

各ウイルス種の識別を可能とする イメージング剤の開発

静岡県立大学 薬学部 薬学科 准教授 高橋忠伸

2024年10月29日



本日のテーマ

シアリダーゼ蛍光イメージング剤 BTP3-Neu5Acの開発と応用

局所染色性を向上させた BTP9-Neu5Acの開発と応用

各ウイルス種の識別を可能とする イメージング剤の開発



本日のテーマ

シアリダーゼ蛍光イメージング剤 BTP3-Neu5Acの開発と応用

局所染色性を向上させた BTP9-Neu5Acの開発と応用

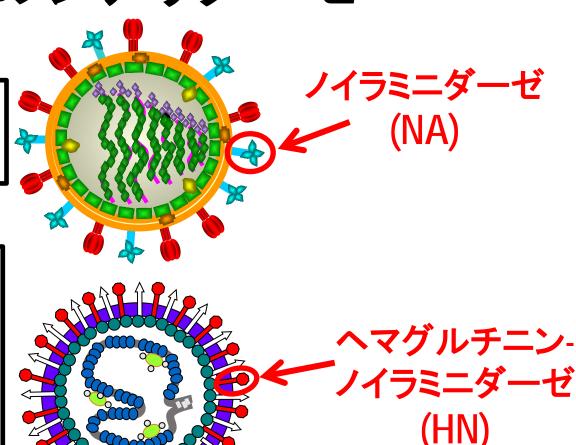
各ウイルス種の識別を可能とする イメージング剤の開発

ウイルスのシアリダーゼ

ヒト病原ウイルス

A型インフルエンザウイルス B型インフルエンザウイルス

一部のパラミクソウイルス ムンプスウイルス ヒトパラインフルエンザウイルス センダイウイルス ニューカッスル病ウイルス

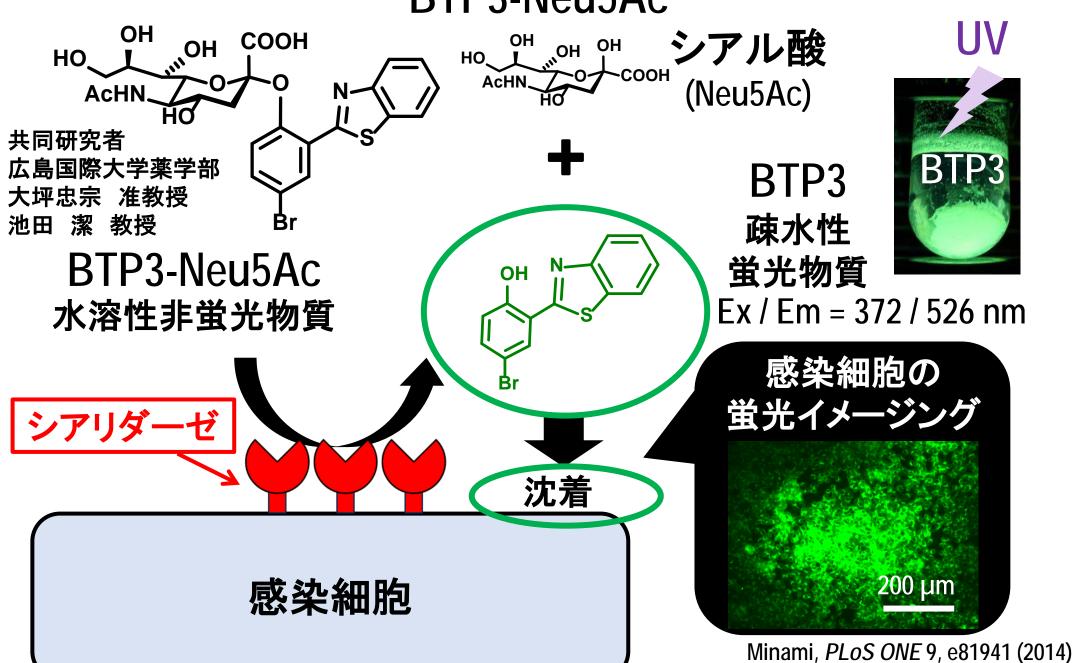




新技術説明会 New Technology Presentation Meetings!

シアリダーゼ蛍光イメージング剤

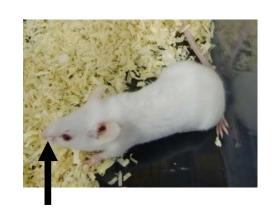
BTP3-Neu5Ac



Kurebayashi, Takahashi, Sci. Rep. 4, 4877 (2014) 5



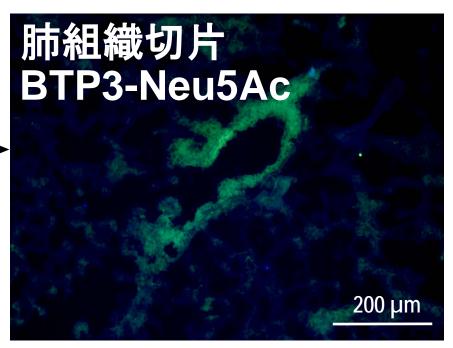
ウイルス感染の蛍光イメージング



感染24時間後

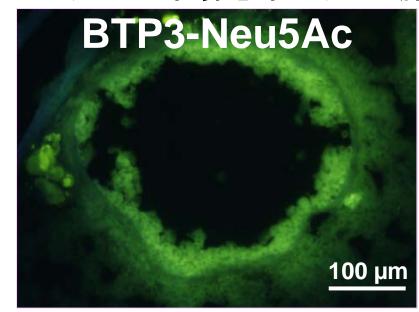
A型インフルエンザウイルス 経鼻感染マウス

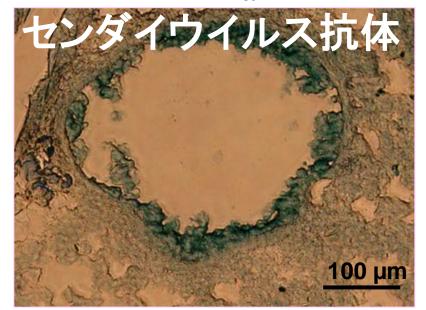
Kurebayashi, Takahashi, Sci. Rep. 4, 4877 (2014)



