

整理番号	H26-J-047	報告者氏名	高橋 忠伸
------	-----------	-------	-------

研究課題名

ウイルス酵素活性をライブイメージングする材料の開発

<代表研究者> 機関名：静岡県立大学大学院 職名：准教授 氏名：高橋忠伸
薬学研究院 生化学講座

<共同研究者> 機関名：広島国際大学 薬学部 職名：教授 氏名：池田 潔
機関名： 職名： 氏名：
機関名： 職名： 氏名：
機関名： 職名： 氏名：

<研究内容・成果等の要約>

本研究の目的は、インフルエンザ A 型ウイルスに代表されるウイルスがもつ「シアリダーゼ」と呼ばれる酵素活性を高感度、シャープにライブイメージングする材料を開発することである。具体的には、生きた状態の感染細胞表面や感染細胞内の極めて高いウイルスシアリダーゼ活性に反応して、水に不溶性の蛍光物質を生成する材料の開発である。この不溶性蛍光物質は、シアリダーゼ活性の存在部位へ局所的に沈着することで、ウイルス感染細胞および感染細胞内のシアリダーゼ活性の蛍光ライブイメージングが可能となる。抗ウイルス抗体を必要とせず、細胞・ウイルスの固定化も必要としない、本材料を添加するだけの極めて簡便な方法で、高感度・迅速にウイルス感染細胞やウイルスのシアリダーゼ活性の挙動を解析できる。

代表者らはシアリダーゼ蛍光化剤「BTP3-Neu5Ac」を開発してきた。BTP3-Neu5Ac がインフルエンザ A 型・B 型ウイルス、センダイウイルス、ニューキャッスル病ウイルスのシアリダーゼ活性を蛍光化できることを実証してきた。本研究で BTP3-Neu5Ac は、さらにヒトに病原性を示すパラミクソウイルスである、ヒトパラインフルエンザウイルス ([Takahashi, Biol. Pharm. Bull. 38, 1214-1219, 2015](#))、おたふく風邪ウイルス ([Takahashi, PLoS One 10, e0144038, 2015](#)) のシアリダーゼ活性を蛍光化し、感染細胞を蛍光イメージングできることを報告した。また、抗インフルエンザ医薬品（シアリダーゼ阻害剤）と BTP3-Neu5Ac の併用により、薬剤耐性インフルエンザウイルスやその感染細胞のみを選択的に蛍光イメージングし、薬剤耐性ウイルス株を高効率に分離する技術を確立した ([Takahashi, PLoS One 11, e0156400, 2016](#))。

BTP3-Neu5Ac のシアリダーゼ反応後に生成する不溶性蛍光物質 BTP3 は、時間とともに細胞内や蛍光化された細胞の周囲の非感染細胞へ拡散する。そのため、シアリダーゼ反応の長時間化で非感染細胞の蛍光化を起こすこと、感染細胞のシアリダーゼ活性の蛍光染色像が不鮮明になることが挙げられる。本研究は、細胞内ライブイメージングに向けたこれらの課題を解決するために、BTP3 部分の疎水性を増大させて拡散を抑えて生細胞内移行性を向上させることによって、シアリダーゼ活性の蛍光染色像の鮮明化をめざす。シアリダーゼ活性のライブイメージングに向けた BTP3-Neu5Ac の改良基盤を確立しつつある。

