

ウイルスの侵入および発芽過程を標的とした次世代抗インフルエンザ薬の開発

所属 静岡県立大学・薬学部
研究者 鈴木康夫

分担研究者

- (1) 名古屋大学大学院工学研究科 小林一清
- (2) 三菱生命科学研究所 蟹江 治

要旨

2年間の成果の要約を述べる。先ず、1) 基礎研究としてインフルエンザウイルスの宿主域を規定する新しい分子機構を初めて明らかにした。さらに、2) 本研究の目的であるインフルエンザウイルスの感染を阻害する物質、インフルエンザウイルスを超微量で検出する新規化合物を見出した。3) 本研究で明らかとなった、3-F-シアリルホスファチジルエタノールアミンはインフルエンザウイルスヘマグルチニンおよびノイラミニダーゼの両者を阻止し、インフルエンザウイルスの宿主への吸着および宿主からの発芽の両ステップをブロック出来た。このように感染の初期および終期の両方をダブルブロックできる物質は、これが最初の報告であり、ウイルスの侵入および発芽過程を標的とした次世代抗インフルエンザ薬の開発に向けて強力な物質を創製できた。本物質の大量合成も試み、最終産物の一手前（フッ素化）までこぎ着け、動物実験が出来る段階に来ている。4) Ru 錯体の α -グルコース末端にシアロオリゴ糖鎖が1個及び2個転移したルテニウム複合体 ((YDS)-Ru conjugate) を創製した。本研究で、この物質がインフルエンザウイルスと結合すると特異的に蛍光が減少することを発見した。本物質はインフルエンザウイルス特異的に検出する新しい分子センサーとして大いに期待できる。5) 特に今年度の成果として ヒトおよび動物由来の全てのインフルエンザA、B型ウイルス、全てのA亜型ウイルスに結合し、感染を阻害する全く新規なシアロスフィンゴ糖脂質（ガングリオシド）を発育鶏卵しょう尿膜中に発見し、部分構造を明らかにした。本物質は、インフルエンザウイルスの自然界における内因性のレセプターである可能性が極めて高く、この誘導体は、強力且つ画期的抗インフルエンザ薬として開発可能であることを見いだした。

1. 研究目的

研究代表者は、ヒトおよび動物（トリ、ブタ、ウマなど）インフルエンザウイルスが認識する受容体糖鎖の構造を明らかにしてきた。そして、インフルエンザウイルスが宿主細胞上の分子を認識する機構は、かなり多様である可能性を見出してきた。本研究では、1)

A型インフルエンザウイルスの動物種間の流行やウイルスの宿主域を決定している分子生物学的要因、2) インフルエンザウイルスの宿主域を簡便に検査できる技術の開発、3) インフルエンザウイルスの宿主域変異を克服できる抗インフルエンザ作用を持つ天然および化学合成新規物質の探索、4) ウイルスの侵入および発芽過程を標的とした次世代抗インフルエンザ薬の開発を目的としている。天然の活性を超える、安全な抗インフルエンザ薬の開発は、学術的、社会的、経済的に極めて意義深いものである。すなわち、本研究の目的は、インフルエンザウイルスの宿主細胞への吸着・侵入に関わるヘマグルチニンおよび宿主からの発芽・遊離に関わるノイラミニダーゼ(シアリダーゼ)の両者をブロックし、しかも、ウイルスの変異を克服した画期的な新規・次世代抗インフルエンザ薬を開発することである。

