

学術セッション I

生命科学研究を基盤としたモノづくり

Academic Session I

Manufacturing based on life science research

座 長

Chairperson

鈴木 哲朗 (浜松医科大学 教授)

Tetsuro Suzuki (Professor, Hamamatsu University School of Medicine)

糠谷 明 (静岡大学農学部 名誉教授・

株式会社静岡アグリビジネス研究所 代表取締役)

Akira Nukaya (Emeritus Professor, Faculty of Agriculture, Shizuoka University/

CEO, Shizuoka Agri-business Laboratory Co., Ltd.)

シアリダーゼ活性を利用した ウイルス感染細胞の蛍光イメージング

高橋忠伸 / 静岡県立大学薬学部 准教授

「シアリダーゼ」は糖鎖の末端からシアル酸 (*N*-アセチルノイラミン酸、Neu5Ac) を切断する酵素である。シアリダーゼの基質には、シアリダーゼ活性を検出するための試薬として市販されているものがある。4-メチルウンベリフェリル-Neu5Acは、高感度にシアリダーゼを検出する基質で最もよく用いられている。シアリダーゼは、4-メチルウンベリフェリル-Neu5AcのNeu5Acを切断し、水溶性の蛍光物質4-メチルウンベリフェロンを生成する。この基質は水溶性の蛍光物質に変換されるため、シアリダーゼ活性の存在部位を組織化学的に染色することはできない。5-プロモ-4-クロロインドール-3-イル-Neu5Ac (X-Neu5Ac) は蛍光化増感剤Fast Red Violet LB と共に反応させると、水に不溶性の蛍光物質を生成し、シアリダーゼ活性の存在部位を組織化学的、蛍光的に可視化できる。ただし、この基質の検出感度は十分とは言えず、非特異的な染色も起こりやすい。シアリダーゼ活性を組織化学的に蛍光染色するために、細胞や組織の局所に沈着する水に不溶性の蛍光物質が必要である。我々は、ベンゾチアゾリルフェノール誘導体でBTP3 (極大励起波長/蛍光波長 = 372/526nm) と呼んでいる水に不溶性の蛍光物質を持つ高感度シアリダーゼ検出基質「BTP3-Neu5Ac」を、シアリダーゼ活性の存在部位を組織化学的に蛍光可視化する新しいツールとして開発した。BTP3にNeu5Acを結合させたBTP3-Neu5Ac自体はシアリダーゼの基質となる、水溶性の非蛍光物質である。シアリダーゼ反応によるNeu5Acの切断後、BTP3はシアリダーゼ活性の存在部位に局所的に沈着し、シアリダーゼ活性を蛍光イメージングする。

インフルエンザA型、B型ウイルスと一部のパラミクソウイルス (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、センダイウイルス、ニューキャッスル病ウイルス) はシアリダーゼ活性を示す。これらのウイルスの感染細胞では、細胞表面上にウイルスのシアリダーゼが大量に発現する。BTP3-Neu5Ac は、PVDF膜上にドットプロットされたウイルスや、ウイルス感染細胞を、ウイルスの高いシアリダーゼ活性を

介してBTP3-Neu5Acを添加するのみの簡単な操作で短時間に蛍光化することができる。BTP3-Neu5Acは、抗原性が変化するウイルスに対する特異的抗体を必要とせず、感染細胞を蛍光化する。インフルエンザA型ウイルスには、さまざまな亜型 (表面抗原性) がある。BTP3-Neu5Acは、インフルエンザA型ウイルスの亜型や宿主の違いを気にせずに、ヒトH1N1型、ヒトH3N2型、2009年パンデミックH1N1型、トリH5N3型インフルエンザA型ウイルスの感染細胞、あるいは1918年パンデミックH1N1型、高病原性トリH5N1型、2013年にヒトから分離されたトリH7N9型インフルエンザA型ウイルスのシアリダーゼを遺伝子的に発現させた細胞を蛍光化できる。BTP3-Neu5Acにより、細胞や組織を固定化せずに、感染細胞を生きたままの状態に蛍光化 (ライブセルイメージング) することで、すぐにウイルス培養やウイルス単離を行うことができる。BTP3-Neu5Acは、シアリダーゼを持つウイルスの感染部位の可視化、ウイルス培養の確認、ウイルス株の感染価測定や単離を効率化するツールとして、学術研究や衛生検査に貢献するものと期待される。