<研究発表 (口頭、ポスター、誌上別)>

【原著論文】

1. **Tadanobu Takahashi**, Saori Unuma, Sawako Kawagishi, Yuuki Kurebayashi, Maiko Takano, Hiroki Yoshino, Akira Minami, Takashi Yamanaka, Tadamune Otsubo, Kiyoshi Ikeda, Takashi Suzuki. Substrate specificity of equine and human influenza A virus sialidase to molecular species of sialic acid. *Biol. Pharm. Bull.* in press. (謝辞欄に貴財団を記載)
2. Yuuki Kurebayashi*, **Tadanobu Takahashi*** (*These authors contributed equally to this work), Chihiro Tamoto, Keiji Sahara, Tadamune Otsubo, Tatsuya Yokozawa, Nona Shibahara, Hirohisa Wada, Akira Minami, Kiyoshi Ikeda, Takashi Suzuki. High-efficiency capture of drug resistant-influenza virus by live imaging of sialidase activity. *PLoS One* 11, e0156400 (2016) (謝辞欄に貴財団を記載)
3. **Tadanobu Takahashi**, Takashi Agarikuchi, Yuuki Kurebayashi, Nona Shibahara, Chihiro Suzuki, Akiko Kishikawa, Keijo Fukushima, Maiko Takano, Fumie Suzuki, Hirohisa Wada, Tadamune Otsubo, Kiyoshi Ikeda, Akira Minami, Takashi Suzuki. Easy and Rapid Detection of Mumps Virus by Live Fluorescent Visualization of Virus-Infected Cells. *PLoS One* 10, e0144038 (2015) (謝辞欄に貴財団を記載)
4. **Tadanobu Takahashi**, Maiko Takano, Yuuki Kurebayashi, Takashi Agarikuchi, Chihiro Suzuki, Keijo Fukushima, Shunsaku Takahashi, Tadamune Otsubo, Kiyoshi Ikeda, Akira Minami, Takashi Suzuki. Rapid fluorescent detection assay for human parainfluenza viruses. *Biol. Pharm. Bull.* 38, 1214-1219 (2015) (謝辞欄に貴財団を記載)

【総説】

1. **高橋忠伸**, 紅林祐希, 大坪忠宗, 池田 潔, 南 彰, 鈴木 隆 シアリダーゼを利用したウイルス感染細胞の蛍光イメージング、公益社団法人 日本分析化学会「分析化学」総説論文、in press (2016) (謝辞欄に貴財団を記載)
2. **高橋忠伸** インフルエンザウイルスが結合する糖鎖分子の機能解明、日本ウイルス学会誌「ウイルス」66(1), 101-116 (2016) (謝辞欄に貴財団を記載)
3. 大坪忠宗, 池田 潔, 南 彰, **高橋忠伸**, 鈴木 隆: 蛍光組織染色が可能なシアリダーゼ蛍光プローブ、和光純薬時報 84 (2), 5-7 (2016)
4. **Tadanobu Takahashi**. Properties of and a new technique for fluorescent detection of influenza virus sialidase. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* 27 (158), E49-E60 (2015) (謝辞欄に貴財団を記載)
5. **高橋忠伸** インフルエンザウイルスのシアリダーゼの性状と新しい蛍光検出法、*Trends Glycosci. Glycotechnol.* 27 (158), J49-J60 (2015) (謝辞欄に貴財団を記載)
6. **高橋忠伸**: ウイルス酵素を利用したウイルスや感染細胞の簡便、迅速な検出試薬の開発とその応用、*実験医学* (2015年8月号、羊土社) Vol. 33, No. 13, p. 2114 (2015)
7. **高橋忠伸**: インフルエンザウイルスの新たな創薬や防疫戦略の開発をめざした研究、*Aging&Health* 73号 (2015年4月発行、株式会社厚生科学研究所)、38-41 (2015)