2. 研究方法

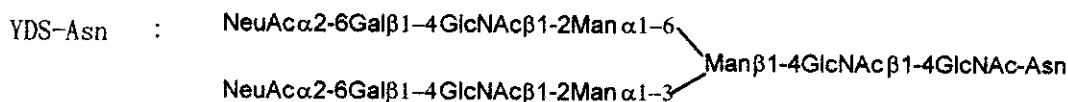
2. 1 インフルエンザウイルスの吸着および発芽をダブルブロックする新規シアロ化合物(シアリルホスファチジルエタノールアミン誘導体、SPE)の合成およびその大量合成：この合成に先立ち、インフルエンザウイルスの感染に重要な役割を果たしている2種の糖タンパク質(ヘマグルチニンおよびノイラミニダーゼ)の結晶構造を基に、それらのリガンドあるいは基質結合部位の構造から両者に対して阻害能を有するような低分子化合物を設計した。各々の結合部位を詳細に解析した結果、シアル酸残基のアキシャル配向しているカルボキシル基側から結合がおり、このカルボキシル基、アセタミド基、4, 8, 9-位水酸基が共通して結合に寄与していることが判明した。通常阻害剤デザインにおいては、これら官能基と相互作用するアミノ酸側鎖を探索し、それらをターゲットに結合をより強固にする(解離定数を下げる)ようにデザインするのが一般的である。しかし、ヘマグルチニンの結合部位には親和性を強化するのに有効なアミノ酸側鎖が存在していないことが判明し、全く異なるアプローチを模索することとなった。上述のようにシアル酸残基はそのカルボキシル基側からタンパクに認識されており、発想を変えると反対側に位置するシアル酸上の官能基は認識されていない。従って、これら認識されていない官能基、あるいは部位にシアリダーゼに対して耐性を持つよう化学的な修飾を行うことができる。すなわち、ノイラミニダーゼに対して加水分解されず、あるいは酵素阻害剤となり、かつ、ヘマグルチニンに結合する化合物をデザインすれば、両ウイルス膜糖タンパクの機能を阻害することでウイルス感染を阻害する全く新しい抗インフルエンザ薬とすることができる可能性をデザインした。具体的には、先行試験の結果に基づきシアル酸3位のアキシャル位に電子吸引性置換基としてフッ素原子とアジド基を導入した化合物を合成した。また、アグリコンとしては、分子としては低分子でありながら凝集により効果を発揮できるよう、グリセロ脂質としてジステアロイルブオスファチジルエタノールアミンを選択した。

SPEの合成には下記の方法論を新たに構築した。すなわち、原料として、メタノール中強酸性樹脂を用いて脱水しメチルエステルとした後、濾過、溶媒留去を行い、アセチルクロリドにてアセチルクロリド化した化合物へと導いた。この化合物の穏和な塩基処理により脱塩酸した。2重結合にプロモスクシンイミド-水を作用させて生成するプロ

モヒドリンを塩基で処理してエポキシド化合物へと導いた。本化合物の酸触媒存在下におけるアリルアルコールによるアルコリススを行なって鍵中間体(10g)を合成した。その後、3位水酸基にトリフルオロメチル基を導入し、これを脱離基として二分子求核反応によりフッ化糖へと導いた。また、フッ素以外にもグリコシド結合を安定化するようにアジド基を導入した化合物についても合成を行なった。さらに、アリル基のオゾノリススを行い得られたアルデヒド化合物のジアシルグリセリルフォスファチジルエタノールアミンとの還元アミノ化反応により最終産物を得た。大量合成も同様のステップによった。

2. 2 Ru 錯体の α -グルコース末端にシアロオリゴ糖鎖が 1 個及び 2 個転移した複合体 ((YDS)-Ru conjugate) の創製

糖鎖は生体内の様々な分子認識現象において重要な役割を果たしており、それらが密集した糖クラスター構造に注目が集まっている。本研究では、糖クラスターの骨格として、蛍光を有するトリスビピリジンルテニウム錯体 (Ru 錯体) に注目、インフルエンザウイルスと高い親和性を有するシアロオリゴ糖鎖 (YDS-Asn: Asn linked Yolk di-sialyloligosaccharide) を Ru 錯体に結合させて、蛍光によりインフルエンザウイルスを検出する新手法の開発を行うことを試みた。



すなわち、末端に $\cdot\cdot$ グルコースを有するビピリジンリガンドを合成し、Ru 原子と錯形成させ、Ru 錯体を骨格とする糖クラスター化合物を構築した。次に酵素 Endo M の糖転移活性を利用して、シアロオリゴ糖鎖 (YDS-Asn) を Ru 錯体に結合させた。これにより、Ru 錯体の α グルコース末端にシアロオリゴ糖鎖が 1 個及び 2 個転移した複合体 ((YDS)-Ru conjugate) が得られた。

