから([doi:https://doi.org/10.1101/2020.04.07.024752](https://doi.org/10.1101/2020.04.07.024752))、ACE2は、配列番号10の26番目のリジンがアルギニンに置換され、かつ/又は27番目のトレオニンがプロリンに置換されていてもよい。また、ACE2とSARS-CoV-2との結合能を高めるために、ACE2の584番目のロイシンをアラニンに置換した変異体を用いることができる(*Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2009 Jul; 297(1): L84-96.)。

[0027] <遺伝子の導入方法>

公知の方法を用いて行うことができ、所望の効果がもたらされる限り、その方法は特に制限されない。遺伝子の導入方法としては、例えばウイルス、プラスミド、人工染色体などのベクターを用いて、あるいはリポフェクション、リポソーム、マイクロインジェクション、エレクトロポレーションなどの手法によって、細胞内に所望の遺伝子を導入する方法を挙げることができる。ウイルスベクターとしては、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター(以上、*Cell*, 126, pp. 663-676, 2006; *Cell*, 131, pp. 861-872, 2007; *Science*, 31

8, pp. 1917-1920, 2007), アデノウイルスベクター (Science, 322, 945-949, 2008), アデノ随伴ウイルスベクター, センダイウイルスベクター (WO2010/008054) などが例示される。また, 人工染色体ベクターとしては, 例えばヒト人工染色体 (HAC), 酵母人工染色体 (YAC), 細菌人工染色体 (BAC, PAC) などが含まれる。プラスミドとしては, 哺乳動物細胞用プラスミドを使用しうる (Science, 322: 949-953, 2008)。トランスポゾンを用いて非ウイルス的に, 目的の核酸を宿主細胞のゲノムに組み込むことができ, 例えば, PiggyBacベクターなどを使用できる。

[0028] ベクターには, 所望の遺伝子が発現可能なように, プロモーター, エンハンサー, リボゾーム結合配列, ターミネーター, ポリアデニル化サイトなどの制御配列を含むことができ, さらに, 必要に応じて, 薬剤耐性遺伝子 (例えばカナマイシン耐性遺伝子, アンピシリン耐性遺伝子, ピューロマイシン耐性遺伝子, ネオマイシン耐性遺伝子など), 選択マーカー配列 (例えば, チミジンキナーゼ遺伝子, ジフテリアトキシン遺伝子など), レポーター遺伝子配列 (例えば, 緑色蛍光タンパク質などの蛍光タンパク質伝子, β -ガラクトシダーゼ遺伝子, ルシフェラーゼ遺伝子など) などを含むことができる。

[0029] また, ベクターは, 染色体への組み込みがなくとも複製されて, エピソーマルに存在するように, 哺乳動物細胞で機能的な複製開始点と, 該複製開始点に結合して複製を制御するタンパク質をコードする遺伝子を有していてもよい。哺乳動物細胞で機能的な複製開始点と, 該複製開始点に結合して複製を制御するタンパク質の例としては, EBVにあっては複製開始点oriPとEBNA-1遺伝子, SV40にあっては複製開始点oriとSV40 large T antigen遺伝子などが挙げられる (WO2009/115295, WO2009/157201及びWO2009/149233)。また, 複数の所望の遺伝子を同時に導入するために, ポリシストロニックに発現させる発現ベクターを用いてもよい。ポリシストロニックに発現

させるためには、遺伝子をコードする配列の間は、Internal Ribosome Entry Site (IRES) 又は口蹄病ウイルス (FMDV) 2Aコード領域により結合されていてもよい (Science, 322:949-953, 2008及びWO2009/0920422009/152529)。

[0030] 目的の遺伝子が導入された細胞は、ベクターが薬剤耐性遺伝子を有する場合、細胞内に組み込まれた薬剤耐性遺伝子に対応する薬剤の存在下で遺伝子導入細胞を培養し、生存した細胞として得ることができる。また、ベクターがレポーター遺伝子を有する場合、細胞内に組み込まれたレポーター遺伝子に対応した発光又は蛍光アッセイを行い、発光又は蛍光を生じた細胞として得ることができる。このような、発光又は蛍光アッセイは、市販のキットを用いて行われてもよい。また、例えば、細胞から抽出したDNAを鋳型として定量PCRを行うことにより、細胞中の目的遺伝子のmRNAの発現が確認された細胞を目的の遺伝子が導入された細胞としてもよい。定量PCRは、市販のキットを用いて行われてもよい。あるいは、細胞が産生する目的タンパク質をELISA等により検出して、目的遺伝子のタンパク質の発現が確認された細胞を目的の遺伝子が導入された細胞としてもよい。

[0031] <コロナウイルス感染性ヒト不死化ミエロイド細胞>

本発明の一態様は、ACE2及びTMPRSS2を発現するヒト不死化ミエロイド細胞に関する。該ヒト不死化ミエロイド細胞は、ACE2及びTMPRSS2を発現するヒト不死化単球又はヒト樹状細胞であってもよい。また、このようなヒト不死化ミエロイド細胞は、好ましくは、M-CSF及び/又はGM-CSFが導入され、又は発現していてもよい。

[0032] <コロナウイルス感染性ヒト樹状細胞>

上述のようにして得られた、ACE2及びTMPRSS2が導入された不死化単球を分化誘導させることにより、樹状細胞に分化させることができる。よって、本明細書においてコロナウイルス感染性ヒト不死化ミエロイド系細胞は、このようなACE2及びTMPRSS2を発現する樹状細胞を含む

。また、本発明の方法は、ヒト不死化単球を樹状細胞へ分化することを含んでいてもよい。単球からの樹状細胞への分化誘導は、既報（Francoise Chapuisら, Eur J Immunol. (1997) 27 (2) : 431-41. ; Marc Dauerら, J Immunol (2003) 170 (8) : 4069-4076. ; Figdor CGら, Nat Med. (2004) 10 (5) : 475-80 ; Helmut Jonuleitら, Eur J Immunol. (1997) 27 (12) : 3135-42) を参照し行うことができる。例えば、10~500 ng/ml の IL-4 の存在下で単球を培養することにより樹状細胞へ分化誘導することができる。

[0033] 上述のコロナウイルス感染性ヒト不死化ミエロイド細胞、コロナウイルス感染性ヒト不死化単球、及びコロナウイルス感染性ヒト樹状細胞は、コロナウイルス感染用とすることができる。また、これらの細胞は、他の成分と共にコロナウイルス感染用組成物とすることができる。

[0034] <コロナウイルスの存在を判定する方法>

本発明の一態様は、サンプル中のコロナウイルスの存在を判定する方法に関する。具体的には、当該方法は、コロナウイルス感染性ヒト不死化ミエロイド系細胞の培養液にサンプルを添加すること、並びに、当該単球又は当該樹状細胞の培養上清中のコロナウイルスを検出すること、又はコロナウイルスのレベルを測定することを含む。

[0035] 本発明の判定において使用する培地としては、例えば IMDM, RPMI 1640, α -MEM, MEM, DMEM などが挙げられる。また、添加物として、ヒト又はウシ血漿タンパク質画分、ウシ胎児血清やヒト血清、グルコース、D-マンニトールなどの糖類、アミノ酸、アデニンなどの核酸塩基、リン酸水素ナトリウム、A-トコフェロール、リノール酸、コレステロール、亜セレン酸ナトリウム、ヒトホロトランスフェリン、ヒトインスリン、エタノールアミン、2-メルカプトエタノール、G-CSF, GM-CSF, 炭酸水素ナトリウム、メチルセルロース等が含まれていてもよい。また、

必要に応じて、ゲンタマイシン、アンピシリン、ペニシリン、ストレプトマイシンなどの抗生剤；無機塩類；H E P E S，リン酸緩衝剤，酢酸緩衝剤などの緩衝剤を加えてもよい。具体的な例としては，不死化単球を用いて評価を行う場合は， α -MEMに10～20%ウシ胎児血清又は2～5%HPL（Human platelet lysate，ヒト血小板由来サプリメント（AdvantaCell社）を含有した培養液を使用して行うことができる。また，樹状細胞を用いて評価を行う場合は，添加物としてIL-4を使用することができ，例えば50～200 ng/mL IL-4含有培地を使用できる。

- [0036] 培養条件は約37℃であってもよく，約5%CO₂であってもよい。
- [0037] 「サンプル」としては，ヒト又は動物由来の体液（血液，鼻汁，痰，尿等），又は組織（口咽頭，鼻咽頭等），培養細胞，細胞培養液（細胞培養上清），飲料水や食品，環境中の洗浄液や拭い液等を使用することができ，例えば，血液サンプルである。これらは適宜濃縮又は希釈され，あるいは抽出や精製などの前処理が施されていてもよい。本明細書において「血液サンプル」とは，全血，血漿，血清，全血又は血球の溶血液などの血液の分画物若しくは処理物，並びにこれらの希釈液や濃縮液を含み，好ましくは血清又はその希釈液であってもよい。サンプルが液体の場合は，任意の希釈倍率で希釈された希釈液を評価に用いてもよい。
- [0038] 上述のコロナウイルス感染性ヒト不死化ミエロイド細胞（コロナウイルス感染性ヒト不死化単球又はコロナウイルス感染性ヒト樹状細胞を含む，以下同様）を上述の培地に播種して培養し，必要に応じて所定の回数及び間隔で細胞の継代又は培地交換を行った後に，サンプルを添加することができる。サンプル添加後，必要に応じて所定の回数及び間隔で培地交換を行いながら，更に細胞を培養する。サンプル添加後の培養期間は，1種類でもよいし，2種類以上の期間としてもよい。例えば，培養時間は，1～7日，2～6日，2～5日，2～4日，又は3日間とすることができる。
- [0039] 継代又は培地交換の回数としては，例えば，1回であってもよいし，2回