【学会発表】

1. **Tadanobu Takahashi**, Yuuki Kurebayashi, Tadamune Otsubo, Kiyoshi Ikeda, Shunsaku Takahashi, Maiko Takano, Takashi Agarikuchi, Tsubasa Sato, Yukino Matsuda, Akira Minami, Hiroaki Kanazawa, Yuko Uchida, Takehiko Saito, Yoshihiro Kawaoka, Toshihiro Yamada, Fumihiko Kawamori, Robin Thomson, Mark von Itzstein, Takashi Suzuki: Histochemical Fluorescent Visualization of Influenza Virus Sialidase activity. The 11th Japan-China International Symposium on Health Sciences (Shizuoka), program book, p. 19, November 5, 2014 (英語口頭)
2. **高橋忠伸**: インフルエンザウイルスの新たな創薬・防疫戦略の開発をめざした糖鎖科学の研究と利用技術の開発、公益財団法人 長寿科学振興財団 長寿科学賞 第15回若手研究者表彰式 (東京)、長寿科学賞受賞講演、2014年11月26日 (招待講演)
3. **高橋忠伸**: ウイルス酵素を利用したウイルスや感染細胞の簡便、迅速な検出試薬の開発とその応用、東京バイオマーカー・イノベーション技術研究組合 (TOBIRA) 第4回研究交流フォーラム (東京)、第3回 TOBIRA 賞受賞講演、2015年2月2日 (招待講演)
4. 上り口 敬、**高橋忠伸**, 鈴木千尋, 紅林祐希, 高野舞子, 福島圭義, 伊藤史恵, 柴原乃奈, 和田裕久, 大坪忠宗, 池田 潔, 金澤寛明, 南 彰, 鈴木 隆: シアリダーゼに対する染色用蛍光基質を用いたおたふく風邪ウイルスの検出、日本薬学会第135年会 (神戸)、2015年3月27日 (口頭)
5. 紅林祐希, **高橋忠伸**, 田本千尋, 大坪忠宗, 池田 潔, 鈴木 隆: 薬剤師性判定に利用可能なインフルエンザウイルス蛍光検出法の確立、第61回日本薬学会東海支部 総会・大会 (名古屋)、2015年7月4日 (口頭)
6. **高橋忠伸**: 糖鎖を利用したウイルスと宿主の生存戦略、糖鎖科学中野拠点 糖鎖科学講義 (名古屋)、2015年7月29日 (招待講演)
7. **高橋忠伸**, 上り口 敬, 紅林祐希, 高野舞子, 福島圭義, 鈴木千尋, 柴原乃奈, 和田裕久, 大坪忠宗, 池田 潔, 南 彰, 鈴木 隆: シアリダーゼ蛍光イメージング剤を用いたヒト病原ライニンフルエンザウイルスの検出分離法の開発、第34回日本糖質学会年会 (東京)、要旨集 p. 149, 2015年8月2日 (口頭)
8. 紅林祐希, **高橋忠伸**, 田本千尋, 大坪忠宗, 池田 潔, 鈴木 隆: 薬剤師性判定を可能とするインフルエンザウイルス蛍光検出法の確立、第14回 次世代を担う若手ファーマ・バイオフィォーラム2015 (千葉)、2015年9月12日 (口頭)
9. **Tadanobu Takahashi**: Functional analysis of glyco-molecules that bind with influenza virus. The 63rd Annual Meeting of the Japanese Society for Virology (Fukuoka) Invited lecture for Sugiura award, program book p. 106, November 24, 2015 (招待講演、英語口頭)
10. **高橋忠伸**, 疋田 智也, 南 彰, 鈴木隆: ウイルス酵素蛍光化プローブの開発とインフルエンザウイルスの薬剤師性検出法の確立、「産・学・民・官」の連携を考えるついで2015 (静岡)、2015年12月17日 (ポスター)
11. **高橋忠伸**: ウイルス感染における糖鎖の機能解明と糖鎖の利用技術の開発、第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2015, 神戸) ワークショップ「糖鎖を利用した、異物と宿主の生存戦略」(予定)、2015年12月3日 (招待講演)
12. **高橋忠伸**: 薬剤師性インフルエンザウイルスの高感度、簡便、迅速な検出方法および分離法の開発、第1回ふじのくに地域・大学フォーラム (静岡)、2016年2月27日 (招待講演)
13. **高橋忠伸**, 紅林祐希, 大坪忠宗, 池田 潔, 南 彰, 鈴木 隆: シアリダーゼを利用したインフルエンザウイルスの蛍光イメージング剤の開発、日本分析化学会 第76回分析化学学術大会 (岐阜)、2016年5月28日 (招待講演)
14. **高橋忠伸**: ウイルス酵素をライブイメージングする蛍光プローブの開発、BioJapan2016 一般財団法人 バイオインダストリー協会 2016年度 化学・生物素材研究開発奨励賞 受賞講演 (横浜)、2016年10月12日 (招待講演、決定)
15. **高橋忠伸**: インフルエンザウイルスの感染を可視化するシアリダーゼ蛍光イメージング剤の開発、第21回 静岡健康・長寿学術フォーラム「生命科学研究を基盤としたモノづくり」セッション講演者 (静岡)、2016年11月25日 (招待講演、決定)