2. 3 全てのヒトおよび動物由来の A, B 型インフルエンザウイルスへ結合でき、且つ感染を阻害する新規シアロスフィンゴ糖脂質 (ガングリオシド) の発見: ほとんど全ての型 (A, B 型, A 亜型) のインフルエンザウイルスが感染増殖できる発育鶏卵しょう尿膜を分離し、クロロフォルム/メタノール混液で総脂質を抽出した。アルカリ処理により、スフィンゴ糖脂質画分を得、陰イオン交換樹脂、イアトロビーズクロマトにより、ガングリオシドを分画した。各画分につき、ヒト、トリ、ブタから分離されたインフルエンザウイルスに対する結合性、阻害活性を調べた。インフルエンザウイルスの感染阻害は、感染した細胞から遊離される乳酸脱水素酵素の測定、一次抗体・二次抗体を用いて二次抗体を染色することにより感染した細胞数を数えるという手法、赤血球凝集阻止反応、インフルエンザウイルスにより惹起される膜融合の阻害反応などによった。

3. 研究成果

3. 1 インフルエンザウイルスのヘマグルチニンおよびノイラミニダーゼ（シアリダーゼ）の宿主域変異機構の解明：カモから分離されるインフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ（N1, N2, N3, N5, N8, N9）活性は、pH4.5以下でも安定で、活性を維持しているが、ヒトの間で流行していたA型ウイルスのノイラミニダーゼ（N1, N2）活性は、同条件で完全に失活することを発見した。さらに、1968年にヒトから分離されたH3N2パндеミック株（A/ホンコン亜型、ホンコン風邪）のノイラミニダーゼは、その前年まで流行していたH2N2亜型（アジア風邪）のノイラミニダーゼとは全く異なり、カモ性質を有していることを見いだした。この発見は、インフルエンザウイルスの宿主域を決定する分枝機構を探る上で極めて重要な知見である。

さらに、受容体シアル酸含有糖鎖の発現を抑制した細胞から分離されるインフルエンザウイルスは、ノイラミニダーゼ活性を欠いていることを見出した。このウイルスの性質を調べた結果、ノイラミニダーゼ遺伝子の活性中心部位が欠如していた。ノイラミニダーゼ活性を欠くウイルスは、宿主細胞から発芽出来ず、感染細胞で凝集を起こすことが知られている。今回分離されたノイラミニダーゼ活性を持たないウイルスは、上記宿主細胞から遊離出来ることから、ウイルスヘマグルチニン（HA）の受容体への結合親和性が低いウイルスは、ノイラミニダーゼ活性を欠いても宿主細胞から遊離可能であることが示唆された。この結果は、ウイルスの宿主細胞からの発芽機構を解明する上で重要な知見である。

3. 2 インフルエンザウイルスの宿主細胞への吸着および宿主細胞からの遊離を二重阻止する新規抗インフルエンザ剤（フッ素化シアリルホスファチジルエタノールアミン）の開発：本成果は、本研究遂行上最も期待されるものである。すなわち、シアル酸の3位炭素にF（フッ素）導入したシアル酸含有ホスファチジルエタノールアミン（3-F-シアリルホスファチジルエタノールアミン）（図1）は、インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼに抵抗性となり、且つ、ウイルスのヘマグルチニンおよびノイラミニダーゼへ結合性を示し、ウイルスの感染初期および後期のいずれをも強力に阻止できることを見出した（Table 1, 2）。インフルエンザウイルスヘマグルチニンが認識する受容体シアル酸残基はそのカルボキシル基側からヘマグルチニンタンパクに認識されており、反対側に位置するシアル酸上の官能基は認識されていない。従って、これら認識されていない官能基、あるいは部位にシアリダーゼに対して耐性を持つよう化学的な修飾を行うことができる。すなわち、シアリダーゼに対して加水分解されず、あるいは酵素阻害剤となり、かつ、ヘマグルチニンに結合する化合物をデザインすれば、両ウイルス膜糖タンパクの機能を阻害することでウイルス感染を阻害する全く新しい抗インフルエンザ薬とすることができる可能性がある。本研究では、上記のコンセプトに基づきシアル酸3位のアキシャル位にフッ素原子を導入した化合物を合成した。また、アグリコンは、分子としては低分子でありながら凝集により効果を発揮できるよう、グリセロ脂質としてジステアロイルホスファチジルエタノールアミンを選択した。本物質は画期的な新しい抗インフルエンザ薬として有効であることが期待された。そこで、大量合成を試み、動物実験への足がかりを得た。現在、最終産物の1段階手前のところまで進捗した。最終ステップであるフッ素化の効率的方法を模索していたが、極最近、解決のめどが立ち、動物実験へ進める可能性を得た。