， 3 回， 4 回， 又は 5 回以上であってもよい。また， 継代又は培地交換の間隔としては， 例えば， 2 ～ 3 日に 1 回であってもよいし， 4 ～ 5 日に 1 回であってもよいし， 1 週間に 1 回であってもよい。

[0040] 培養終了後の培養上清中のコロナウイルスの検出又はコロナウイルスのレベルの測定は， コロナウイルス RNA の検出又はコロナウイルス RNA レベルの測定や， プラークアッセイ， TCID₅₀ などのウイルス力価測定などにより行うことができる。培養終了後， 速やかに定量的に検出・測定するために， RNA を指標とした測定法を用いることも多い。コロナウイルスの RNA の検出又は RNA レベルの測定は， RNA を検出し， 又は RNA 量を測定可能な方法であれば特に制限されるものではないが， 一般的にはコロナウイルス RNA と特異的に結合する物質を利用する方法で行われる。一例において「コロナウイルス RNA と特異的に結合する物質」は， 核酸分子であり得， 好ましくはコロナウイルス RNA と相補的な配列を有する核酸分子である。コロナウイルス RNA と相補的な配列を有する核酸分子は， コロナウイルス RNA とハイブリダイゼーションにより特異的に結合することができる。本明細書における「核酸」は DNA， RNA， 又は人工的に創製した核酸（PNA や Locked Nucleic Acid (2' , 4' -BNA) などの架橋型核酸を含む）， あるいはそれらの組み合わせを含む。コロナウイルス RNA と特異的に結合する核酸分子は， 少なくとも一部に人工的に設計された配列（例えば， 標識化やタグ化の為の配列など）を含んでいてもよい。

[0041] 「プローブ」は， 典型的には， コロナウイルス RNA 配列と相補的な配列を有し， コロナウイルス RNA 配列との結合を測定するために用いられる核酸分子である。プローブは通常， コロナウイルス RNA と特異的に結合可能な 10 ～ 30 mer， 10 ～ 20 mer などの核酸分子である。コロナウイルス RNA とプローブとの結合レベルを測定する方法としては， サザンハイブリダイゼーション， ノーザンハイブリダイゼーション， ドットハイブリダイゼーション， 蛍光 in situ ハイブリダイゼーション（FISH

), マイクロアレイ, ASO法などを挙げることができ, 具体的には, GeneChip™ miRNA Array Strip (サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社) や Agilent miRNA マイクロアレイ (Agilent Technologies 社) を用いる方法を用いることができる。

[0042] コロナウイルスRNAの検出又はコロナウイルスRNAレベルの測定は, コロナウイルスRNAと特異的に結合する物質に結合したコロナウイルスRNAの結合を検出し, 又は結合レベルを測定することにより行うことができる。「結合レベル」は, 結合量, 結合数, 又は結合割合, あるいはそれらを表す数値 (例えば, 測定された蛍光強度などの測定値そのもの) とすることができる。この場合, コロナウイルスRNAと特異的に結合する物質として標識化された物質を用いるか, あるいは, コロナウイルスRNAを標識化して用いてもよい。また, 一般的には標準サンプルを同時に測定し, 当該標準サンプルを基に標準曲線若しくは検量線を作成して測定サンプルの測定値から算出された値, 又は標準サンプルレベルを指標に標準化された数値を結合レベルとして決定する。

[0043] 標識化の方法としては, 例えば, 放射性同位体 (RI) 標識, 蛍光標識, 及び酵素標識を挙げることができる。

[0044] 例えば, コロナウイルスRNAレベルは, 以下の (a) ~ (c) により測定されてもよい:

(a) 少なくとも1つのコロナウイルスRNAの塩基配列若しくはその一部と結合する核酸分子 (プローブ) と, 前記培養上清とを接触させること;

(b) 前記プローブに結合した前記培養上清中のコロナウイルスRNAの結合レベルを測定すること; 及び,

(c) 測定された結合レベルから前記培養上清中のコロナウイルスの存在を判定すること。

[0045] あるいは, コロナウイルスRNAは, 以下の (a) ~ (c) により検出されてもよい:

- (a) 少なくとも1つのコロナウイルスRNAの塩基配列若しくはその一部と結合する核酸分子（プローブ）と、前記培養上清とを接触させること；
- (b) 前記プローブに結合した前記培養上清中のコロナウイルスRNAの結合を検出すること；及び、
- (c) 結合が検出された場合、前記培養上清中にコロナウイルスが存在すると判定すること。

[0046] あるいは、コロナウイルスRNAの検出又はコロナウイルスRNAレベルの測定は、PCRを利用した方法を利用することができ、例えば、コロナウイルスRNAと特異的に結合する核酸（プライマー）を用いてqPCR, ARMS (Amplification Refractory Mutation System), RT-PCR (Reverse transcriptase-PCR), 又はNested PCRを行うことにより測定してもよい。あるいは、インベダー（登録商標）法を利用してもよい。「プライマー」は通常、核酸増幅のために用いられる10～30mer（好ましくは、17～25mer, 15～20merなど）の核酸分子であり、少なくともその一部に（好ましくは、7mer以上, 8mer以上, 9mer以上, 10mer以上の）コロナウイルスRNAの末端配列と相補的な配列を有する。プライマーとしては、例えば、配列番号11～14に記載の塩基配列を有する又は配列番号11～14に記載の塩基配列からなる核酸分子を用いることができる。

[0047] よって、コロナウイルスRNAレベルは、以下のステップにより測定されてもよい：

- (a) 前記培養上清を鋳型として、コロナウイルスRNAと特異的に結合可能な核酸分子（プライマー）を用いて、前記培養上清中のコロナウイルスRNAの全部又は一部を増幅させること；
- (b) 増幅された核酸分子のレベルを測定すること；及び、
- (c) 増幅された核酸分子のレベルから、前記培養上清中のコロナウイルスの存在を判定すること。

[0048] また、コロナウイルスRNAは、以下のステップにより検出されてもよい：

(a) 前記培養上清を鋳型として、コロナウイルスRNAと特異的に結合可能な核酸分子（プライマー）を用いて、前記培養上清中のコロナウイルスRNAの全部又は一部を増幅させること：

(b) 増幅された核酸分子の検出すること；及び、

(c) 増幅された核酸分子が検出された場合、前記培養上清中にコロナウイルスが存在すると判定すること。

[0049] 培養上清中のコロナウイルスRNAの全部又は一部の増幅は、当該培養上清を鋳型としてPCR反応等を行うことにより実施することができる。増幅された核酸のレベルは、ドット・プロット・ハイブリダイゼーション法、表面プラズモン共鳴法（SPR法）、PCR-RFLP法、In situ RT-PCR法、PCR-SSO (sequence specific Oligonucleotide) 法、PCR-SSP法、AMPFLP (Amplifiable fragment length polymorphism) 法、MVR-PCR法、PCR-SSCP (single strand conformation polymorphism) 法により測定することができる。

[0050] 本明細書において、RNAと「特異的に結合する」とは、当該物質が他の塩基配列を有する核酸に対する親和性よりも、コロナウイルスRNA配列を有する核酸に対して実質的に高い親和性で結合することを意味する。ここで、「実質的に高い親和性」とは、コロナウイルスRNA配列を有する核酸を他の塩基配列を有する核酸から区別して検出することが可能な程度の親和性を意味する。他の塩基配列は、コロナウイルスRNA配列と区別できる程度に異なっていることが好ましく、50%以下、40%以下、30%以下、20%以下、10%以下の同一性を有する塩基配列であってもよい。例えば、実質的に高い親和性は、コロナウイルスRNAとの結合量が、他の塩基配列との結合量の3倍以上、4倍以上、5倍以上、6倍以上、7倍以上、8倍以上

上、9倍以上、10倍以上、15倍以上、20倍以上、30倍以上、50倍以上であってもよい。

[0051] サンプル中にコロナウイルスが存在するか否かは、検出されたコロナウイルスRNA、又は測定されたコロナウイルスRNAレベルをもとに判定する。具体的には、前記培養上清中に、コロナウイルスRNAが検出された場合に、サンプル中にコロナウイルスが存在すると判定してもよい。また、当該培養上清におけるコロナウイルスのRNAレベルの測定量が陰性対照と比較して増加した場合に、サンプル中にコロナウイルスが存在すると判定してもよい。なお、陰性対照としては、本評価を行う際に用いられる培地等が用いられてもよい。

[0052] あるいは、培養終了後の培養上清中のコロナウイルスの検出又はコロナウイルスのレベルの測定は、コロナウイルスタンパク質の検出又はコロナウイルスタンパク質レベルの測定により行うことができる。コロナウイルスタンパク質の検出又はタンパク質レベルの測定は、タンパク質を検出し、又はタンパク質量を測定可能な方法であれば特に制限されるものではないが、一般的にはコロナウイルスタンパク質と特異的に結合する物質を利用する方法で行われる。一例において「コロナウイルスタンパク質と特異的に結合する物質」としては、抗体又はその抗原結合性断片、アプタマー、リガンド／受容体又はその結合性断片、あるいはそれらと別の物質との融合物を挙げることができる。