【受賞】

1. **高橋忠伸**: (公財) 長寿科学振興財団 長寿科学賞「インフルエンザウイルスの新たな創薬・防疫戦略の開発をめざした糖鎖科学の研究と利用技術の開発」、2014年11月26日
2. **高橋忠伸**: 東京バイオマーカー・イノベーション技術研究組合 (TOBIRA) 第3回 TOBIRA 奨励賞「ウイルス酵素を利用したウイルスや感染細胞の簡便、迅速な検出試薬の開発とその応用」、2015年2月2日
3. **高橋忠伸**: 静岡県立大学 第一回 学長表彰、2015年3月23日
4. 紅林祐希, **高橋忠伸**, 田本千尋, 大坪忠宗, 池田 潔, 鈴木 隆: 薬剤師性判定に利用可能なインフルエンザウイルス蛍光検出法の確立、第61回日本薬学会東海支部 総会・大会 (名古屋) 学生優秀発表賞、2015年7月4日
5. 紅林祐希, **高橋忠伸**, 田本千尋, 大坪忠宗, 池田 潔, 鈴木 隆: 薬剤師性判定を可能とするインフルエンザウイルス蛍光検出法の確立、第14回 次世代を担う若手ファーマ・バイオフィォーラム2015 (千葉) 優秀発表賞、2015年9月12日
6. 紅林祐希, **高橋忠伸**, 鶴沼沙織, 山中隆史, 鈴木 隆: ウマインフルエンザウイルスノイラミニダーゼの酸性安定性に関する検討、日本内院薬師会東海ブロック日本薬学会東海支部合同学術大会2015 (名古屋) ベストプレゼン賞、2015年11月11日
7. **高橋忠伸**: 日本ウイルス学会 杉浦奨励賞「インフルエンザウイルスが結合する糖鎖分子の機能解明」、2015年11月23日
8. 紅林祐希, **高橋忠伸**, 大坪忠宗, 田本千尋, 池田 潔, 鈴木 隆: 薬剤師性インフルエンザウイルスの迅速かつ選択的な検出分離法の確立、日本薬学会第136年会 (横浜) 学生優秀発表賞、2016年4月11日
9. **高橋忠伸**: 静岡県立大学 第二回 学長表彰、2016年3月24日
10. **高橋忠伸**: (一財) バイオインダストリー協会 化学・生物素材研究開発奨励賞「ウイルス酵素をライブイメージングする蛍光プローブの開発」、2016年10月12日 (決定)

【特許】

1. 鈴木 隆, **高橋忠伸**, 南 彰, 池田 潔, 大坪忠宗: 新規化合物及び誘導化合物を含む蛍光組成物 (特願2015-18871)

<研究の目的、経過、結果、考察（5000 字程度、中間報告は 2000 字程度）>

【目的】

我々が開発したウイルスのシアリダーゼ活性の蛍光化プローブ「BTP3-Neu5Ac」の応用法を確立する。BTP3-Neu5Ac は、緑色蛍光を発する水に不溶性の蛍光物質（2-ベンゾチアゾール-2-イル）-4-ブロモフェノール（BTP3）（励起波長/蛍光波長=372 / 526 nm）に Neu5Ac を結合させて蛍光性をオフ制御した水溶性のシアリダーゼ基質である。BTP3-Neu5Ac はシアリダーゼ反応により、シアリ酸の主要分子種 *N*-アセチルノイラミン酸（Neu5Ac）との結合が加水分解されると、生成した BTP3 がシアリダーゼ活性の存在部位に沈着して蛍光染色する。シアリダーゼを持つインフルエンザ A 型ウイルスの感染細胞では細胞表面にウイルス由来のシアリダーゼが豊富に発現するため、BTP3-Neu5Ac の添加により感染細胞を蛍光イメージングできる（図 1）。本研究では、ヒトに病原性を示すパラミクソウイルスである、ヒトパラインフルエンザウイルス、おたふく風邪ウイルスやこれらの感染細胞の蛍光イメージングにおける適用性や有用性を検討する。また、抗インフルエンザ医薬品（シアリダーゼ阻害剤）に対する耐性化インフルエンザウイルスやその感染細胞の選択的蛍光イメージングと、薬剤耐性ウイルス株の高効率分離法を確立する。さらに、生きた状態の感染細胞内のウイルスシアリダーゼ活性の蛍光ライブイメージングに適した蛍光剤の改良をめざす。