一方、糖結合ルテニウム錯体は、原料である Λ Ru 錯体と同様の UV、CD および蛍光スペクトルを示した。蛍光が感度よく検出できることが確認できた。糖結合ルテニウム錯体は、YDS-Asn と比較して、SSA (NeuAca2-6Gal 特異的レクチン) との結合力において約 10 倍の高い活性を示した。インフルエンザウイルス (A/Memphis/1/71(H3N2)) に対しては、染色された細胞の数を顕微鏡で数え、サンプル濃度と細胞数 (%) をプロットし、IC₅₀ を求めた。YDS-Asn と (YDS)-Ru を比べると、YDS が錯体に結合しただけでウイルスの結合阻害活性が約 100 倍も増大した。また、YDS が 1 個結合したときと 2 個結合したときでは、2 個結合したときの方がインフルエンザウイルス感染阻害活性が約 2 倍増加していた。この手法は、インフルエンザウイルスを検出する分子センサーとして大いに期待できるものである。

3. 3 インフルエンザウイルス感染を阻止するユニークな分枝脂肪酸含有の新規ホスファチジルイノシトールの発見

インフルエンザウイルスの HA の細胞融合活性を阻害する新しいリン脂質を水棲バクテリア (*Rhodococcus equi*) から見出した。これは、ヒトのみならず、トリ、ブタから分離される調べた全ての A 亜型ウイルスの感染を広域に阻止した。今後、広域性のある新しい抗インフルエンザ薬の開発に有効な候補であると思われる。

3. 4 インフルエンザウイルスの感染を阻止する受容体シアロ糖鎖含有環状ペプチド

インフルエンザウイルスの HA は 3 量体であり、それぞれのサブユニットにはレセプター結合ポケットが存在する。我々は、環状のペプチドに受容体シアロ糖鎖構造 (Neu5Ac2-3Gal1-4Glc-) を 1-3 本結合させた構造物をデザインし、化学合成した。このうち、HA 3 量体の個々のポケットに結合でき、且つウイルスの感染を阻止する新規物質をデザインした。

3. 5 インフルエンザウイルスを特異的に検出するセンサーの開発

Endo M の糖転移反応により、Ru 錯体の α グルコース末端にシアロオリゴ糖鎖が 1 個及び 2 個転移した複合体 ((YDS)-Ru conjugate) を得た。YDS-Asn の生物活性と比較すると、この conjugate は、SSA (NeuAca2-6Gal 特異的レクチン) においては約 10 倍、インフルエンザウイルス (A/Memphis/1/71(H3N2)) においては約 100 倍も高い阻害活性を有していた。Ru 錯体に結合しただけで飛躍的にウイルスとの親和性が増大したのは、錯体の電荷による静電的相互作用及びアグリコン部位の疎水性相互作用などが原因と考えている。また、この conjugate の溶液にウイルスを添加すると、蛍光の減少が観察されたことは注目すべき成果である。この性質は、インフルエンザウイルスを特異的に検出するセンサーとして応用可能であることを示している (図 2)。

3. 6 全てのヒトおよび動物由来のインフルエンザ A (亜型も含む)、B 型ウイルスに結合し、感染を阻害する全く新規なシアロスフィンゴ糖脂質 (ガングリオシド) を発育鶏卵しょう尿膜中に発見：今年度の大きな成果として、ヒトおよびその他動物由来の全てのインフルエンザ A、B 型ウイルス、全ての A 亜型ウイルスに結合し、感染を阻害する全く新規なシアロスフィンゴ糖脂質 (ガングリオシド) を発育鶏卵しょう尿膜中に発見した。この物質の単離に成功し、質量分析により、部分構造を明らかにした。本物質は、枝分かれしたシアロ糖鎖を持ち、ヒトインフルエンザウイルスと特異的に結合する Neu5Ac

α 2-6Gal、ブタ、ウマ、カモなどの動物のインフルエンザウイルスと特異的に結合する Neu5Ac α 2-3Gal 構造を併せ持っていた。本物質は、インフルエンザウイルスの自然界における内因性のレセプターである可能性が極めて高く、この誘導体は、強力且つ画期的抗インフルエンザ薬として開発可能であることを見いだした。