[0053] 本明細書において「抗原結合性断片」とは、抗体の一部分（部分断片）を含むタンパク質又はペプチドであって、抗体の抗原への作用（免疫反応性・結合性）を保持するタンパク質又はペプチドを意味する。抗原結合性断片としては、例えば、 $F(a b')_2$ 、 $F a b'$ 、 $F a b$ 、 $F a b_3$ 、一本鎖 $F v$ （以下、「 $s c F v$ 」という）、（タンデム）バイスペシフィック一本鎖 $F v(s c(F v)_2)$ 、一本鎖トリプルボディ、ナノボディ、ダイバレント $V H H$ 、ペンタバレント $V H H$ 、ミニボディ、（二本鎖）ダイアボディ、タンデムダイアボディ、バイスペシフィックトリボディ、バイスペシフィックバ

イボディ、デュアルアフィニティリターゲティング分子 (DART), トリアボディ (又はトリボディ), テトラボディ (又は $[sc(Fv)_2]_2$), 若しくは $(scFv-SA)_4$) ジスルフィド結合 Fv (以下, 「 $dsFv$ 」 という), コンパクト IgG, 重鎖抗体, 又はそれらの重合体を挙げることができる (Nature Biotechnology, 29 (1) : 5-6 (2011); Maneesh Jain et al., TRENDS in Biotechnology, 25 (7) (2007) : 307-316; 及び, Christoph steinら, Antibodies (1) : 88-123 (2012) 参照)。本明細書において, 抗体及び免疫反応性断片は, モノスペシフィック, バイスペシフィック (二重特異性), トリスペシフィック (三重特異性), 及びマルチスペシフィック (多重特異性) のいずれであってもよい。

[0054] 典型的にはコロナウイルスタンパク質の検出又はコロナウイルスタンパク質レベルの測定は, コロナウイルスタンパク質と特異的に結合する物質に結合したコロナウイルスタンパク質の結合を検出し又は結合レベルを測定することにより行われる。測定される「結合レベル」とは, これらの物質の結合量, 結合数, 又は結合割合, あるいはそれらを表す数値 (例えば, 測定された蛍光強度などの測定値そのもの) とすることができる。この場合, コロナウイルスタンパク質と特異的に結合する物質として標識化された物質を用いるか, あるいは, コロナウイルスタンパク質を標識化して用いてもよい。また, 一般的には標準サンプルを同時に測定し, 当該標準サンプルを基に標準曲線若しくは検量線を作成して算出した値, 又は標準サンプルレベルを指標に標準化した数値を結合レベルとして決定する。

[0055] よって例えば, 本発明の方法は, 以下を備えていてもよい:

(a) 少なくとも1つのコロナウイルスタンパク質と結合する物質と, 前記培養上清とを接触させること;

(b) 前記コロナウイルスタンパク質と結合する物質に結合した前記培養上清中のコロナウイルスタンパク質の結合を検出すること, 又は結合レベルを

測定すること；及び、

(c) 検出された結合又は測定された結合レベルから前記培養上清中のコロナウイルスの存在を判定すること。

[0056] 本明細書において、抗体又はその抗原結合性断片を用いてタンパク質を検出又は測定する場合、結合の測定は公知の検出及び／又は測定方法に基づくことができる。例えば、酵素免疫測定法（EIA法）、簡易EIA法、酵素結合イムノソルベントアッセイ法（ELISA法）、ラジオイムノアッセイ法（RIA法用）、蛍光免疫測定法（FIA法）等の標識化免疫測定法；ウェスタンブロットティング法等のイムノブロットティング法；金コロイド凝集法等のイムノクロマト法；イオン交換クロマトグラフィ法、アフィニティークロマトグラフィ法等のクロマトグラフィ法；比濁法（TIA法）；比ろう法（NIA法）；比色法；ラテックス凝集法（LIA法）；粒子計数法（CIA法）；化学発光測定法（CLIA法，CLEIA法）；沈降反応法；表面プラズモン共鳴法（SPR法）；レゾナントミラーディテクター法（RMD法）；比較干渉法等により結合を測定することができる。

[0057] 具体的には、固相に固定化された本発明の抗体又はその抗原結合性断片に前記培養上清を接触させ、洗浄後、検出又は測定対象タンパク質と結合可能な標識化抗体を添加した後、非結合抗体を洗浄により除去し、当該抗体の標識を検出又は標識量（例えば、標識の強度）を測定することにより検出又は測定対象タンパク質を検出し又はそのレベルを決定することができる。また、イムノクロマトにより行う場合には、固定化されていない第一の検出又は測定対象タンパク質と結合可能な標識化抗体に前記培養上清を接触させた後、当該混合物を第二の検出又は測定対象タンパク質と結合可能な抗体又はその抗原結合性断片が特定部位に固定化された担体と接触させ、当該部位における前記標識化抗体を検出又は標識量（例えば、標識の強度）を測定することにより検出又は測定対象タンパク質を検出し又は測定対象タンパク質のレベルを決定することができる。標識化の方法としては、例えば、放射性同位体（RI）標識、蛍光標識、及び酵素標識を挙げることができる。

- [0058] 本明細書において、タンパク質が「特異的に結合する」とは、当該物質が他のアミノ酸配列を有するタンパク質に対する親和性よりも、コロナウイルスタンパク質配列を有する核酸に対して実質的に高い親和性で結合することを意味する。ここで、「実質的に高い親和性」とは、コロナウイルスタンパク質を他のアミノ酸配列を有するタンパク質から区別して検出することが可能な程度の親和性を意味する。他のアミノ酸配列は、コロナウイルスタンパク質配列と区別できる程度に異なっていることが好ましく、50%以下、40%以下、30%以下、20%以下、10%以下の同一性を有するアミノ酸配列であってもよい。例えば、実質的に高い親和性は、コロナウイルスタンパク質との結合量が、他のアミノ酸配列との結合量の3倍以上、4倍以上、5倍以上、6倍以上、7倍以上、8倍以上、9倍以上、10倍以上、15倍以上、20倍以上、30倍以上、50倍以上であってもよい。
- [0059] サンプル中にコロナウイルスが存在するか否かは、検出されたコロナウイルスタンパク質、又は測定されたコロナウイルスタンパク質レベルをもとに判定する。具体的には、前記培養上清中に、コロナウイルスタンパク質が検出された場合に、サンプル中にコロナウイルスが存在すると判定してもよい。また、当該培養上清におけるコロナウイルスのタンパク質レベルの測定量が陰性対照と比較して増加した場合に、サンプル中にコロナウイルスが存在すると判定してもよい。なお、陰性対照としては、本評価を行う際に用いられる培地等が用いられてもよい。
- [0060] あるいは、培養終了後の培養上清中のコロナウイルスの検出又はコロナウイルスのレベルの測定は、炎症性サイトカインの検出又は炎症性サイトカインレベルの測定により行うことができる。一般に、ウイルスの感染により免疫細胞から産生される炎症性サイトカインは、体内臓器の炎症を引き起こし、ウイルス感染症の重症化を引き起こす。ウイルス感染細胞において、このような炎症性サイトカインの産生量を評価することで、重症化の病態解明、治療法の解明につながることを期待される。炎症性サイトカインとしては、例えば、 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ 、 $IL-8$ 、 $TNF-\alpha$ 、 $MIP-1\beta$ 等が

挙げられる。

[0061] 炎症性サイトカインの検出又は炎症性サイトカインレベルの測定は、タンパク質を検出し、又はタンパク質量を測定可能な方法であれば特に制限されるものではないが、一般的には炎症性サイトカインと特異的に結合する物質を利用する方法で行われる。一例において「炎症性サイトカインと特異的に結合する物質」としては、抗体又はその抗原結合性断片、アプタマー、リガンド／受容体又はその結合性断片、あるいはそれらと別の物質との融合物を挙げることができる。

[0062] 典型的には炎症性サイトカインの検出又は炎症性サイトカインレベルの測定は、炎症性サイトカインと特異的に結合する物質に結合した炎症性サイトカインの結合を検出し又は結合レベルを測定することにより行われる。測定される「結合レベル」とは、これらの物質の結合量、結合数、又は結合割合、あるいはそれらを表す数値（例えば、測定された蛍光強度などの測定値そのもの）とすることができる。この場合、炎症性サイトカインと特異的に結合する物質として標識化された物質を用いるか、あるいは、炎症性サイトカインを標識化して用いてもよい。また、一般的には標準サンプルを同時に測定し、当該標準サンプルを基に標準曲線若しくは検量線を作成して算出した値、又は標準サンプルレベルを指標に標準化した数値を結合レベルとして決定する。

[0063] よって例えば、本発明の方法は、以下を備えていてもよい：

（a）少なくとも1つの炎症性サイトカインと結合する物質と、前記培養上清とを接触させること；

（b）前記炎症性サイトカインと結合する物質に結合した前記培養上清中の炎症性サイトカインの結合を検出すること、又は結合レベルを測定すること；及び、

（c）検出された結合又は測定された結合レベルから前記培養上清中のコロナウイルスの存在を判定すること。

[0064] サンプル中にコロナウイルスが存在するか否かは、検出された炎症性サイ

トカイン、又は測定された炎症性サイトカインレベルをもとに判定する。具体的には、前記培養上清中において、炎症性サイトカインが検出された場合に、サンプル中にコロナウイルスが存在すると判定してもよい。また、当該培養上清における炎症性サイトカインレベルの測定量が陰性対照と比較して高い場合に、サンプル中にコロナウイルスが存在すると判定してもよい。なお、陰性対照としては、本評価を行う際に用いられる培地等が用いられてもよい。

[0065] <コロナウイルスの製造方法>

本発明の一態様は、コロナウイルスの製造方法に関する。具体的には、当該製造方法は、コロナウイルス感染性ヒト不死化ミエロイド系細胞（不死化ヒト単球及びヒト樹状細胞を含む）の培養液にコロナウイルスを添加して細胞に感染させること、及び細胞の培養液中のコロナウイルスを回収することを含む。