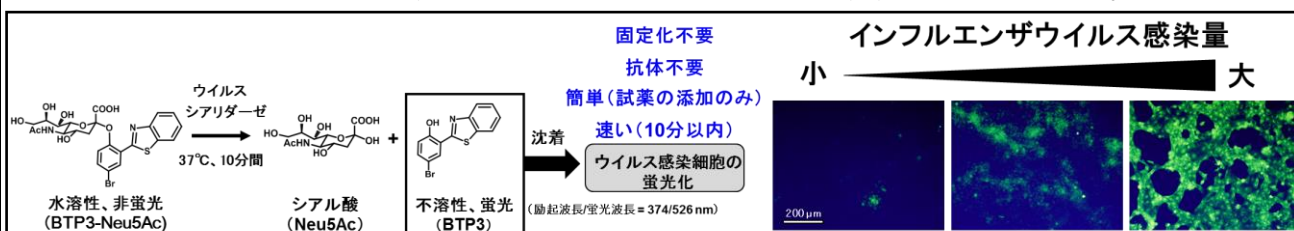


図 1. シアリダーゼ活性の蛍光化プローブ「BTP3-Neu5Ac」による蛍光化機構とインフルエンザ A 型ウイルス感染細胞の蛍光イメージング

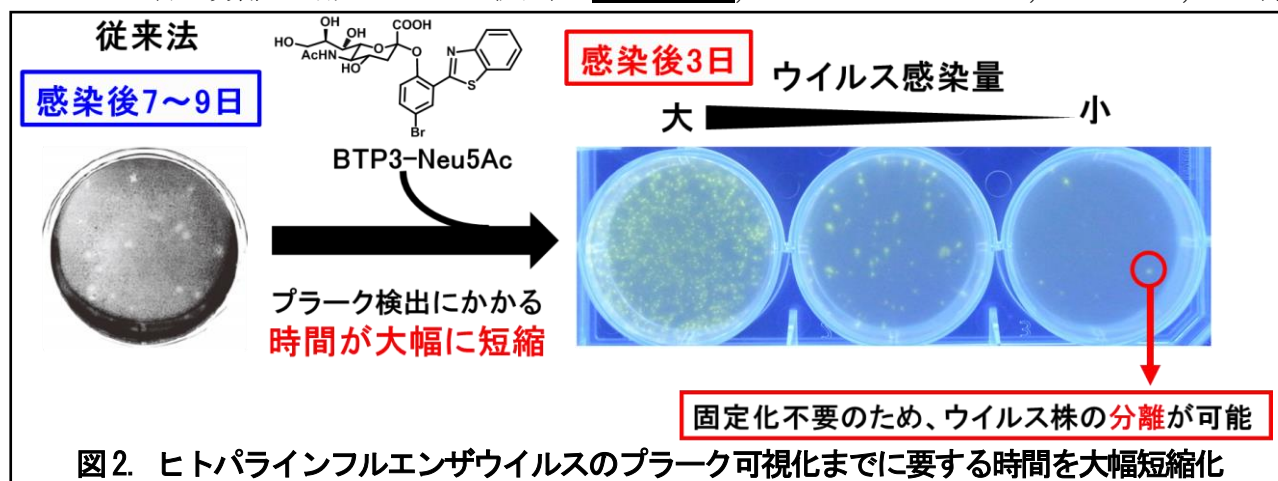
【経過】

インフルエンザ A 型および B 型ウイルス ([Takahashi, Sci. Rep. 4, 4877, 2014](#))、げっ歯類病原ウイルスのセンダイウイルス ([Takahashi, Virology 464-465, 206-212, 2014](#))、鳥類病原ウイルスのニューキャッスル病ウイルス ([Takahashi, J. Virol. Methods 209, 136-142, 2014](#)) のシアリダーゼ活性を BTP3-Neu5Ac によって蛍光化する技術を確立してきた。また、水に不溶性の蛍光物質ベンゾチアゾリルフェノール誘導体 BTP にガラクトースを結合させたもの、あるいは汎用性の高い緑色蛍光を発するベンゾチアゾリルフェノール誘導体 BTP3 にリン酸基を結合させたもので蛍光性をオフ制御した化合物は、それぞれ β -ガラクトシダーゼとアルカリホスファターゼの加水分解酵素活性を蛍光化できることを明らかにしてきた ([Otsubo, Minami, Fujii, Taguchi, Takahashi, Bioorg. Med. Chem. Lett. 23, 2245-2249, 2013](#); [Takahashi, Biol. Pharm. Bull. 37, 1668-1673, 2014](#))。

【結果と考察】

BTP3-Neu5Ac は、5 歳未満の小児ウイルス性肺炎の原因の 2 割を占めるヒトパラインフルエンザウイルスのシアリダーゼ活性を蛍光化できることが判明した。ヒトパラインフルエンザウイルスは主な血清型の 1 型と 3 型を使用した。pH 6 付近から中性にかけて高いシアリダーゼ活性を示すインフルエンザ A 型ウイルスとは異なり、ヒトパラインフルエンザウイルス 1 型は pH 4.0~4.5、ヒトパラインフルエンザウイルス 3 型は pH 4.7 にシアリダーゼ活性の至適がある。そのため、BTP3-Neu5Ac によるヒトパラインフルエンザウイルス検出は酸性条件下が適している。