センダイウイルス経鼻感染マウスの肺組織切片

Takano, Takahashi, Virology 464-465, 206-212 (2014)



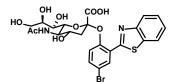




ウイルス感染価の測定とウイルス単離

感染細胞を寒天培地で重層

従来法:プラーク法



HOACH (感染細胞集団の脱落)



感染後3日

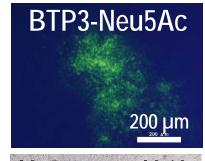
ウイルス株の単離

BTP3-Neu5Ac

A型インフルエンザウイルス感染量

感染後2日

フォーカスのライブイメージング







薬剤耐性インフルエンザウイルス

抗インフルエンザ薬

NA(シアリダーゼ)阻害薬

ザナミビル オセルタミビル ラニナミビル ペラミビル

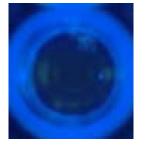
(商品名 リレンザ) (商品名 タミフル) (商品名 イナビル) (商品名 ラピアクタ)

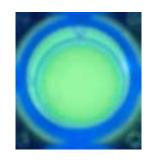
薬剤感受性ウイルス

BTP3-Neu5Ac

NA阻害薬

薬剤耐性ウイルス



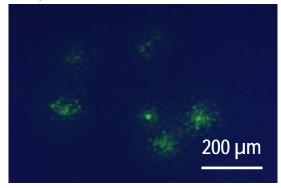




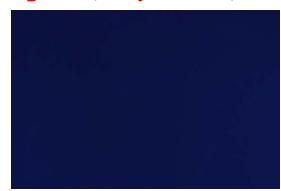
薬剤耐性ウイルス感染細胞の検出

BTP3-Neu5Ac

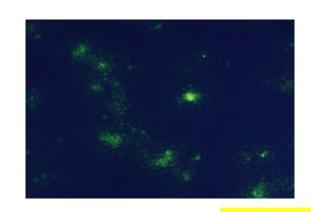
オセルタミビル 感受性ウイルス (IC₅₀ = 1.24 nM) 🗼 薬剤なし

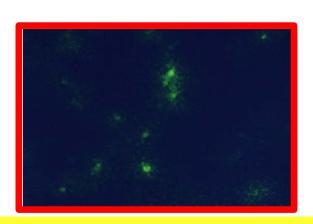


+ 100 nM オセルタミビル



オセルタミビル 耐性ウイルス (IC₅₀ = 205 nM)





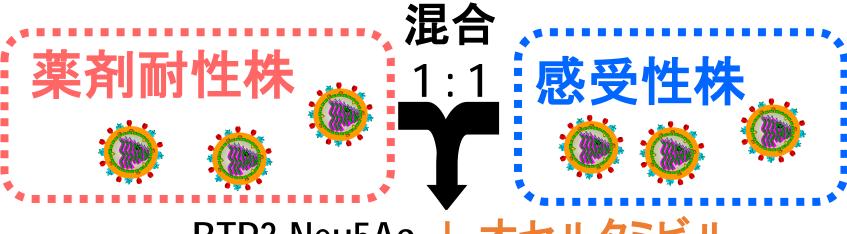
オセルタミビル耐性 検出

Kurebayashi, Takahashi, PLoS ONE 11, e0156400 (2016)

感染細胞レベルで薬剤耐性ウイルスを検出

新技術説明会 New Technology Presentation Meetings!

薬剤耐性インフルエンザウイルス株の単離



BTP3-Neu5Ac + オセルタミビル

薬剤耐性ウイルス フォーカスのみを 蛍光イメージング



Kurebayashi, Takahashi, *PLoS ONE* 11, e0156400 (2016)

耐性/感受性を遺伝子検出

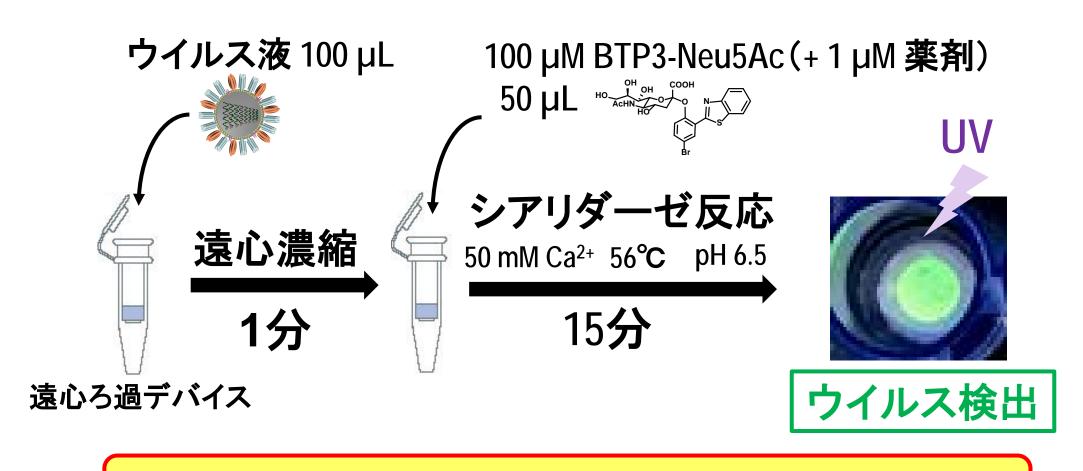
耐性

感受性

高確率で 耐性株検出



BTP3-Neu5Acを利用した高感度ウイルス検出法



検出感度は市販診断キットと比べて最高で8倍高かった。

Kato, Kurebayashi, Takahashi, PLoS ONE 13, e0200761 (2018)