[0066] 不死化ヒトミエロイド系細胞を培地に播種し、必要に応じて所定の回数及び間隔で、細胞の継代又は培地交換を行った後、培養細胞にコロナウイルスを添加する。細胞に感染させるコロナウイルスは、例えば、既にコロナウイルスに感染させた細胞培養液の培養上清をそのまま使用してもよいし、必要に応じて培地等の希釈液で希釈されて使用してもよい。サンプル添加後、必要に応じて所定の回数及び間隔で培地交換を行いながら、更に細胞を培養する。コロナウイルス添加後の培養期間は、1～7日、2～6日、2～5日、2～4日、又は3日間とすることができる。その他の不死化ヒトミエロイド系細胞の培養条件は、上述の<コロナウイルスの存在を判定する方法>の項で記載した条件に準ずることができる。

[0067] 培養終了後の培養液（例えば、培養上清）をそのままコロナウイルス含有液とすることができる。あるいは、培養終了後の培養液（例えば、培養上清）を適宜濃縮又は精製することによりコロナウイルス含有液としてもよい。

[0068] <被検サンプルの抗コロナウイルス活性の評価方法>

本発明は、被検サンプルの抗コロナウイルス活性の評価方法に関する。本

評価方法は、被検サンプルの存在下でコロナウイルス感染性ヒト不死化ミエロイド系細胞（不死化ヒト単球又はヒト樹状細胞を含む）の培養液にコロナウイルスを添加すること、及び細胞の培養上清中のコロナウイルスのレベルを測定することを含む。

[0069] 本明細書において、「抗コロナウイルス活性」とは、コロナウイルス感染症に対して、治療効果、症状緩和効果、及び／又は予防効果をもたらす活性を意味し、代表的には、中和活性、及び増殖阻害活性（例えば、RNA鎖合成阻害活性、RNAポリメラーゼ阻害活性など）である。

[0070] 不死化ヒトミエロイド系細胞を培地に播種し、必要に応じて所定の回数及び間隔で、細胞の継代又は培地交換を行った後、培養細胞にコロナウイルスを添加する。細胞に感染させるコロナウイルスは、例えば、既にコロナウイルスに感染させた細胞培養液の培養上清をそのまま使用してもよいし、必要に応じて培地等の希釈液で希釈されて使用してもよい。サンプル添加後、必要に応じて所定の回数及び間隔で培地交換を行いながら、更に細胞を培養する。コロナウイルス添加後の培養期間は、1～7日、2～6日、2～5日、2～4日、又は3日間とすることができる。その他の不死化ヒトミエロイド系細胞の培養条件は、上述の＜コロナウイルスの存在を判定する方法＞の項で記載した条件に準ずることができる。

[0071] 被検サンプルは、コロナウイルス添加前、コロナウイルス添加と同時に、又はコロナウイルス添加後に細胞培養液に添加することができる。例えば中和活性や予防効果を確認するためには好ましくは、コロナウイルス添加前、又はコロナウイルス添加と同時に添加する。例えば、被検サンプルの抗コロナウイルス活性の評価方法は、

コロナウイルス感染性ヒト不死化ミエロイド系細胞の培養液に被検サンプルを添加すること、

前記細胞培養液にコロナウイルスを添加すること、及び

前記細胞の培養上清中の前記コロナウイルスのレベルを測定することを含み、

ここで、前記被検サンプルの存在下で前記コロナウイルスを添加した前記培養上清中の前記コロナウイルスのレベルが、前記被検サンプルの非存在下で前記コロナウイルスを添加した前記培養上清中のコロナウイルスのレベルよりも低い場合、該被検サンプルは抗コロナウイルス活性を有すると評価される方法であってもよい。

[0072] あるいは、本発明の被検サンプルの抗コロナウイルス活性の評価方法は、既に感染した細胞への被検サンプルの効果を評価するための方法であってもよく、具体的には、

コロナウイルス感染性ヒト不死化ミエロイド系細胞の培養液にコロナウイルスを添加すること、

前記細胞培養液に被検サンプルを添加すること、及び

前記細胞の培養上清中の前記コロナウイルスのレベルを測定することを含み、

ここで、前記被検サンプルの存在下で前記コロナウイルスを添加した前記培養上清中の前記コロナウイルスのレベルが、前記被検サンプルの非存在下で前記コロナウイルスを添加した前記培養上清中のコロナウイルスのレベルよりも低い場合、該被検サンプルは抗コロナウイルス活性を有すると評価される方法であってもよい。

[0073] 被検サンプルのモダリティは限定されるものではないが、例えば、抗体、受容体又はその断片、中分子、ペプチド、低分子、アプタマー、又は核酸医薬であり得る。被検サンプルは、任意の希釈倍率系列に希釈されたものを評価に用いてもよい。また、被検サンプルは単一物質からなる必要はなく、ヒト又は動物由来の体液（血液、鼻汁、痰、尿等）、又は組織（口咽頭、鼻咽頭等）、培養細胞、細胞培養液（細胞培養上清）、飲料水や食品、環境中の洗浄液や拭い液、血液サンプルなどの生体成分、混合物、組成物、植物抽出物などであってもよい。例えば、コロナウイルス感染歴がある対象やコロナウイルスワクチン又はその候補を投与された対象から得られた血液サンプルを被検サンプルとすることにより、当該対象の血液中の成分（代表的には抗

体)が抗コロナウイルス活性を有するか否かを判定することができる。あるいは、被検サンプルは溶媒又は培地成分等の溶解液や希釈液を除き、単一の成分のみからなる被検薬であってもよい。

[0074] コロナウイルス及び被検サンプル添加後の細胞培養期間としては、任意の時間を設定することができる。例えば、培養時間は、1～7日、2～6日、2～5日、2～4日、又は3日間とすることができる。その他の不死化ヒトミエロイド系細胞の培養条件は、上述の<コロナウイルスの存在を判定する方法>の項で記載した条件に準ずることができる。前記培養期間経過後における培養上清中のコロナウイルスレベルの測定は、上述の<コロナウイルスの存在を判定する方法>に準じて行うことができる。

[0075] 被検サンプルが抗コロナウイルス活性を有するか否かは、培養上清中の測定されたコロナウイルスレベルをコントロールのコロナウイルスレベルと比較することにより判定する。コントロールとしては、被検サンプルの非存在下でコロナウイルスと共に培養された細胞の培養上清を用いることができる。具体的には、被検サンプル含む培養上清中のコロナウイルスのレベルが、被検サンプルを含まない培養上清中のコロナウイルスのレベルよりも低い場合、該被検サンプルは抗コロナウイルス活性を有すると判定してもよい。

[0076] <被検サンプル中の抗コロナウイルス物質の同定方法>

本発明は被検サンプル中に抗コロナウイルス活性を有する物質(抗コロナウイルス物質)が含まれるか否かを同定する方法に関する。本発明の同定方法は、被検サンプルの存在下でコロナウイルス感染性ヒト不死化ミエロイド系細胞(不死化ヒト単球又はヒト樹状細胞を含む)の培養液にコロナウイルスを混和すること、及び前記細胞の培養上清中の前記コロナウイルスのレベルを測定することを含み、ここで、前記被検サンプルの存在下で前記コロナウイルスを添加した前記培養上清中の前記コロナウイルスのレベルが、前記被検サンプルの非存在下で前記コロナウイルスを添加した前記培養上清中のコロナウイルスのレベルよりも低い場合、該被検サンプルは抗コロナウイルス活性を有する物質を含有すると同定される。

[0077] 本発明の方法において、「被検サンプル」とは、抗コロナウイルス物質が含まれるか否かを判定したいサンプルであって、本発明の方法を適用可能なサンプルであればいかなるサンプルでも使用することができるが、当該サンプルそのものが細胞毒性を有しないものが好ましく、例えば、上述の血液サンプルの他、食品、飲料、又は植物抽出物などを使用できる。例えば、抗体、ワクチン接種後の血液もしくは血清又は抽出物であり得る。被検物質は、任意の希釈倍率系列に希釈されたものを評価に用いてもよい。

[0078] 例えば、本発明の同定方法により同定される抗コロナウイルス物質は、上述のモダリティに準ずることができ、例えば、コロナウイルス中和活性を有する物質とすることができ、好ましくは、コロナウイルス中和抗体である。

[0079] 被検サンプル中の抗コロナウイルス物質の同定方法における具体的な各ステップは、上述の＜被検サンプルの抗コロナウイルス活性の評価方法＞に準じて実施することができる。

[0080] 被検サンプル中に抗コロナウイルス物質が含まれるか否かは、培養上清中の測定されたコロナウイルスレベルをコントロールのコロナウイルスレベルと比較することにより同定する。コントロールとしては、被検サンプルの非存在下でコロナウイルスと共に培養された細胞培養上清を用いることができる。具体的には、被検サンプルを含む培養上清中のコロナウイルスのレベルが、被検サンプルを含まない培養上清中のコロナウイルスのレベルよりも低い場合、該被検サンプルは抗コロナウイルス物質が含むと同定してもよい。

[0081] ＜コロナウイルスワクチンの評価方法＞

本発明の被検サンプルの抗コロナウイルス活性の評価方法、並びに被検サンプル中の抗コロナウイルス物質の同定方法は、ワクチン投与により中和抗体が生体内で生成されるか（又はワクチン投与により産生された抗体が中和活性を有するか否か）を判定することに利用することができる。具体的には、ワクチンを投与した哺乳動物（マウス、ラット、モルモット、ウサギ、イヌ、ブタ、ウシ、ウマ、サル、ヒトなど）の血液を採取し、当該血液から調製した血液サンプルを被検サンプルとして、本発明の被検サンプルの抗コロ