ヒトパラインフルエンザウイルス 1 型 (C35 株) およびヒトパラインフルエンザウイルス 3 型 (C243 株) を PVDF 膜上に吸着させ、pH 4.0~6.0 の各酢酸緩衝液下で 10 μ M BTP3-Neu5Ac を室温で 10 分間反応させた。ヒトパラインフルエンザウイルス 1 型は pH 4.0 で、ヒトパラインフルエンザウイルス 3 型は pH 4.5 で BTP3-Neu5Ac による最も強い蛍光バンドが見られた、蛍光はかなり弱くなるが、pH 6.0 でも蛍光バンドは見られた。ヒトパラインフルエンザウイルス 1 型を感染させたアカゲザル腎由来 LLCMK₂

細胞を 37°C、48 時間培養した。細胞をリン酸等張緩衝液 (PBS) で洗浄後、25 μM BTP3-Neu5Ac を含む無血清培地 (塩酸で pH 4.5 に調整) で 37°C、5 分間反応させることで、感染細胞を蛍光イメージングすることに成功した。この蛍光化は、ヒトパラインフルエンザウイルス 1 型のシアリダーゼを阻害する 2-デオキシ-2,3-ジデヒドロ-Nアセチルノイラミン酸 (DANA) や代表者らが開発してきた 4-O (2-チエニル-2-プロピニル) DANA の存在下で完全に抑制されることから、感染細胞上に発現したウイルスシアリダーゼの活性に由来することを確認した。ヒトパラインフルエンザウイルス 3 型を同様に感染させた細胞においても蛍光イメージングできることを確認した。BTP3 の蛍光性は pH に影響されにくく酸耐性であるため、酸性条件下で高いシアリダーゼ活性を示すヒトパラインフルエンザウイルスの検出に適している。ヒトパラインフルエンザウイルス 1 型は細胞死誘導能が低いことから、従来のプラーク形成法 [感染細胞を寒天培地で重層後に培養し、一つのウイルス株に由来する感染細胞集団の死による脱落 (プラーク) を視覚化する手法、このウイルスでは代表者らがプラーク形成法を開発した、Fukushima, Takahashi, *Biol. Pharm. Bull.* 34, 996-1000, 2011] ではプラーク形成までに 7~9 日間を要する。BTP3-Neu5Ac を寒天培地に滴下することでこのプラークを鮮明に蛍光化することに成功し、プラーク形成までの時間を 3 日までに大幅短縮した。さらに、生きた状態の細胞のため、蛍光化プラークを直接ピックアップすることにより、ヒトパラインフルエンザウイルス 1 型株の分離が可能であった (図 2) (Takahashi, *Biol. Pharm. Bull.* 38, 1214-1219, 2015)。