インフルエンザウイルスに特異的なシアリダーゼ阻害剤は、臨床のインフルエンザ治療における抗インフルエンザ薬として利用されている。BTP3-Neu5Acによる薬剤感受性ウイルス感染細胞の蛍光化は、インフルエンザ特異的シアリダーゼ阻害剤で阻害される。一方、薬剤耐性ウイルスのシアリダーゼ活性は、シアリダーゼ阻害剤存在下でさえ維持される。蛍光イメージングでシアリダーゼ阻害剤を併用すると、薬剤耐性ウイルス感染細胞を選択的に蛍光可視化することができる。シアリダーゼ阻害剤存在下でのライブセルイメージングによって、薬剤耐性ウイルスの高効率な単離も可能である。薬剤耐性ウイルスの選択的ライブセルイメージングは、耐性化機構の研究、衛生検査における耐性ウイルスのモニタリング、さまざまな耐性化変異にも効果を示す新規シアリダーゼ阻害剤の開発に極めて有用な方法である。



高橋 忠伸

略 歴	2004	静岡県立大学大学院 薬学研究科 博士後期課程 薬学専攻 修了
	2004	博士 (薬学) (静岡県立大学) 授与
	2004	(独) 科学技術振興機構 戦略的創造事業 (CREST) 博士研究員
	2006	静岡県立大学薬学部 大学院薬学研究科 助手
	2007	静岡県立大学薬学部 大学院薬学研究科 助教
	2010	米国ウィスコンシン大学獣医学部 インフルエンザ研究所 訪問研究者 (1年間)
	2013	静岡県立大学薬学部 大学院薬学研究院 講師
	2015	静岡県立大学薬学部 大学院薬学研究院 准教授
受 賞 歴		静岡県立大学薬学部薬学科 (第一回) 岩崎賞 (1999)、日米合同糖質科学会議 (ハワイ) 日本糖質学会 (第8回) ポスター賞 (2005)、糖鎖科学名古屋拠点 若手研究者奨励賞 (2010)、日本薬学会東海支部 学術奨励賞 (2013)、日本糖質学会 奨励賞 (2014)、(公財) 長寿科学振興財団 長寿科学賞 (2014)、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 (2015)、静岡県立大学 (第一回) 学長表彰 (2015)、日本ウイルス学会 杉浦奨励賞 (2015)、静岡県立大学 (第二回) 学長表彰 (2016)、(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 (2016)

Fluorescence imaging of virus-infected cells using sialidase activity

Tadanobu Takahashi / Associate Professor, School of Pharmaceutical Sciences,
University of Shizuoka

“Sialidase” is an enzyme that cleavages terminal sialic acid (*N*-acetylneuraminic acid, Neu5Ac) from saccharides. Some sialidase substrates are used as commercial reagents for detection of sialidase activity. 4-Methylumbelliferyl-Neu5Ac has been most often used for highly sensitive sialidase detection. Sialidase

reaction of 4-methylumbelliferyl-Neu5Ac produces the soluble fluorescent compound 4-methylumbelliferone by cleavage of Neu5Ac. This substrate cannot histochemically show localization of sialidase activity. Sialidase reaction of 5-bromo-4-chloroindol-3-yl-Neu5Ac (X-Neu5Ac) together with the sensitizer Fast Red Violet LB produces the insoluble fluorescent compound, which can histochemically and fluorescently show localization of sialidase activity. However, this substrate is insufficient sensitivity and is prone to non-specific staining. An insoluble fluorescent compound that can locally deposit on cells and tissues is needed for histochemical fluorescent visualization of sialidase activity. We developed a highly sensitive sialidase substrate “BTP3-Neu5Ac” with a benzothiazolylphenol derivative and a water-insoluble fluorescent compound named “BTP3” (excitation/emission= 372/526nm) as a new fluorescent sialidase detection tool for histochemical visualization of sialidase activity. BTP3-Neu5Ac itself is water-soluble and non-fluorescent as a sialidase substrate by conjugation of Neu5Ac to BTP3. After cleavage of Neu5Ac by sialidase reaction, BTP3 is locally deposited at the location of sialidase activity, resulting in fluorescence imaging of sialidase activity.

Viruses showing sialidase activity include influenza A and B viruses and some paramyxoviruses (human parainfluenza virus, mumps virus, Sendai virus, and Newcastle disease virus). Cells infected with these viruses abundantly express viral sialidase on the cell surface. BTP3-Neu5Ac can fluorescently visualize these viruses dot-blotted on the PVDF

membrane and the infected cells through high activity of viral sialidase in a short time and with an easy protocol of BTP3-Neu5Ac addition only. BTP3-Neu5Ac can visualize infected cells with no need for specific antibodies against viruses of variable antigenicities. There are various subtypes (surface antigenicities) of influenza A viruses. BTP3-Neu5Ac can visualize infected cells of human H1N1, human H3N2, 2009 pandemic H1N1, and avian H5N3, or genetically sialidase-expressing cells of 1918 pandemic H1N1, highly pathogenic avian H5N1, and avian H7N9 (isolated from humans in 2013) influenza A viruses, regardless of the viral subtype and host. BTP3-Neu5Ac can visualize living infected cells with no need for fixation of cells and tissues (live-cell imaging), leading to readily virus culture or virus isolation. BTP3-Neu5Ac would contribute to academic research and hygiene surveys as an efficient tool for visualization of infected regions, culture confirmation, titration, and isolation of viruses showing sialidase activity.