ナウイルス活性の評価方法，又は本発明の被検サンプル中の抗コロナウイルス物質の同定方法を実施し，当該被検サンプルが抗コロナウイルス活性を有すると判定され，又は抗コロナウイルス物質を含むと同定された場合，当該ワクチン投与により中和抗体が生体内で生成される（又はワクチン投与により産生された抗体が中和活性を有する）と判定することができる。よって，本発明は，コロナウイルスワクチンの中和抗体誘導能の評価方法であって，当該ワクチンを接種された哺乳動物由来の血液サンプルを被検サンプルとして，本発明の被検サンプルの抗コロナウイルス活性の評価方法，又は本発明の被検サンプル中のコロナウイルス中和物質の同定方法を実施することを含む方法に関する。

[0082] 本発明のコロナウイルスワクチンの評価方法は更に，ワクチンを投与するステップを含んでもよく，例えば，被検哺乳動物にワクチン候補物質を接種すること，該被検哺乳動物から血液を採取すること，採取された血液又は当該血液から調製された血液サンプル被検サンプルとして，本発明の被検サンプルの抗コロナウイルス活性の評価方法，又は本発明の被検サンプル中のコロナウイルス中和物質の同定方法を実施することを含む評価方法であってもよい。

[0083] <キット>

本発明は，コロナウイルス感染性ヒト不死化ミエロイド系細胞を含む，コロナウイルスの存在を判定用キット，コロナウイルスの製造用キット，被検サンプルの抗コロナウイルス活性評価用キット，被検サンプル中の抗コロナウイルス物質の同定用キット，あるいは，コロナウイルスワクチンの評価用キットに関する。当該キットは，コロナウイルス感染性ヒト不死化ミエロイド系細胞の他，パッケージ，説明書を含んでもよい，また，培養用培地，培養添加物，コロナウイルスRNA又はタンパク質と結合可能な物質，並びに意の標準物質等から選択される1種類以上を含んでもよい。なお，培養用培地としては，<コロナウイルスの存在を判定する方法>の項で記載した培地を使用することができる。

[0084] 以下、実施例に基づいて本発明をより具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。なお、本願全体を通して引用される全文献は参照によりそのまま本願に組み込まれる。

[0085] (実施例1) ヒト人工多能性幹細胞由来不死化単球細胞の作製

ヒト人工多能性幹(iPS)細胞由来不死化単球細胞は、既報(WO2012/043651, 特開2017-131136及び特開2018-171005)を参考に作製した。詳しくは、未分化なiPS細胞(K株(WO2012/043651, 特開2017-131136及び特開2018-171005))を、ラミニン511(iMatrix-511-E8, (株)ニッピ, Cat#:892-012)をあらかじめ基底膜としてコートした直径10cmのディッシュ(AGCテクノグラス(株), Cat#:1012-100)又は6wellプレート(Corning Inc., Cat#:3516)上に播種し、 α -MEM培地(富士フイルム和光純薬(株), Cat#:137-17215)に、ウシ胎児血清(以下、FBSと表記)(Cytiva Inc., Cat#:SH30088.03)を20%添加した培養液(以下、 α -MEM培地(20%FBS含有と表記))を用いて分化誘導を開始した。以降、3日に1度、 α -MEM培地(20%FBS含有)で培地交換しながら培養を継続した。分化誘導開始から14~21日後、TrypLE™ Select(1mM エチレンジアミン四酢酸(EDTA)含有)(GIBCO Inc., Cat#:A12859-01)及び0.5mM EDTA/PBS(ナカライテスク(株), Cat#:13567-84)を等量混合し、調製された溶液(最終濃度0.75mM EDTA)を使用して細胞を37℃で、60分間処理することにより剥離させて回収し、ピペティング操作により細胞浮遊液を作製した。続いて、直径10cmのディッシュ1枚又は6wellプレートの1wellから回収した細胞浮遊液を10mLのD-MEM培地(富士フイルム和光純薬(株), Cat#:044-29765)に、ウシ胎児血清(以下、FBSと表記)(Cytiva Inc., Cat#:SH30088.0

3) を 10% 添加した培養液に懸濁し、直径 10 cm のディッシュ 2 枚又は 1 枚に播種し、37℃、5% CO₂ インキュベータ内で静置した。16 時間後、直径 10 cm のディッシュに付着しなかった浮遊細胞を回収し、100 μm のセルストレイナー (Corning Inc., Cat #: 352360) を通過させることにより、凝集細胞塊を除いた細胞浮遊液を得た。

[0086] 前述で得た細胞浮遊液を、α-MEM 培地 (20% FBS 含有)、100 ng/mL M-CSF (PeproTech Inc., Cat #: AF-300-25)、及び 100 ng/mL GM-CSF (PeproTech Inc., Cat #: 300-03) を入れた培養液中に混ぜ、T25 フラスコ ((株) CellSeed, HydroCell, Cat #: CSF025、もしくは Thermo Fisher Scientific Inc., Cat #: 169900) に播種し、培養を行った。その後、3~9 日程度経過すると、浮遊性あるいは弱付着性の細胞が出現し、徐々に細胞数が増加していくのが観察された。

[0087] 得られた浮遊細胞あるいは弱付着性の細胞に Human immunodeficiency virus 1 型 (HIV-1) 増殖力等欠損株であり、タンパク質発現用プロモーターが EF1a である第 3 世代レンチウイルスベクター (SignaGen Inc.) を用いて、c-MYC 及び BM11 を導入し、ヒト人工多能性幹細胞由来不死化単球細胞を作製した。この不死化単球細胞株は、24 ウェルプレートにおける、20% FBS、50~100 ng/mL M-CSF、及び 50~100 ng/mL GM-CSF を含有する α-MEM 培地中で、37℃、5% CO₂ インキュベータ内で培養し、培養開始から 3~5 週間後に、増殖性細胞として獲得した。また、ヒト人工多能性幹細胞由来不死化単球細胞は、市販の細胞保存液、例えば無血清細胞保存液バンバンカー (GCLTEC Inc., Cat #: CS-02-001) を用い液体窒素下で保存した。

[0088] (実施例 2) M-CSF 及び GM-CSF を発現するヒト人工多能性幹細胞由来不死化単球細胞の作製

M-CSF及びGM-CSFを発現するヒト人工多能性幹細胞由来不死化単球細胞は既報（特開2018-171005）を参考に作製した。詳しくは、実施例1で得たヒト人工多能性幹細胞由来不死化単球細胞に、Human immunodeficiency virus 1型（HIV-1）増殖力等欠損株であり、タンパク質発現用プロモーターがEF1aである第3世代レンチウイルスベクター（SignaGen Inc.）を用いて、ヒトM-CSF遺伝子とヒトGM-CSF遺伝子の発現ベクターを同時に導入した。遺伝子導入3日後より、37℃、5%CO₂インキュベータ内で、ヒトM-CSF及びGM-CSFをいずれも含まない α -MEM（20%FBS含有）培地中で培養し、培養開始から3～5週間後に、増殖性細胞として獲得し、市販の細胞保存液を用い液体窒素下で保存した。

[0089] （実施例3）M-CSF及びGM-CSFを発現するヒト人工多能性幹細胞由来不死化単球細胞から樹状細胞の誘導作製

M-CSF及びGM-CSFを発現するヒト人工多能性幹細胞由来不死化単球細胞から樹状細胞の調製は既報（特開2018-171005）を参考に行った。詳しくは、実施例2で作製したM-CSF及びGM-CSFを発現するヒト人工多能性幹細胞由来不死化単球細胞をそのまま、もしくは保存してある細胞を解凍後に、 α -MEM培地（富士フイルム和光純薬（株）、Cat#:137-17215）に、10%ウシ胎児血清（以下、FBSと表記）（Cytiva Inc., Cat#:SH30088.03）を添加した培養液（以下、 α -MEM培地（10%FBS含有と表記）、及び100ng/mL IL-4（PeproTech Inc., Cat#:200-04）に懸濁させ、T25フラスコ中で、3日間、37℃、5%CO₂インキュベータ内で培養することで、樹状細胞へと誘導作製した。

[0090] 調製した細胞が単球様細胞、又誘導した細胞が樹状細胞であることを確認するために、表面マーカーの測定、及び、ギムザ染色などによる形態観察などを行った。表面マーカー測定は、CD14抗体、CD54抗体、CD209抗体（いずれもBiolegend Inc., Cat#:367103

、Cat # : 353107, Cat # : 330107) を用いて、BD Bioscience Inc. のフローサイトメーター Accuri を使用して行った。またギムザ染色については、市販のギムザ染色液 (Merck Inc., Cat # : HX69072204) を用いて、製造者提供のプロトコルに従い、ギムザ染色もしくはメイギムザ染色 (ナカライテスク (株) 、メイグリュンワルド液, Cat # : 37126-14) をし、高倍顕微鏡 O r i m p u s 社, I X 7 0, 400~1000倍) にて測定した。測定結果を図1に結果を示す。M-CSF及びGM-CSFを発現するヒト人工多能性幹細胞由来不死化単球細胞においては、CD14及びCD54の発現が確認された。また樹状細胞に誘導作製した場合において、一般的な樹状細胞への誘導変化の指標であるCD14の発現減衰、CD54及びCD209の発現増強が確認できた (図1A) 。また形態観察の結果から、単球様細胞 (図1B) 及び樹状細胞であることを確認した。