おたふく風邪ウイルスのシアリダーゼは pH 4.5 で最も高い活性が見られるものの、pH 5.0 以上で活性が急激に低下するヒトパラインフルエンザウイルスとは異なり、pH 4.0~7.0 にかけて比較的高い活性を維持する。そこで BTP3-Neu5Ac によるおたふく風邪ウイルスの検出は、培養細胞への適用性が良く扱いやすい中性条件で実施することにした。おたふく風邪ウイルス (12V287V2 株) を PVDF 膜上に吸着させ、10 μM BTP3-Neu5Ac を含む pH 7.2 の PBS 中で 37°C、15 分間反応させることで明確な蛍光バンドが見られた。おたふく風邪ウイルスをアフリカミドリザル腎由来 Vero 細胞に感染させ、37°C、48 時間培養した。細胞を PBS で洗浄後、10 μM BTP3-Neu5Ac を含む PBS 中で 37°C、15 分間反応させた。おたふく風邪ウイルス感染細胞は明確に蛍光イメージングされた。おたふく風邪ウイルスのシアリダーゼ活性を阻害する DANA 存在下、BTP3-Neu5Ac による蛍光化は阻害された。また、おたふく風邪ウイルスのシアリダーゼ遺伝子を導入後 24 時間培養したアフリカミドリザル腎由来 COS-7 細胞においても、10 μM BTP3-Neu5Ac を含む PBS 中で 37°C、15 分間反応により蛍光イメージングされた。BTP3-Neu5Ac は、おたふく風邪ウイルス感染細胞上やシアリダーゼ発現細胞上に発現するおたふく風邪ウイルスのシアリダーゼ活性を 15 分間で簡便に蛍光イメージングすることができた。使用したおたふく風邪ウイルス株において、感染 6 日後までに光学顕微鏡観察下で感染細胞の退行変性や多核巨細胞形成 (おたふく風邪ウイルス株によっては感染細胞で見られる) が見られなかった。BTP3-Neu5Ac は、遅くとも感染 2 日後でおたふく風邪ウイルス感染細胞を明確に蛍光イメージングできるため、多核巨細胞を観察する従来法と比較しておたふく風邪ウイ

ルス感染細胞の検出までにかかる時間を大幅に短縮できた (図 3 左)。また、感染細胞に重層したアガロース培地上に BTP3-Neu5Ac を滴下することで、ウイルス感染細胞集団をプラーク状に明確に蛍光イメージングすることに成功した。この蛍光化は感染 4 日後には実施できるため、おたふく風邪ウイルスのプラークの視覚化にかかる時間の短縮につながる (図 3 右)。蛍光化プラークを直接ピックアップすることにより、おたふく風邪ウイルス株の分離も可能であった (Takahashi, *PLoS One* 10, e0144038, 2015)。BTP3-Neu5Ac による蛍光イメージングは、単に感染価 (プラーク数) の測定時間が短縮化されるだけではない。この方法は、正確な感染価が必要とされるおたふく風邪ワクチン力価の評価やウイルス感染実験において、蛍光化プラーク数を指標とする統一的な感染価を与える測定法として役立つものと期待される。

抗インフルエンザ医薬品 (シアリダーゼ) 阻害剤の存在下で維持される薬剤耐性インフルエンザ A 型ウイルスのシアリダーゼ活性を BTP3-Neu5Ac で蛍光イメージングすることで、薬剤耐性ウイルスやその感染細胞のみを選択的に蛍光イメージングすることに成功した。抗イン