薬剤耐性化の同時検出

OV:オセルタミビル(活性体)、PV:ペラミビル、ZV:ザナミビル、LV:ラニナミビル

ウイルス 薬剤

A/PR/8/1934 (H1N1)

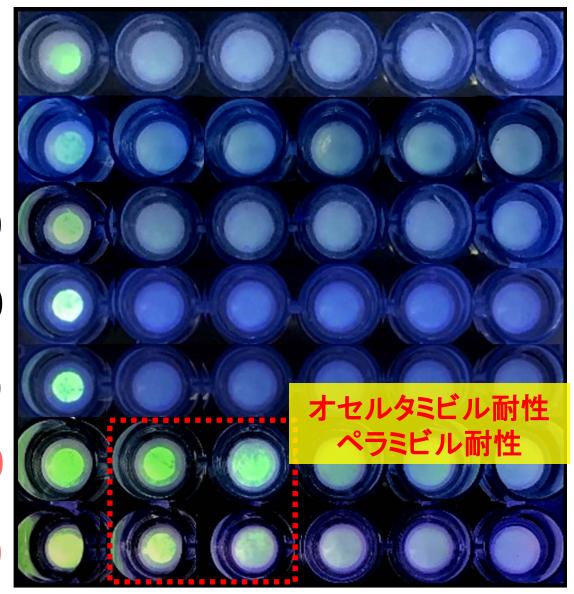
A/Memphis/1/1971 (H3N2)

B/Lee/1940

A/Shizuoka/17/2016 (H1N1)

A/Shizuoka/19/2016 (H1N1)

A/Shizuoka/30/2014 (H1N1) オセルタミビル耐性 A/Shizuoka/1573/2009 (H1N1)





本日のテーマ

シアリダーゼ蛍光イメージング剤 BTP3-Neu5Acの開発と応用

局所染色性を向上させた BTP9-Neu5Acの開発と応用

• 各ウイルス種の識別を可能とする イメージング剤の開発

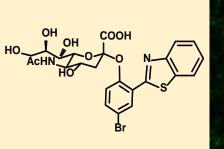


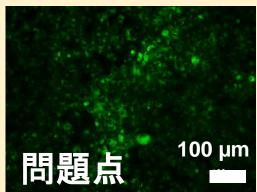
BTP9-Neu5Acの開発

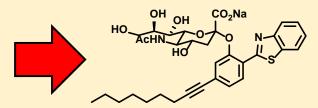
A型インフルエンザウイルス(IAV)の ノイラミニダーゼ(NA)発現細胞の蛍光イメージング

BTP3-Neu5Ac(従来の蛍光イメージング剤)

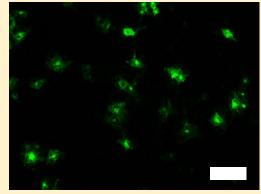
BTP9-Neu5Ac

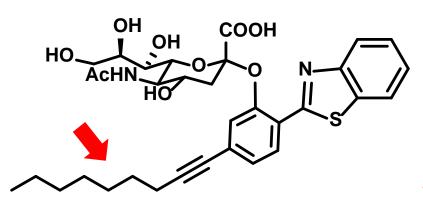






局所染色能の向上





Kurebayashi, Takahashi, ACS Chem. Biol. 14, 1195-1204 (2019)