4. 考察・まとめ

現在、ウイルスノイラミニダーゼ活性を阻害する抗インフルエンザ剤（ザナミビル、オセルタミビル）が知られているが、いずれもインフルエンザウイルスのノイラミニダーゼを阻害するものであり、ウイルスの発芽過程をブロックするものである。これらは、従って、ウイルスの感染後期を抑制するものであり、感染の予防効果はなく、感染の入り口を阻害することが出来ない。また、現在日本でも許可された抗インフルエンザ薬であるアマンタジンもA型のみにも効果があり、B型には効果はない。また、アマンタジンはA型ウイルスのプロトンチャンネルを阻害するもので、ウイルスの吸着段階を阻害できない。今回、開発された 3-F-シアリルホスファチジルエタノールアミンはウイルスの宿主への吸着およびウイルスの宿主細胞膜上からの発芽の両方をブロック出来るものであり、且つ広域にAおよびB型インフルエンザウイルスを阻害するものであり画期的新物質であると言える。さらに、本物質は、生体に既に存在するホスファチジルエタノールアミンの誘導体であり、安全な次世代の新規抗インフルエンザ薬として開発可能であると期待される。本物質の大量合成のめども立ち、動物実験が可能なステップへと進展した。水棲バクテリアから発見された分枝脂肪酸含有の新規ホスファチジルイノシトールやシアリルラクトースを環状ペプチド上に配置した新規物質も極めて重要な新規抗インフルエンザ薬の候補となり得る。

本研究で合成に成功したシアロオリゴ糖鎖(YDS-Asn)は、アスパラギン結合シアロ複合型 2 本鎖糖鎖であり、非還元末端側にシアリルラクトース部位を 2 つ有している。シアリルラクトースはインフルエンザ A 型ウイルスに親和性があることが我々の研究により明らかであるので、予測通り YDS-Asn も強い親和性を持つことを確認した。一方、金属錯体は金属種や配位種によって千変万化の化合物を与える創造体とみることができる。金属錯体は調製が容易であり、金属種と配位種の組み合わせに応じて様々な酸化還元電位や吸収スペクトルを示し、蛍光性を有している。よって、本物質はインフルエンザウイルスを検出する分子センサーとしても大いに期待できるものである。

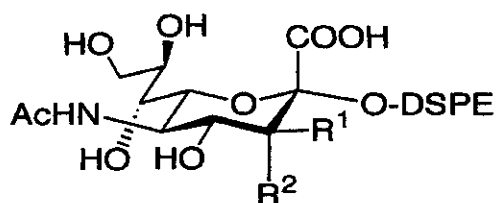
さらに、本年度の研究で見いだされた、全てのヒトおよび動物由来のインフルエンザ A (亜型も含む)、B 型ウイルスに結合し、感染を阻害する全く新規なシアロスフィンゴ糖脂質 (ガングリオシド) の発見は、本研究を継続する上で大きな力を与えるものである。本物質は、今まで知られていなかった天然に存在する全てのインフルエンザウイルスレセプターである可能性が高く、この物資の誘導体は、インフルエンザウイルスの変異を克服した極めて広域な抗インフルエンザ薬として開発可能であることを期待させるものである。

5. 研究発表

1. Chao-Tan Guo, Xue-Long Sun, Osamu Kanie, Kennedy Francis Shortridge, Takashi Suzuki, Daisei Miyamoto, Kazuya I.-P. Jwa Hidari, Chi-Huey Wong, and Yasuo Suzuki: An O-glycoside of sialic acid derivative that inhibits both hemagglutinin and sialidase activities of influenza viruses. *Glycobiol.*, 12, 183-190, (2002)