[0091] 以後において、K株より作製したM-CSF及びGM-CSF発現ヒト不死化単球細胞を「K-ML2」とした。

[0092] (実施例4) ヒト不死化ミエロイド系細胞における遺伝子発現確認

従来から、コロナウイルスのヒトへの感染メカニズムについては、多くの研究がなされている。SARS-CoV-2等のコロナウイルスがヒトに感染する際、ウイルス外膜と細胞膜の融合を起こすことが重要とされており、構造中のスパイクタンパク質 (Sタンパク質) が、ヒトの細胞の細胞膜のACE2受容体に結合した後に、タンパク質分解酵素であるTMPRSS2で切断され、Sタンパク質が活性化されることにより、ウイルス外膜と細胞膜との融合を可能とすることが知られている (Markus Hoffman ら, Cell, 2020 April; 181, 271-280) 。

[0093] そこで、K-ML2に対してより効率よくSARS-CoV-2を感染させるため、SARS-CoV-2と結合するACE2、及びSARS-CoV-2の細胞内への侵入に重要なTMPRSS2及びADAM17について、ヒト不死化ミエロイド系細胞における遺伝子発現の解析を行った。

[0094] 実施例2において調製したK-ML2における各遺伝子発現を、表1に示すプライマーセット (Eurofins Inc.) を用い、PCR溶液 (タカラバイオ (株), One Step TB Green PrimeScript™ RT-PCR Kit II, Cat#:RR086A), 及びリアルタイムPCR機器 (Step One Plus, Applied Biosystems Inc.) を用いて検出した。PCR反応は、50℃で2分、及び95℃で2分後、変性を95℃で20秒、対合を54～56℃で30秒、伸長を72℃で30秒の3 Step条件で、40サイクル行った。

[0095] [表1]

プライマー名	プライマー配列	配列番号	増幅産物
hACE2_F	CTCCTTCTCAGCCTTGTTGC	1	372 bp
hACE2_R	TCCAGTACTGTAGATGGTGC	2	
hTMPRSS2_F	CTCTACGGACCAACTTCATC	3	153 bp
hTMPRSS2_R	CCACTATTCTTGGCTAGAGTAA	4	
hADAM17_F	GTCGTGGTGGTGGATGGTAAAA	5	148 bp
hADAM17_R	GCCCCATCTGTGTTGATTCTGA	6	

[0096] その結果、図2に示すように、ADAM17の発現が認められた一方で、ACE2については、発現が認められたものの、その発現量はごくわずかであり、また、TMPRSS2については、発現がほぼ検出されなかった。そのためK-ML2に対するSARS-CoV-2の感染効率を高めるためには、安定的にTMPRSS2及びACE2を発現させることが必要であると考えられた。

[0097] (実施例5) レンチウイルスベクターによるTMPRSS2遺伝子の導入

K-ML2において安定的にTMPRSS2を発現させるために、Human immunodeficiency virus 1型 (HIV-1) 増殖力等欠損株であって、EF1aプロモーターの下流にTMPRSS2遺伝子 (表2: 配列番号8) を有し、CMVプロモーターの下流に薬剤耐性遺伝子を有する、第3世代のレンチウイルスベクター (SignaGen) を用いた。24wellプレートにα-MEM培地 (20% FBS含有) 中

に懸濁したK-ML 2細胞を 1×10^6 細胞/ウェルで播種し、 2×10^6 T U (タイターユニット) 量のウイルスベクター液を添加することにより該ベクターを導入した。ベクター導入細胞を α -MEM培地に懸濁させ、終細胞数が 1×10^6 細胞/ウェルとなるように24wellプレートに播種し、37℃、5%CO₂インキュベータで培養した。培養4日後に遺伝子導入細胞を選別するために、ピューロマイシン (Sigma-Aldrich社、ピューロマイシン, Cat#: P883 Cat#: P8833) を加え、さらに7日間培養を行った。そして、薬剤耐性により生存した細胞をTMPRSS2の発現細胞 (K-ML 2/TMPRSS2) として得た。

[0098] [表2]

名前	アミノ酸配列	配列番号
Human TMPRSS2 protein sequence	MALNSGSPRAIGPYEYHGY GPENPYPAQF TVVPTVYEVH PAQYYPSPVP QYAPRVLTA SNPVVCTQPK SPSTVCTSK TKNALCITLT LGTFLVGAAL AAGLLVAFMG SKCSNSGIEC DSSGTCNFS NWCDGVSHCP GGEENRCVRL YGPNFLQV YSSGRKSWHP VQDDWMEY GRAACRDMGY KNNFYSSGGI VDDSGSTSFM KINTSAGNVD YRGLYHSDA CSSKAVYSLR CIACGVNLNS SRQSRVQGE SALPGAWPWQ VSLHVQNVHV CGGSHTFEWWTAHCEVK PLNNPWHWTA FAGLRQSFM FYGAGYQVEK VISHPNYDSK TKNDIALMK LGKPLTFNDL VKPVCLPNFG MMLQPEQLCWISGWGATEEK GKTSEVUNAA KYLUETQRC NSRYVYDNL TPAMICAGFL QGNVDSQSD SGGPLYTSKN MWMLIGDTS WGSQCAKAYR PGVYGNVMVF TDVYRQMRADG	8
Human ACE2 protein sequence	MSSSSWLLLS LVAYTAAQST IEECAKTFLO KFNHEAEDLF YGSSIASWNY NTNTEENVQ NMHNAGDKYS AFLKEQSTLA QMYPUGEIQN LTVPLGLQAL QQNGSSVSE DKSRLNTHL NTNSTIYSTG KVONPDNPQE CLLEPGLNE IMANGLDYNE RLWAWESWRS EVGKQLRPLY EEEVVLKNEI APANHYEDYG DYVWGDYEVN GVQGYDYSRG QLEDEVEHTF EEKPLYEHL HAYVRAKLIN AYPSYISPG CLPAHLLGDM WGRFWTNLYS LTVPPGQKPN IDVTDAMVDQ AWDAGRFKE AEKFFVSVOL PNMTCGFVEN SMLTDPGNVQ KAVCHPTAVD LGKSGFRILM CTKVTDDEL TAHHEMGNIG YDMAYAAQFF LLPNGANEGF HEAVGEIMSL SAATPKHLKS IGLSPDFQE DNETENFLL KQALITVGTI PFTYMLEKWR WNVFKGEIPK DQVMKKWNEI KREIVGVVEP VPHDETYPDASLFHVSNDY SFIRYITRIL YQFQCEALC GAAGHEGPLH KDIISNSTEA GQKLFNMLKL GKSEPWTAL ENHVGAKNMN VRPLNYFEP LFTWLKQCNK NSFVGVSTQV SPYADQSKV RISLKSALGD KAYEWNDEM YLFRSSVAYA MRQYFLKVN CMILFGEDY RVANLKPRI S FNFFVTAPKN VSDHPTEV EKAIMSRSR INDAFRINDN SLEFLGIQPT LPPNPQPPVS HMLVFGVVM GVNVGVIL IFTQDRKK KIKARSGENP YASIDISKE NNPFGQNTDD VQTSF	10

[0099] 薬剤選別による結果を図3に示す。遺伝子導入を行っていない対照群は、薬剤耐性がないため、薬剤添加後速やかに細胞が死滅していることが確認された。TMPRSS2遺伝子を導入した群は、細胞が増殖しており、薬剤耐性を有していることから、TMPRSS2遺伝子を含むレンチウイルスベクター配列が導入されていることが期待された。

[0100] また薬剤による選別後、TMPRSS2遺伝子を導入した細胞におけるTMPRSS2の発現をmRNAレベルで確認した。mRNA量は、上述の表1のTMPRSS2のプライマーセット及び既知濃度の鋳型を用いた絶対定量法にて、PCR溶液 (タカラバイオ (株), One Step TBG

reen PrimeScript™ RT-PCR Kit II, Cat # : RR086A) 及びリアルタイムPCR機器 (Step One Plus, Applied Biosystems 社) で検出した。PCR 反応は 50℃ で 2 分, 及び 95℃ で 2 分後, 変性を 95℃ で 20 秒, 対合を 54℃ で 30 秒, 伸長を 72℃ で 30 秒の 3 Step 条件で, 40 サイクル行った。結果を図 4 に示す。K-ML2 と比較し, K-ML2 に TMPRSS2 を導入した細胞 (K-ML2 / TMPRSS2) において, TMPRSS2 の発現が増加しており, TMPRSS2 が導入されたことが確認できた。

[0101] (実施例 6) レンチウイルスベクターによる ACE2 遺伝子の導入

Human immunodeficiency virus 1 型 (HIV-1) 増殖力等欠損株であり, EF1a プロモーターの下流に ACE2 (配列番号 10) を有し, CMV プロモーターの下流に前述の TMPRSS2 遺伝子導入時とは異なる薬剤耐性遺伝子を有する, 第 3 世代のレンチウイルスベクター (SignaGen 社) を用いて実施例 5 で作製した K-ML2 に TMPRSS2 遺伝子を導入した細胞 (K-ML2 / TMPRSS2) に対し, ACE2 遺伝子を導入した。24well プレートに α -MEM 培地 (20% FBS 含有) 中に懸濁した K-ML2 / TMPRSS2 細胞を 1×10^6 細胞 / ウェルで播種し, 2×10^6 TU 量のウイルスベクター液を添加して該ベクターを導入した。ベクター導入細胞を α -MEM 培地に懸濁させ, 終細胞数が 1×10^6 細胞 / ウェルとなるように α -MEM 培地 (20% FBS 含有) 中に 24well プレートに播種し, 37℃, 5% CO₂ インキュベータで培養した。培養 4 日後に遺伝子導入細胞を選別するためにネオマイシン (G418, Enzo Life Sciences 社, Cat # : ALX-380-013-G001) 存在下で, 選別した。その結果, ACE2 遺伝子を導入した群は, 細胞が増殖しており, 薬剤耐性を有していることから, ACE2 遺伝子を含むレンチウイルスベクター配列が導入されることが期待された。