Influenza virus-specific sialidase inhibitors are commonly used as anti-influenza drugs for clinical treatment of influenza. Some influenza viruses that are resistant to sialidase inhibitors have emerged in nature. Fluorescent visualization of cells infected with drug-sensitive virus by BTP3-Neu5Ac is inhibited by adding an influenza virus-specific sialidase inhibitor. On the other hand, sialidase activity of drug-resistant virus is maintained even in the presence of a sialidase inhibitor. The use of a combination of sialidase inhibitors in the sialidase imaging can selectively visualize cells infected with drug-resistant viruses. The live-cell imaging in the presence of sialidase inhibitors is also applicable to high-efficiency isolation of drug-resistant viruses. The selective live-cell imaging of drug-resistant viruses will be a powerful method for study of the resistance mechanism, for public monitoring of resistant viruses, and for development of a new sialidase inhibitor that shows an effect on various resistant mutations.

Tadanobu Takahashi

Past Records	2004	Completed Ph. D. program, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka
	2004	Received Ph. D. (Pharmaceutical Sciences), University of Shizuoka
	2004	Postdoctoral fellow, CREST, JST
	2006	Assistant, School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka
	2007	Research Assistant Professor, School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka
	2010	Visiting Scientist, Influenza Research Institute, School of Veterinary Medicine, University of Wisconsin-Madison, USA (-2011)
	2013	Assistant Professor, School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka
	2015	Associate Professor, School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka
	Special Awards	1st Iwasaki Prize, Graduated from School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, Japan (with top honors) (1999); 8th Poster Prize, US/Japan Glyco 2004 (Honolulu), The Japanese Society of Carbohydrate Research (2005); Young Scientist Encouraging Prize, Nagoya Strongpoint for Glycoscience (Tousakagaku Nagoya-kyoten) (2010); Academic Encouraging Prize, Tokai branch of the Pharmaceutical Society of Japan (2013); Academic Encouraging Prize, The Japanese Society of Carbohydrate Research (2014); Prize for Aging and Health Sciences, Japan Foundation for Aging and Health (2014); 3rd TOBIRA Encouraging Prize, Tokyo Biomarker Innovation Research Association (TOBIRA) (2015); 1st President's Awards, University of Shizuoka (2015); Sugiura Award, The Japanese Society for Virology (2015); 2nd President's Awards, University of Shizuoka (2016); Academic Encouraging Prize for development of chemical and biological materials, Japan Bioindustry Association (2016)

農業分野の温暖化対策としての 植物熱耐性向上剤の開発

原 正和 / 静岡大学グリーン科学技術研究所 教授

ケッペンの気候区分によれば、わが国を含むアジア諸国には、熱帯、乾燥帯、温帯、亜寒帯など、様々な気候が存在する。さらに、雨季と乾季がある地域や、四季がある地域もある。こうしたアジアの多様な気候は、豊かな農業生産性を与える一方、収穫量の損失リスクをもたらす。気象変動によるリスクを低減するために、われわれは、農業技術の改良、例えば、異常高温に対する耐性の向上などに取り組まなければならない。当研究室では、植物における高温や低温への耐性に関する蛋白質を研究している（前者は熱ショック蛋白質、後者はデハイドリン）。ここで演者は、植物の熱耐性を高める農業資材の研究開発について述べる。

論文や特許で報告された、植物の熱耐性を高める技術は、4項目に分けられる。つまり、植物工場、耐暑性穀物の育種、遺伝子組換え植物、熱耐性向上剤である。植物工場は、栽培環境を完全にコントロールできるが、初期投資や管理コストがかさむ。育種は、イネのような穀物では方法論が確立されているが、多くの植物種では、育種効率はいまだに低い。遺伝子組換え作物の栽培と収穫は、多くの国々で高度にコントロールされている。熱耐性向上剤は散布が簡単であるが、研究の歴史が短いため、ほとんど製品化されていない。われわれは、効果的な植物の熱耐性向上剤の作出を目指している。