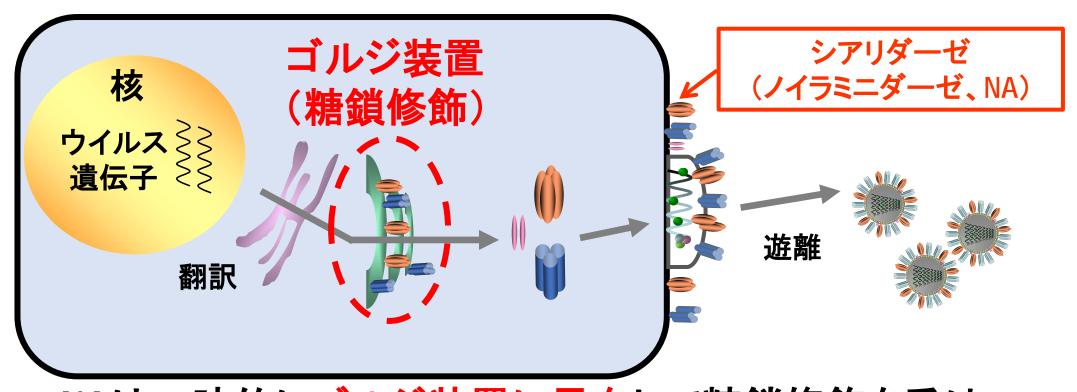
BTP9-Neu5Ac

特許第6493964号

☆疎水性蛍光物質BTPの疎水性を上げる → 局所染色能の向上



A型インフルエンザウイルス感染細胞の新生NAの発現



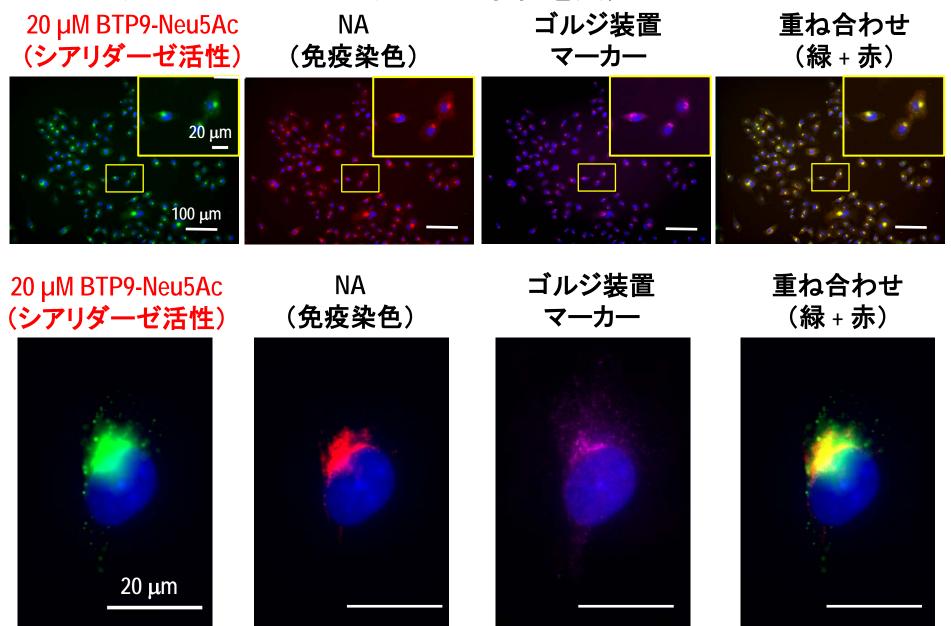
NAは一時的にゴルジ装置に局在して糖鎖修飾を受け、 細胞表面膜上へ移動する。



感染細胞内のゴルジ装置に局在したNAのシアリダーゼ活性を可視化できるか?



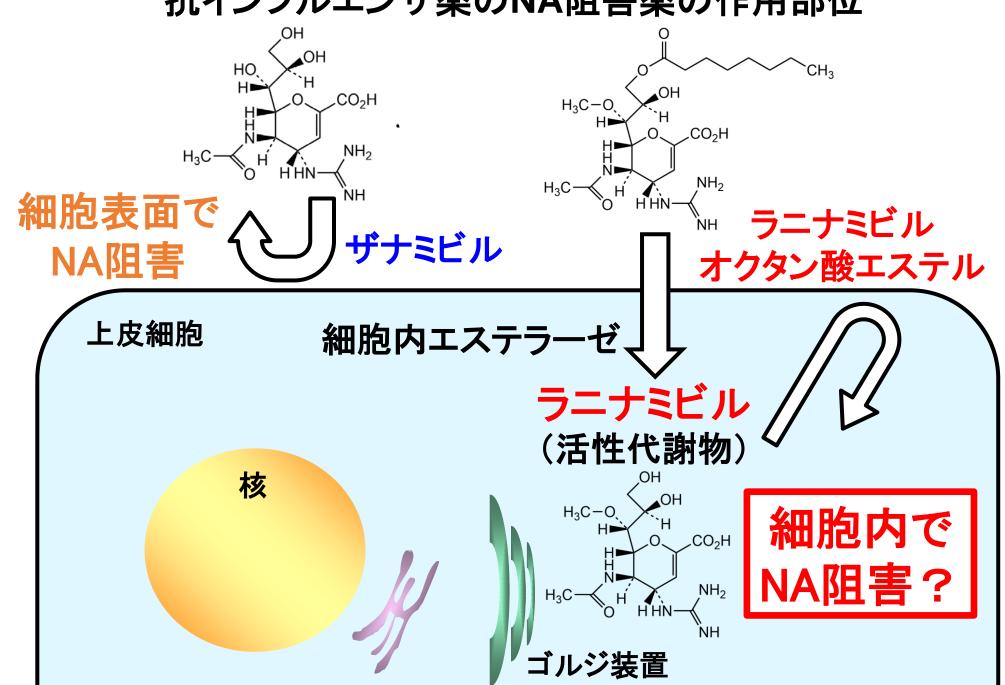
BTP9-Neu5AcはIAV感染細胞内のゴルジ装置に局在したウイルスNAのシアリダーゼ活性を蛍光イメージングできる



Amano, Kurebayashi, Takahashi, *J. Virol. Methods* 323, 114838 (2024)