[0102] 前述の操作で作製した細胞における ACE2 発現を mRNA 及びタンパク

質を測定して確認した。mRNA量は、上述の表1のACE2のプライマーセット及び既知の濃度鋳型を用いた絶対定量法にて、PCR溶液（タカラバイオ（株），One Step TB Green PrimeScript™ RT-PCR Kit II, Cat#: A25742）及びリアルタイムPCR機器（Step One Plus, Applied Biosystems社）で検出した。PCR反応は50℃で2分、及び95℃で2分後、変性を95℃で20秒、対合を54～56℃で30秒、伸長を72℃で30秒の3Step条件で、40サイクル行った。結果を図5に示す。K-ML2と比較し、実施例5で作製したK-ML2/TMPRSS2に前述の操作でACE2を導入した細胞（K-ML2/TMPRSS2/ACE2）において、ACE2の発現の増加が確認できた。そのため、実施例5での結果と合わせ、本操作で作製した細胞（K-ML2/TMPRSS2/ACE2）はK-ML2にTMPRSS2及びACE2が導入されたことが確認できた。

[0103] 以下、ACE2及びTMPRSS2を導入したK-ML2細胞（K-ML2/TMPRSS2/ACE2）をK株由来の「cMyIc」とも記載する。

[0104] （実施例7）cMyIcへのコロナウイルス感染性の測定

一般に感染ウイルスの検出には、（1）電子顕微鏡により直接観察、（2）ウイルスタンパク質を標的とした抗原抗体反応による方法、（3）ウイルス遺伝子配列に対する増幅法、及び（4）ウイルス感染細胞（死細胞）の検出がある。SARS-CoV-2感染性の細胞として広く知られているVero細胞において、SARS-CoV-2感染効率は培地に放出された増殖ウイルス由来遺伝子配列特異的な定量PCRによって計測可能であることが知られている。よって、ウイルス量は定量PCRにより測定した。

[0105] 実施例6で作製したK株由来のcMyIcを、 α -MEM培地（20% FBS含有）中、37℃、5%CO₂インキュベータ内で培養し、3日に一度培地交換を行うことで維持し調製した。このK株由来のcMyIcを細胞数が

2. 0×10^4 個/ウェルとなるように96ウェルプレートに播種した。

[0106] SARS-CoV-2は、神奈川県衛生研究所において感染者検体を培養細胞（Vero細胞）に接種し、増殖させたウイルス（SARS-CoV-2/Hu/DP/Kng/19-020）を用いた。感染Vero細胞培養液中に放出された培養上清を、ウイルスの終濃度が 1.0×10^1 , 1.0×10^2 , 1.0×10^3 copy/ μ Lとなるように α -MEM培地（20% FBS含有）で調製し、各ウェルに添加し、その後、37℃、5%CO₂インキュベータ内で培養した。さらに、培養3日目の培養上清中のウイルス数を定量PCRを用いて測定した。陽性対照として、TMPRSS2発現Vero細胞（Vero/TMPRSS2）（PLoS One. 2019; 14(4): e0215822, 国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 JCRB細胞バンクより購入（細胞番号: JCRB1818））を使用し、陰性対照として、 α -MEM培地（20%FBS含有）を用いた。

[0107] 具体的には、終濃度で 1.0×10^1 , 1.0×10^2 , 1.0×10^3 copy/ μ Lのウイルスを感染させた各細胞の培養上清よりSARS-CoV-2ウイルスRNAを抽出後、リアルタイムPCRに供した。ウイルスRNAはQIAamp Viral RNA Mini Kit（キアゲン社）により抽出し、リアルタイムPCRは公知の方法に基づき、SARS-CoV-2/Hu/DP/Kng/19-020の配列（Ascension# LC528232.1）に基づいたプライマーセット（表3, SigmaAldrich社）を用い、PCR溶液（One Step TB Green PrimeScript™ RT-PCR Kit II, TaKaRa社）及びリアルタイムPCR機器（QuantStudio3, Applied Biosystems社）を用いて検出した。PCR反応は前述のSigmaAldrich社のプライマー配列に基づき以下の、42℃で5分、及び95℃で10秒後、変性を95℃で5秒、伸長を60℃で34秒の2Step条件で、40サイクルで行った。ウイルス量はスタンダードカーブから算出した。

[0108] [表3]

プライマー名	プライマー配列	配列番号	増幅産物
CoV-2-SYBR-1_F	GCCTCTTCTCGTTCCCTCATCAC	11	110 bp
CoV-2-SYBR-1_R	AGCAGCATCACC GCCATTG	12	
CoV-2-SYBR-2_F	AGCCTCTTCTCGTTCCCTCATCAC	13	101 bp
CoV-2-SYBR-2_R	CCGCCATTGCCAGCCATTG	14	

[0109] 図6Aに示すように、Vero細胞では $1.0 \times 10^2 \text{ copy} / \mu\text{L}$ 以上、cMyIc細胞では、 $1.0 \times 10^3 \text{ copy} / \mu\text{L}$ 以上の感染により、培養3日目でSARS-CoV-2の増殖が確認された。 $1.0 \times 10^3 \text{ copy} / \mu\text{L}$ のウイルスを添加してから3日後の、細胞非添加群におけるウイルス量に対するウイルス量の割合（（各実験群の培養上清中のウイルス量）／（細胞非添加におけるウイルス量））をK-ML2とcMyIcとで比較した結果を図6Bに示す。K-ML2にACE2及びTMPRSS2を導入すること（K-ML2／TMPRSS2／ACE2）により、SARS-CoV-2の増殖が促進されることが示された。以上より、cMyIcにおいて、ヒト細胞における優れたSARS-CoV-2の増殖を達成できることが確認された。

[0110] （実施例8）不死化単球細胞からの樹状細胞の調製

実施例3で作製したK-ML2（cMyIcとの感染比較を理解しやすくするために、K株由来MyIc、以下略して「MyIc」と表記する）、及び実施例5で作製したcMyIcを、 α -MEM培地（20%FBS含有）中、37℃、5%CO₂インキュベータ内で培養し、3日に一度培地交換を行うことで維持し調製した。MyIc及びcMyIcを一度凍結保存した後に使用する場合には、37℃で湯煎後、 α -MEM培地（20%FBS含有）で懸濁し、遠心（300×g）して回収する操作を2回行った後、上述の培養及び培地交換を行った。調製されたcMyIcを、 $100 \text{ ng} / \text{mL}$ IL-4（Peprotech社、Cat#：200-04）の存在下で3日間培養して樹状細胞へと分化させて、MyIc又はcMyIc由来樹状細胞

を得た。以後において、MyIcを分化させて得られた樹状細胞を「MyIc-DC」，cMyIcを分化させて得られた樹状細胞を「cMyIc-DC」という。

[0111] (実施例9) cMyIc-DCへのコロナウイルス感染性の測定

SARS-CoV-2は、神奈川県衛生研究所において感染者検体を培養細胞(Verocell)に接種し、増殖してきたウイルス(SARS-CoV-2/Hu/DP/Kng/19-020)を用いた。ウイルスとして、感染Verocell培養液中に放出された培養上清を用いた。評価培地としては、10%FBS含有 α -MEM(Gibco社, Cat#:C1187500BT)を用いた。

[0112] 実施例8で得られたMyIc-DC及びcMyIc-DCは、T25フラスコ中のIL-4を含有する α -MEM培地(20% FBS, 及び100 ng/ml IL-4含有)で、実施例3で得られたMyIc及び実施例5で得られたcMyIcは、T25フラスコ中のIL-4を含有しない α -MEM培地(20%FBS含有)で、37℃, 5%CO₂インキュベータ内で3日間培養した。その後、全ての細胞を 1×10^4 個/ウェルとなるように96ウェルプレートに播種した。対照群として、TMPRSS2発現Verocell(Verocell/TMPRSS2)を(国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所JCRB細胞バンクより購入(細胞番号:JCRB1818))を使用した。

[0113] 調製したSARS-CoV-2を96ウェルプレート中のMyIc, cMyIc, MyIc-DC, 又はcMyIc-DCに添加して感染させ、37℃, 5%CO₂条件下で、評価培地(10%FBS含有 α -MEM)中で培養した。72時間後に培養上清を回収し、上清中に含まれる子孫ウイルスの感染量を定量PCR法に基づき測定した。具体的には、 1.08×10^3 , 1.08×10^4 , 1.08×10^5 TUのウイルスを感染させた各細胞の培養上清よりSARSウイルスRNAを抽出後、リアルタイムPCRに供した。なお、プライマーセット, PCR溶液, リアルタイムPCR機器, リアルタイム

μPCR条件は、実施例7におけると同じ条件とした。

[0114] SARS-CoV-2感作による、ウイルス放出量を図7に示す。MyIc及びMyIc-DCではネガティブコントロール(none)と比較してウイルス放出量に違いが無かったのに対し、cMyIc及びcMyIc-DCのウイルス放出量はネガティブコントロール(none)と比較して有意に多かった。特に、cMyIc-DCのウイルス放出量は、cMyIcより多いことから、SARS-CoV-2の増殖においては、より分化した細胞を用いることが好ましいことが明らかとなった。