フルエンザ医薬品オセルタミビルに耐性化したインフルエンザ A 型ウイルス株とオセルタミビルに感受性を示すインフルエンザ A 型ウイルス株を混合感染させたイヌ腎臓由来 MDCK 細胞にアガロース培地を重層して 2 日間培養した。阻害剤の無い条件またはオセルタミビル存在下で、BTP3-Neu5Ac によりプラークを蛍光イメージングした。オセルタミビル存在下で蛍光化されたプラークの数は、オセルタミビル耐性ウイルス株の量に依存していた (図 4)。オセルタミビル存在下で蛍光化されたプラークが、オセルタミビル耐性ウイルス株に由来することを確認するため、各蛍光化プラークからウイルス株を分離し、そのシアリダーゼ遺伝子上のオセルタミビル耐性変異 (オセルタミビル耐性 275Y、オセルタミビル感受性 275H) を検出した。24 個の蛍光化プラークをピックアップし、すべてにオセルタミビル耐性ウイルスが検出された。薬剤耐性ウイルス株の高効率な分離法を確立した。24 個の中で 2 個について、オセルタミビル感受性ウイルスも同時に検出された。オセルタミビル感受性ウイルスに由来するプラークは蛍光化されていないため、オセルタミビル耐性ウイルスに由来する蛍光化プラークと重なってしまい、両ウイルス株が同時に検出されたものと考えられる (Takahashi, *PLoS One* 11, e0156400, 2016)。

BTP3 構造の疎水性化により、BTP3-Neu5Ac の局所染色性の高精度化と生細胞内移行性の向上に成功した (特願 2015-18871、特許出願内容のため構造の詳細は省略)。

おたふく風邪ウイルス感染細胞に逆行変性や多核巨細胞形成が感染 6 日後までに見られない

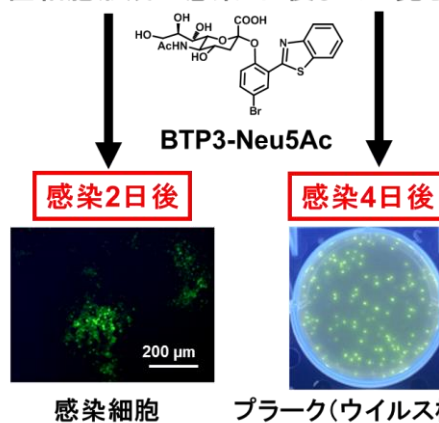


図 3. おたふく風邪ウイルスの感染細胞の蛍光イメージングとプラークの蛍光可視化

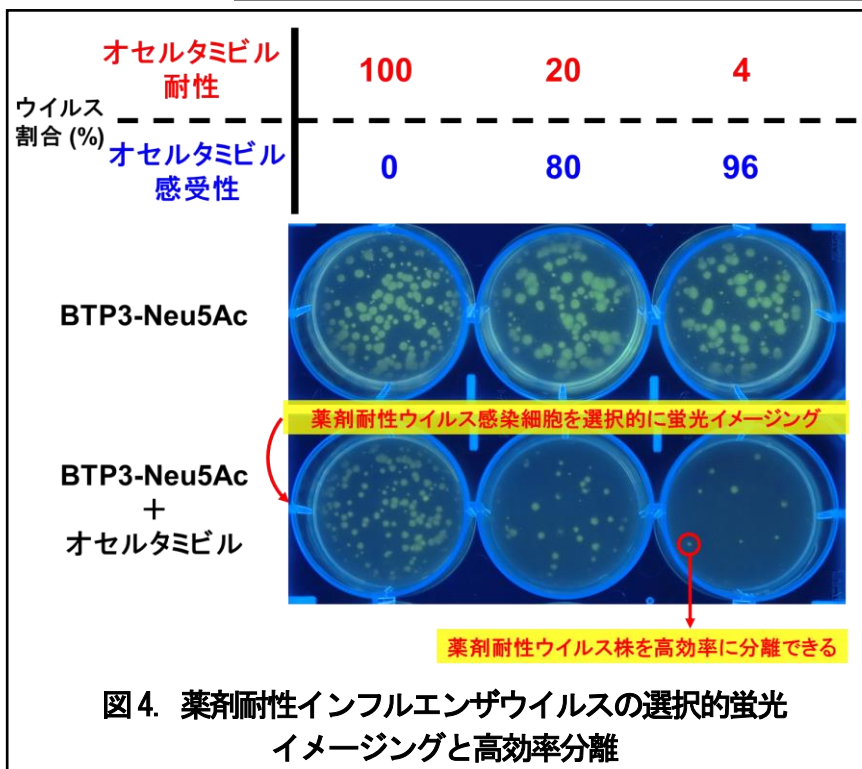


図 4. 薬剤耐性インフルエンザウイルスの選択的蛍光イメージングと高効率分離