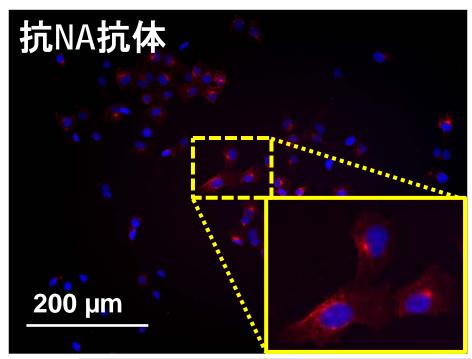


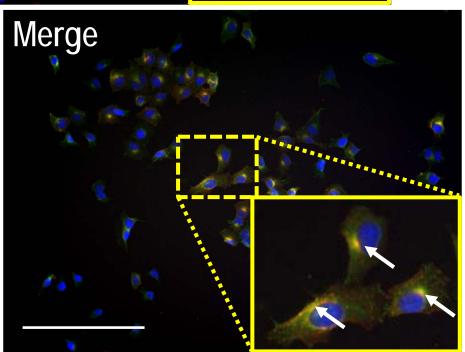
抗インフルエンザ薬のNA阻害薬の作用部位

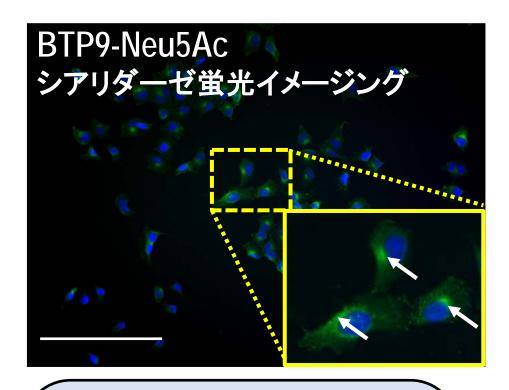




ザナミビルを添加した感染細胞

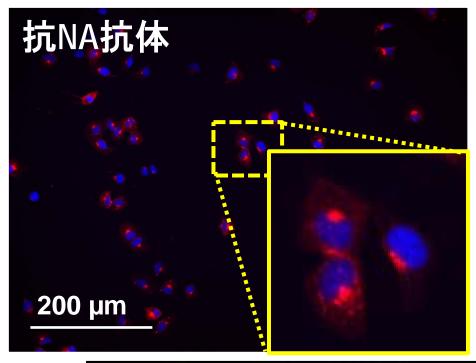


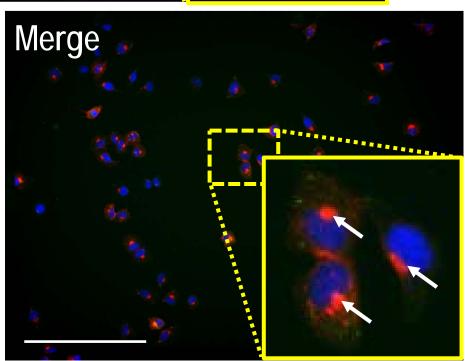


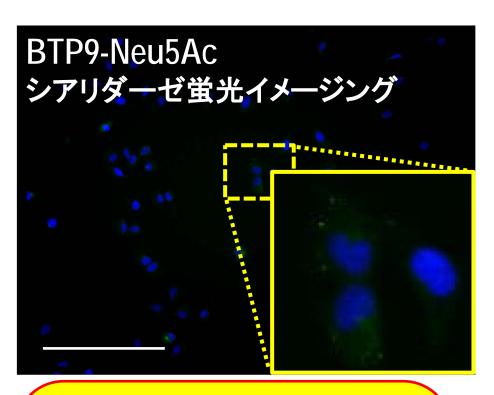


ザナミビルは 細胞内の シアリダーゼ活性を 阻害しなかった

新技術説明会 ラニナミビル オクタン酸エステルを添加した感染細胞



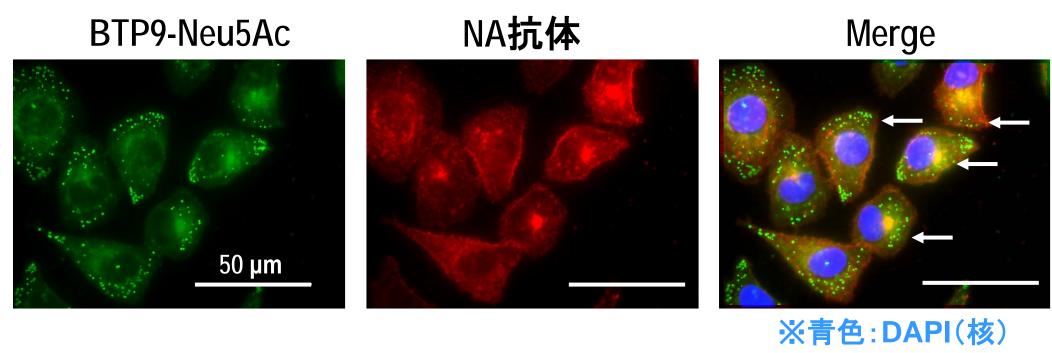




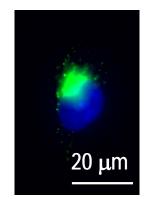
ラニナミビル オクタン酸エステルは 細胞内の シアリダーゼ活性を 阻害した



BTP9-Neu5Acの問題点



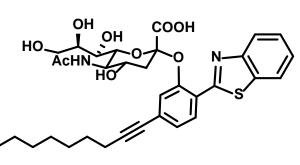
NAの局在と一致しない非特異的とみられる粒子状の 蛍光像が検出されやすい



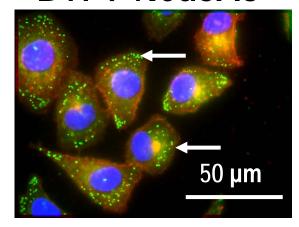


BTP9-Neu5Acのノイズ低減イメージング剤の開発

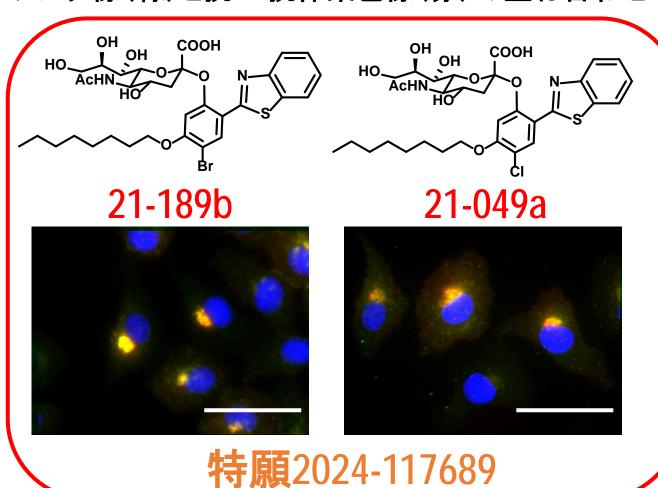
シアリダーゼの各イメージング像(緑)と抗NA抗体染色像(赤)の重ね合わせ



BTP9-Neu5Ac



※青色:DAPI(核)