2. Rika Komagome, Hirofumi Sawa, Takashi Suzuki, Yasuo Suzuki, Shinya Tanaka, Walter J. Atwood, Kazuo Nagashima: Oligosaccharides as receptor for JC virus. *J. Virol.*, 76, 12992-13000 (2002)
3. Mitsuhiro Matsuda, Kenichi Shikata, Fujio Shimizu, Yasuo Suzuki, Masayuki Miyasaka, Hiroshi Kawachi, Hiroto Kawashima, Jun Wada, Hikaru Sugimoto, Yasushi Shikata, Daisuke Ogawa, Shinichiro J. Tojo, Kazuo Akima, Hirofumi Makino: Therapeutic effect of sulphated hyaluronic acid, a potential selectin-blocking agent, on experimental progressive mesangial proliferative glomerulonephritis. *J. Pathol.*, 198, 407-414 (2002)
4. S. Kojima, T. Hasegawa, T. Yonemura, K. Sasaki, K. Yamamoto, Y. Makimura, T. Takahashi, T. Suzuki, Y. Suzuki, and K. Kobayashi, Ruthenium complexes carrying a disialo complex-type oligosaccharide: enzymatic synthesis and its application to a luminescent probe to detect influenza viruses, *Chem. Commun.*, in press.
5. H. Dohi, Y. Nishida, Y. Furuta, H. Uzawa, S. Yokoyama, H. Mori, and K. Kobayashi, Molecular Design and Biologic Potential of Galacto-type Trehalose as a Nonnatural Ligand of Shiga Toxins. *Org. Lett.*, 4, 355-357 (2002).
6. K. Matsuura, K. Hayashi, and K. Kobayashi, Artificial Regulation of Transcription Applying Carbohydrate-Lectin Interaction. *Chem. Commun.*, 2002, 1140-1141.
7. H. Uzawa, S. Kamiya, N. Minoura, H. Dohi, Y. Nishida, K. Taguchi, S. Yokoyama, H. Mori, T. Shimizu and K. Kobayashi, A Quartz Crystal Microbalance Method for Rapid Detection and Differentiation of Shiga Toxins by Applying a Monoalkyl Globobioside as the Toxin Ligand. *Biomacromolecules*, 3, 411-414 (2002).
8. H. Dohi, Y. Nishida, T. Takeda, K. Kobayashi, Convenient Use of Non-malodorous Thioglycosyl Donors for the Assembly of Multivalent Globo- and *iso*Globosyl Trisaccharides. *Carbohydr. Res.*, 337, 983-989 (2002).
9. H. Tanaka, Y. Nishida, Y. Furuta, and K. Kobayashi, A Convenient Synthetic Pathway for Multivalent Assembly of Aminoglycoside Antibiotics Starting from Amikacin. *Bioorg. Medicinal Chem. Lett.*, 12, 1723-1726 (2002).
10. Y. Miura, Y. Sasao, H. Dohi, Y. Nishida, K. Kobayashi, Self-Assembled Monolayers of Gb₃: Surface Specific Affinity with Shiga Toxin. *Anal. Biochem.*, 310, 27-35 (2002).
11. K. Sasaki, Y. Nishida, T. Tsurumi, H. Uzawa, H. Kondo, K. Kobayashi, Facile Assembly of Cell Surface Oligosaccharide Mimics via Copolymerization of Carbohydrate Modules. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 41, 4463-4467 (2002).
12. Kanemitsu, T. ; Wong, C. -H. ; Kanie, O. *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124, 3591-3599.

13. Guo, C.-T.; Sun, X.-L.; Kanie, O.; Shortridge, K. F.; Suzuki, T.; Miyamoto, D.; Hidari, K. I.-P. J.; Wong, C.-H.; Suzuki, Y. *Glycobiology* **2002**, *12*, 183-190.
14. Kanie, Y.; Kanie, O. *Carbohydr. Res.*, **2002**, *337*, 1757-1762.
15. Kanie, Y.; Kanie, O. *Electrophoresis*, **2003**, *24*, 1111-1118



Compound	R ¹	R ²
Neu5Ac-DSPE (1)	H	H
Neu5Ac3βOH-DSPE (2)	OH	H
Neu5Ac3αOH-DSPE (3)	H	OH
Neu5Ac3αF-DSPE (4)	H	F

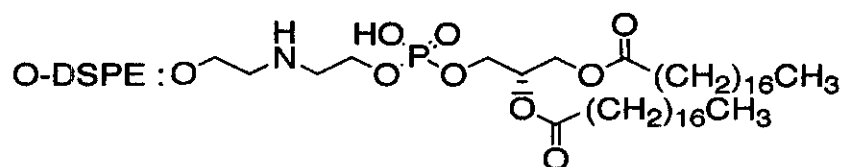


図1 シアル酸の3位炭素にF(フッ素)導入したシアル酸含有ホスファチジルエタノールアミン(4) (3-F-シアリルホスファチジルエタノールアミン)の構造

Table 1. Binding activities and inhibitory activities of C-3 modified sialyl PE derivatives (1-4, Fig. 1) on the viral hemagglutination and the low pH-induced hemolysis by human influenza virus A/Aichi/2/68 (H3N2)

compound	substituent at C-3	binding assay (%) *	HAI (μM)**	HLI (IC ₅₀ , μM)***
1	none (H)	100	62.5±0	166.7±18.3

2	OH (eq)	144	41.7±12.3	148.3±24.7
3	OH (ax)	128	52.1±6.8	166.7±18.3
4	F (ax)	132	31.3±0	125.0±0

*Binding activities of Neu5Ac-DSPE derivatives (1-4) to influenza virus A/Aichi/2/68 (H3N2) using TLC binding assay (Sun *et al.*, 2000).