[0115] (実施例10) コロナウイルス感染によるサイトカイン発現の検出

不死化単球細胞又は樹状細胞は、炎症性サイトカインとしてIL-6を分泌する。よって、作製した細胞がコロナ感染によりサイトカインを発現するか否かについて確認した。

[0116] 冷凍保存MyIc細胞又はcMyIc細胞を、37℃で湯煎後、α-MEM培地(20%FBS含有)で懸濁し、遠心(300×g)して回収する操作を2回行った後、10mlのα-MEM(Gibco BRL)にFBS(Cytiva Inc., Cat#:SH30088.03)を10%添加した培養液もしくは2又は5%HPL(Human platelet lysate, ヒト血小板由来サプリメント(AdvantaCell社, Cat#:HPCHXCG150))を添加した培養液中でT25フラスコに播種後、3日間培養した。

[0117] 実施例8で得られたMyIc-DC及びcMyIc-DCは、T25フラスコ中のIL-4(100ng/ml)を含有するα-MEM培地(20%FBS含有)で、MyIc及びcMyIcは、T25フラスコ中のIL-4を含有しないα-MEM培地(20%FBS含有)で、37℃、5%CO₂インキュベータ内で3日間培養した。その後、cMyIc又はcMyIc-DCを2×10⁴細胞/ウェルとなるように96wellプレートに播種した。

[0118] 実施例9と同様にして得られた、感染Verocell細胞培養液中に放出された培養上清をα-MEM培地(10%FBS含有)で100倍希釈(×100

), 又は1000倍希釈($\times 1000$)したSARS-CoV-2ウイルス含有液を96wellプレート中の, Mylc, Mylc-DC, cMylc, 又はcMylc-DCに添加して感染させ, 37°C, 5%CO₂条件下で, 評価培地(α -MEM培地(10%FBS含有))中で培養し, 得られた培養上清を評価に使用した。72時間後に培養上清を回収し, 測定まで-80°Cで保存した。培養上清に含まれるIL-6をBioLegend社製TELSA MAX™ Deluxe Set HUMAN IL-6キット, Cat#:430504を用いて, 製造者のプロトコールに従い測定した。陰性対照には培地を添加したものを使用した。

[0119] SARS-CoV-2ウイルス感染による, IL-6産生量を図8に示す。cMylcにより分泌されたIL-6は感染させたウイルス量に依存して増加し, Mylcに比べ優位に高かった。また, cMylc-DCのIL-6量はcMylcよりさらに多いことから, より分化した細胞において, SARS-CoV-2ウイルスに伴うIL-6産生が多いことが明らかとなった。

[0120] よって本実施例に記載された方法により作製したcMylc及びそれを分化して得られた細胞(cMylc-DCなど)は, SARS-CoV-2ウイルスによる感染及び増殖を可能とすることが示された。cMylc及びその分化細胞により, 従来の非ヒト細胞(例えばVerocell)によるSARS-CoV-2ウイルス感染実験と同等の検出実験をヒトの細胞で実施することを可能とするものである。

[0121] 本出願は、2020年10月7日付で日本国に出願された特願2020-170141を基礎としており、ここで言及することによりその内容はすべて本明細書に包含されるものである。

請求の範囲

- [請求項1] ACE2及びTMPRSS2をヒト不死化ミエロイド系細胞に導入することを含み、コロナウイルス感染性ヒト不死化ミエロイド系細胞の調製方法。
- [請求項2] 前記ヒト不死化ミエロイド系細胞が、M-CSF及び／又はGM-CSFを発現する細胞である、請求項1に記載の調製方法。
- [請求項3] 前記不死化ミエロイド系細胞にM-CSF及び／又はGM-CSFを導入すること、及び、
得られたM-CSF及び／又はGM-CSFを発現する不死化ミエロイド系細胞にACE2及びTMPRSS2を導入することを含み、請求項1に記載の調製方法。
- [請求項4] 前記ACE2及び前記TMPRSS2がレンチウイルスにより導入されることを特徴とする、請求項1～3のいずれか1項に記載の調製方法。
- [請求項5] 前記ヒト不死化ミエロイド系細胞が、ヒト不死化単球である、請求項1～4のいずれか1項に記載の調製方法。
- [請求項6] 請求項5の方法により得られたヒト不死化単球を樹状細胞へと分化させることを含み、ACE2及びTMPRSS2を発現する樹状細胞の調製方法。
- [請求項7] 前記コロナウイルスが、SARS-CoV-2である、請求項1～6のいずれか1項に記載の調製方法。
- [請求項8] ACE2及びTMPRSS2を発現するヒト不死化ミエロイド系細胞。
- [請求項9] さらに、M-CSF及び／又はGM-CSFを発現する、請求項8に記載のヒト不死化ミエロイド系細胞。
- [請求項10] 前記ヒト不死化ミエロイド系細胞が、ヒト不死化単球である、請求項8又は請求項9に記載の細胞。
- [請求項11] 前記ヒト不死化ミエロイド系細胞が、ヒト樹状細胞である、請求項

8又は請求項9に記載の細胞。

- [請求項12] 請求項9～11のいずれか1項に記載のヒト不死化ミエロイド系細胞の培養液にサンプルを添加すること、及び
前記細胞の培養上清中のコロナウイルスを検出すること、又はコロナウイルスのレベルを測定することを含む、サンプル中のコロナウイルスの存在を判定する方法。
- [請求項13] 前記培養上清中の前記コロナウイルスの検出又は前記コロナウイルスのレベルの測定が、前記サンプルの添加から1～7日目に行われる、請求項12に記載の方法。
- [請求項14] 前記コロナウイルスの検出又はコロナウイルスのレベルの測定が前記コロナウイルスのRNAの検出又はコロナウイルスのRNAレベルの測定により行われる、請求項12又は請求項13に記載の方法。
- [請求項15] 前記コロナウイルスのRNAの検出又はコロナウイルスのRNAレベルの測定が、定量PCRにより行われる、請求項14に記載の方法。
- [請求項16] 前記コロナウイルスの検出又はコロナウイルスのレベルの測定が、前記培養上清中の炎症性サイトカインの検出又は炎症性サイトカインレベルの測定により行われる、請求項12又は請求項13に記載の方法。
- [請求項17] 前記炎症性サイトカインがIL-6である、請求項16に記載の方法。
- [請求項18] 請求項9～11のいずれか1項に記載のヒト不死化ミエロイド系細胞の培養液にコロナウイルスを添加して該細胞に感染させること、及び
前記細胞の前記培養液中のコロナウイルスを回収することを含む、コロナウイルスの製造方法。
- [請求項19] 前記培養液中の前記コロナウイルスの回収が、前記コロナウイルスの添加から1～7日目に行われる、請求項18に記載の方法。

- [請求項20] 被検サンプルの抗コロナウイルス活性の評価方法であって、
前記被検サンプルの存在下で請求項9～11のいずれか1項に記載のヒト不死化ミエロイド系細胞の培養液にコロナウイルスを添加すること、及び
前記細胞の培養上清中の前記コロナウイルスのレベルを測定することを含み、
ここで、前記被検サンプルの存在下で前記コロナウイルスを添加した前記培養上清中の前記コロナウイルスのレベルが、前記被検サンプルの非存在下で前記コロナウイルスを添加した前記培養上清中のコロナウイルスのレベルよりも低い場合、該被検サンプルは抗コロナウイルス活性を有すると評価される方法。
- [請求項21] 被検サンプル中にコロナウイルス中和作用を有する物質が含まれるか否かを同定する方法であって、
前記被検サンプルの存在下で請求項9～11のいずれか1項に記載のヒト不死化ミエロイド系細胞の培養液にコロナウイルスを混和すること、及び
前記細胞の培養上清中の前記コロナウイルスのレベルを測定することを含み、
ここで、前記被検サンプルの存在下で前記コロナウイルスを添加した前記培養上清中の前記コロナウイルスのレベルが、前記被検サンプルの非存在下で前記コロナウイルスを添加した前記培養上清中のコロナウイルスのレベルよりも低い場合、該被検サンプルはコロナウイルス中和作用を有する物質を含有すると同定される方法。
- [請求項22] 前記被検サンプルが、血液サンプルである、請求項21に記載の方法。
- [請求項23] 前記コロナウイルス中和作用を有する物質が、コロナウイルス中和抗体である、請求項21又は請求項22に記載の方法。
- [請求項24] コロナウイルスワクチンの中和抗体誘導能の評価方法であって、

当該ワクチンを接種された哺乳動物由来の血液サンプルを被検サンプルとして請求項 22 又は請求項 23 に記載の方法を実施することを
含む、方法。

[請求項25] 前記培養上清中の前記コロナウイルスのレベルの測定が、前記被検サンプル又は前記サンプルの添加から 1 ～ 7 日目に行われる、請求項 20 ～ 24 のいずれか 1 項に記載の方法。

[請求項26] 前記コロナウイルスの検出又はコロナウイルスのレベルの測定が前記コロナウイルスの RNA の検出又はコロナウイルスの RNA レベルの測定により行われる、請求項 20 ～ 25 のいずれか 1 項に記載の方法。

[請求項27] 前記コロナウイルスの RNA レベルの測定が、定量 PCR により行われる、請求項 26 に記載の方法。

[請求項28] 前記コロナウイルスのレベルの測定が、前記培養上清中の炎症性サイトカインレベルの測定により行われる、請求項 20 ～ 25 のいずれか 1 項に記載の方法。

[請求項29] 前記炎症性サイトカインが IL-6 である、請求項 28 に記載の方法。