(エーテル結合の炭素鎖とハロゲンの付加) BTP9-Neu5Acの粒状の非特異蛍光像を低減



本日のテーマ

シアリダーゼ蛍光イメージング剤 BTP3-Neu5Acの開発と応用

局所染色性を向上させた BTP9-Neu5Acの開発と応用

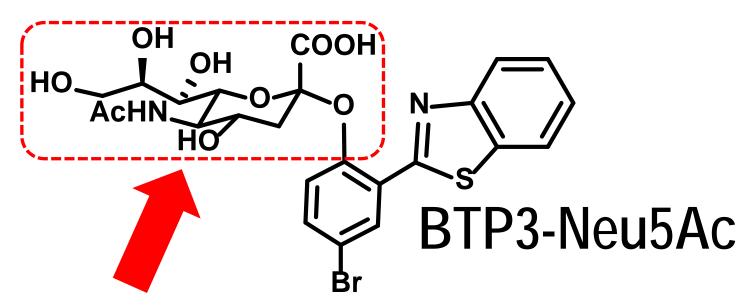
各ウイルス種の識別を可能とする イメージング剤の開発



目的

ウイルス種の同定に利用できるウイルス 特異的蛍光イメージング剤の開発

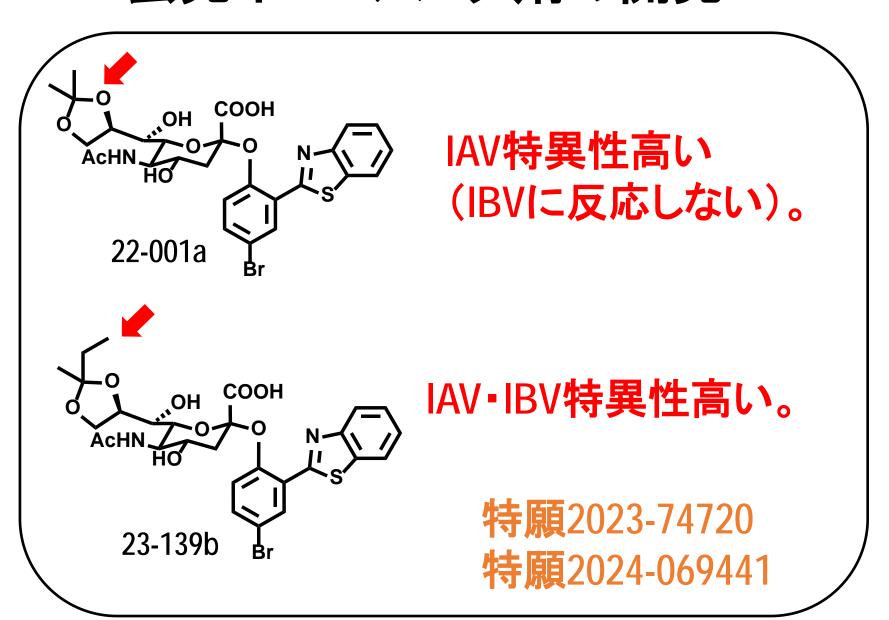
方法



シアリダーゼが認識するシアル酸構造を改良



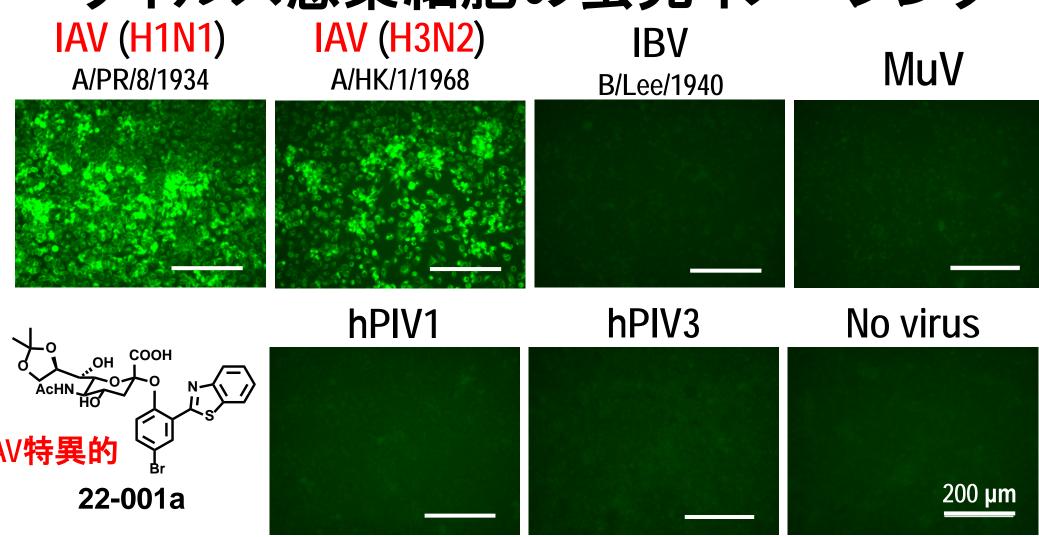
インフルエンザウイルス特異的 蛍光イメージング剤の開発





IAV特異的蛍光剤を使用した

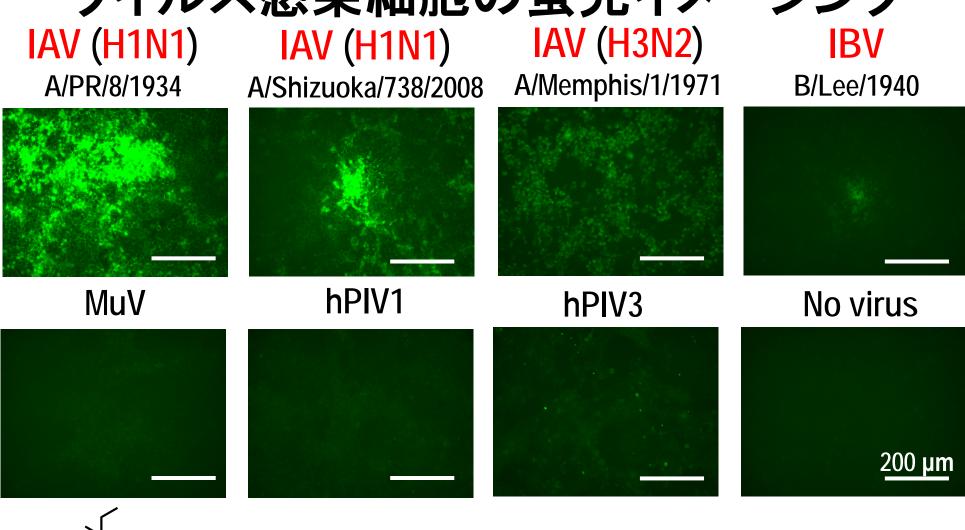
ウイルス感染細胞の蛍光イメージング



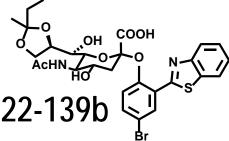
IAVのみに特異性が高い(IBVに反応しない)。

新技術説明会 New Technology Presentation Meetings!