**The concentration of the derivatives showing a complete inhibition of the hemagglutination (HAI) was defined as the hemagglutination inhibition activity (Sun *et al.*, 2000).

***The inhibition of viral hemolysis (HLI) was expressed as IC₅₀ (the concentration at which hemolysis was inhibited by 50%). The data were expressed as mean SD of three independent experiments. Each experiment was carried out in duplicate.

Table 2. Inhibitory activities of Neu3αF-DSPE (4) against the sialidases from various influenza A viruses

Influenza viruses*	Inhibitory activity (IC ₅₀ , μM)	
	4-MU-Neu5Ac as substrate	Neu5Ac-DSPE (1) as substrate
Human isolates		
A/PR/8/34 (H1N1)	62.5	62.5
A/Singapore/1/57 (H2N2)	31.3	62.5
A/Aichi/2/68 (H3N2)	31.3	31.3
Avian isolates		
A/duck/HK/36/76 (H1N1)	125	62.5
A/duck/HK/849/80 (H4N1)	125	125
A/duck/HK/13/76 (H6N1)	150	180
A/duck/HK/33/76 (H10N1)	500	250
A/duck/HK/273/78 (H2N2)	150	125
A/duck/HK/24/76 (H3N2)	180	100

A/duck/HK/47/76 (H7N2)	200	150
A/duck/HK/86/76 (H9N2)	180	125
A/duck/HK/313/78 (H5N3)	62.5	62.5
A/duck/HK/44/76 (H11N3)	250	175
A/duck/HK/862/80 (H12N5)	125	100
Swine isolates		
A/swine/Hokkaido/2/81 (H1N1)	62.5	125
A/swine/Italy/309/83 (H3N2)	125	150

*The viral strains were listed according to the type of sialidase (N).

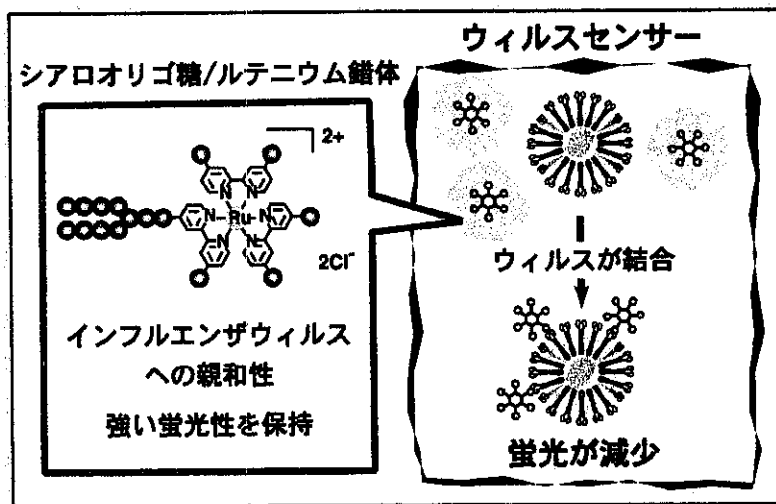


Figure 1. Schematic illustration of sensory system

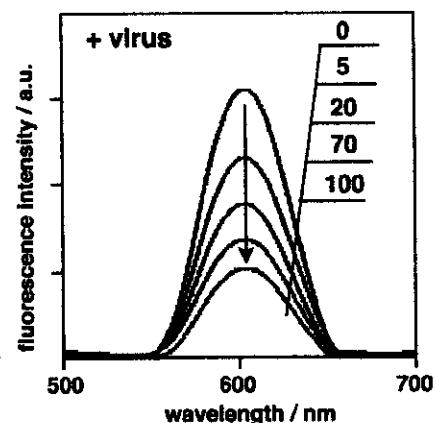


Figure 2. Fluorescence spectra of $(YDS)_1-\Delta Ru$ conjugate adding influenza virus

図2 インフルエンザウィルスの特異的に認識するセンサー物質の創製