IAV-IBV特異的蛍光剤を使用したウイルス感染細胞の蛍光イメージング



IAV•IBV 特異的



IAV · IBVに特異性が高い。



異なるウイルス種が混在したサンプル

からのIAV株単離

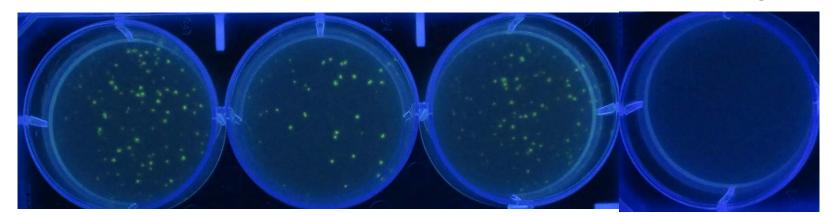
IAV + hPIV1

IAV

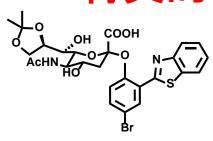
hPIV1

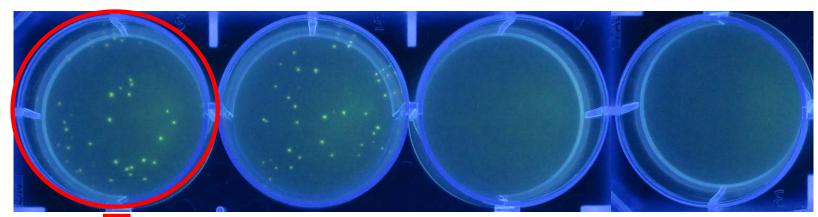
未感染

BTP3-Neu5Ac



IAV特異的



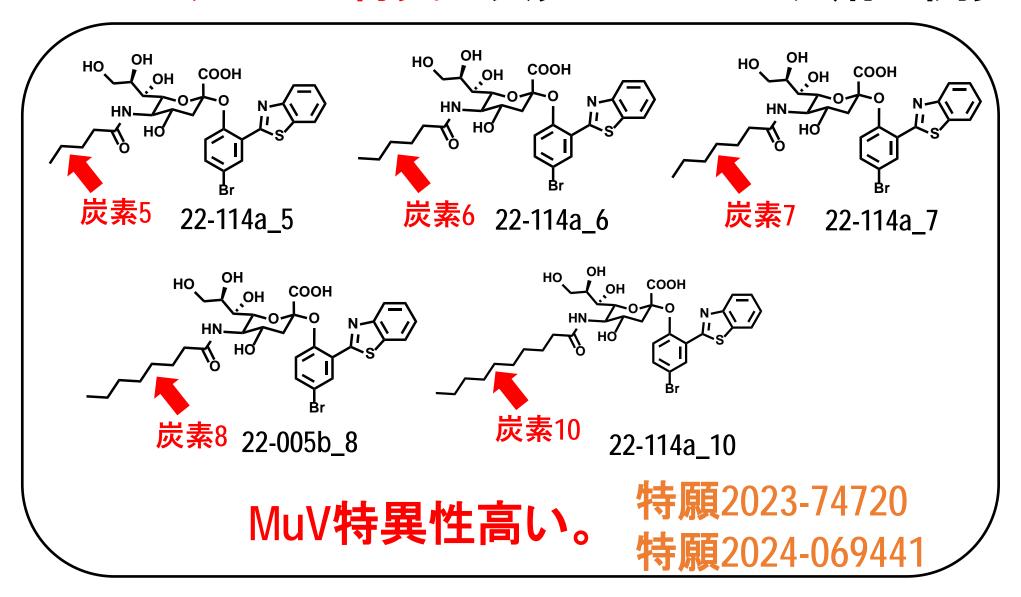


インフルエンザウイルスのみを 蛍光イメージング

異なるウイルス種が混在したサンプルから A型インフルエンザウイルス株のみを選択的に単離可能

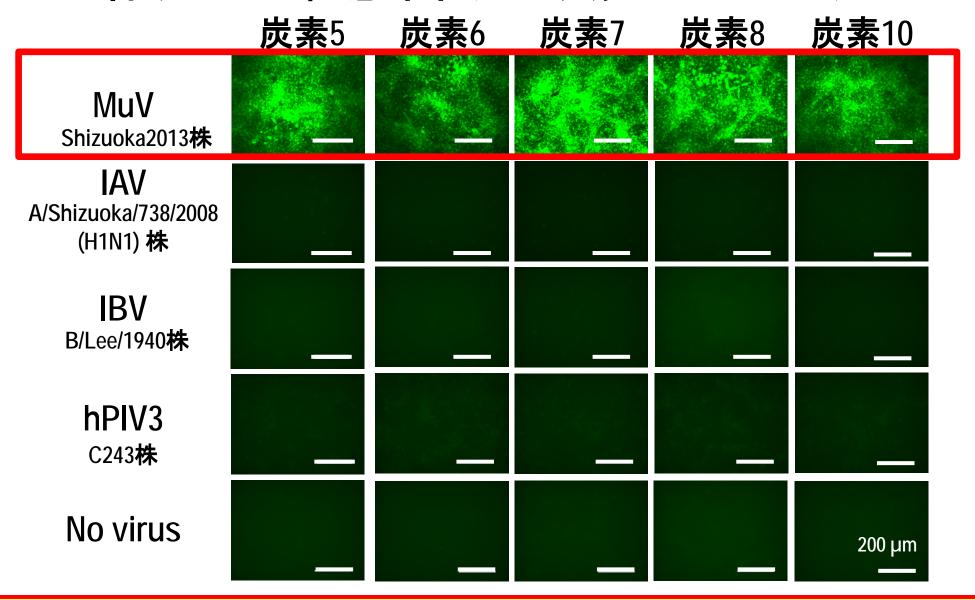


ムンプスウイルス特異的蛍光イメージング剤の開発





各ウイルス種感染細胞の蛍光イメージング



炭素5、6、7、8、10は MuV感染細胞を特異的に蛍光化した

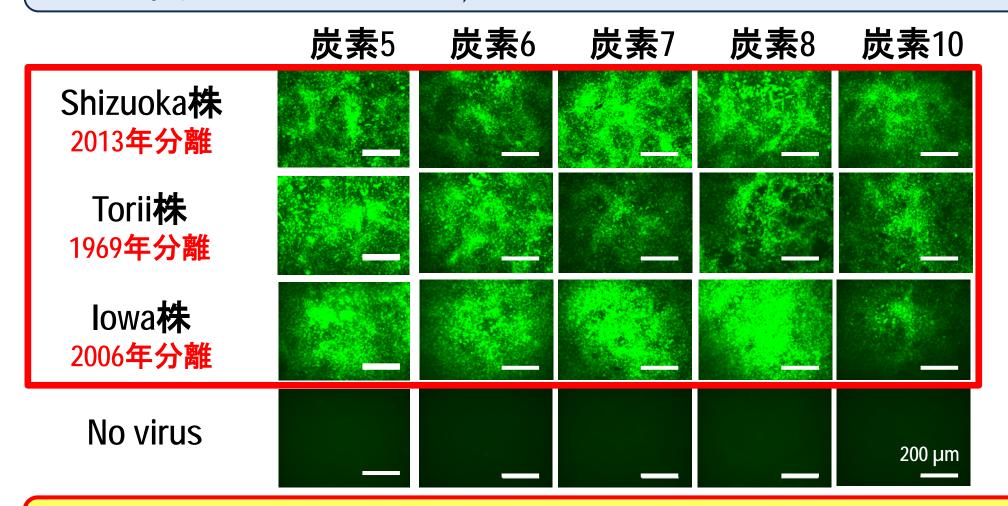


分離年代・場所が異なる MuV感染細胞の蛍光化

年代を経るごとにMuV遺伝子に 変異が生じる



分離年代・場所が異なる MuV感染細胞を酵素蛍光剤により同様に検出できるのか?



分離年代・場所が異なる3株の MuV感染細胞を蛍光化した



従来技術の問題点

既存の蛍光イメージング剤(製品化済)は、 ウイルス種を識別できなかった。

新技術の特徴・従来技術との比較

・感染細胞レベルでウイルス種の識別やウイルス株の単離が容易に行える。

想定される用途

インフルエンザウイルス、ムンプス(おたふくかぜ)ウイルスにおける各ウイルスや各感染細胞の同定と各ウイルス株の単離。



実用化に向けた課題

様々なインフルエンザウイルス株で検出可能か 調査する。

企業への期待

本蛍光剤の販売、本蛍光剤や本原理を利用したウイルス検出キットや診断キットなどの開発。

企業への貢献、PRポイント

• 本蛍光剤の提供、技術指導。



本技術に関する知的財産権

• 発明の名称 : 新規化合物及びシアリダーゼの検出用試薬

• 出願番号 : 特願2024-117689

(先行 特願2023-74720)

• 出願人 : 静岡県公立大学法人、学校法人常翔学園

• 発明者 : 高橋忠伸、紅林佑希、成道 豊、

竹内英之、大坪忠宗、池田 潔

産学連携の経歴

2016年 和光純薬工業からBTP3-Neu5Acを販売

• 2021年 東京化成工業からBTP3-Neu5Acを販売



お問い合わせ先

静岡県立大学 教育研究推進部 地域・産学連携推進室

T E L 054 – 264 – 5124 e-mail renkei@u-shizuoka-ken.ac.jp