イソチオシアネートは、日本食の伝統的な香辛料であるワサビの辛味成分である。イソチオシアネート研究の過程で、われわれはイソチオシアネートに植物の熱耐性を高める効果があることを見出した。さらに研究を進めると、イソチオシアネートは植物の特異的な熱ショック蛋白質の発現を高めることが分かった。熱ショック蛋白質は、高温によってダメージを受けた細胞の蛋白質を修復する。従って、熱ショック蛋白質遺伝子の活性化と熱ショック蛋白質の蓄積は、植物細胞に熱耐性を付与すると考えられる。われわれは、イソチオシアネート誘導性熱ショック蛋白質遺伝子のプロモーターを特定した後、熱ストレスに依存して定量的に蛍光を発する形質転換植物を作成した。そして熱ショック応答を誘発するアルカロイドを見出した。イソチオシアネートは辛味を有する不安定な油であるため、そのまま圃場で散布することは難しく工夫が必要だが、そのアルカロイドは水溶性で安定性が高い。現在、上記のアルカロイドを含有する農業資材が、熱耐性向上効果を示す植物活性化剤として全農から販売されている。静岡の企業が商品化と販売を行っている。

今後、農業分野の温暖化対策の一環として、それぞれの作物に応じた新たな熱耐性向上剤を作出するために、さらなる研究開発が必要である。



原 正和

略 歴	1990	京都大学薬学部卒業
	1995	京都大学大学院薬学研究科博士課程（薬学専攻）修了
	1995	文部省日本学術振興会特別研究員（PD）ミュンヘン大・京大
	1997	静岡大学農学部助手
	2003	静岡大学農学部助教授
	2005	静岡大学農学部教授
	2013	静岡大学グリーン科学研究所教授
受 賞 歴	2005	日本植物細胞分子生物学会奨励賞

Development of plant heat tolerance enhancers as global warming countermeasures in agriculture

Masakazu Hara / Professor, Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University

Asian countries including Japan have diverse climate types, such as tropical moist climates, dry climates, moist mid-latitude climates with mild winters, and moist continental mid-latitude climates, which are determined by the Köppen climate classification system. In addition, dry and wet seasons and four calendar seasons also appear in every year. Such diverse climate in Asia brings both rich agricultural productivities and risks of yield loss in agriculture. To reduce the risks due to climate we need an improvement in agricultural technology, for instance the enhancement of tolerance to extreme temperatures. We have studied proteins regarding the tolerances to high and low temperatures (heat shock proteins and dehydrins, respectively) in plants. Here, I mention the research and development of agricultural materials which enhance heat tolerance of plants.

Technologies promoting the heat tolerance of plants which have been reported in publications and patents can be categorized into 4 items, i.e. plant factory, breeding of thermotolerant crops, genetically modified plants, and heat tolerance enhancers. Although the plant factory totally controls the environment of cultivation, initial investment and management are costly. Breeding is a confirmed technology for some crops including rice, however the breeding efficiencies are still low in many plant species. The cultivation and harvest of genetically modified plants are highly controlled in many countries. Heat tolerance enhancers is simple in application, but there is little product at present because the

history of the research is brief. Our challenge is to produce effective heat tolerance enhancers of plants.

During the study on isothiocyanates which are pungent components of wasabi used in Japanese dishes as a traditional spice, we found that isothiocyanates show the enhancing activity of heat tolerance in plants. Further studies suggested that the administration of isothiocyanates promote the gene expression of specific heat shock proteins in plants. Since heat shock proteins are major factors which repair cellular proteins damaged by high temperature, the activation of heat shock protein genes and the accumulation of the corresponding proteins may allow the plant cells to be heat tolerant. After determining the promoter region of the isothiocyanates-inducible heat shock protein gene, we produced transgenic plants which can quantitatively emit fluorescence depending on heat stress. Finally we found that an alkaloid shows promoting effect on the heat shock response. Although it is likely that the application of isothiocyanates is difficult in the field because they are unstable pungent oils, the alkaloid is stable and water soluble. Now, an agricultural material containing the alkaloid has been on sale through the market of Japan Agricultural Cooperatives as a plant activator showing the heat tolerance enhancing effect. It has been accomplished by a local company in Shizuoka.

Further research and development are needed to produce new kinds of heat tolerance enhancers which are suitable to individual crops as global warming countermeasures in agriculture.

Masakazu Hara

Past Records	1990	Graduated from Kyoto University. Fac. Pharmaceutical Sciences
	1995	Completed Ph. D. program, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University
	1995	JSPS Postdoctoral Fellowship, Ludwig-Maximilians-Universität München and Kyoto University
	1997	Assistant Professor, Fac. Agriculture, Shizuoka Univ.
	2003	Associate Professor, Fac. Agriculture, Shizuoka Univ.
	2005	Professor, Fac. Agriculture, Shizuoka Univ.
	2013	Professor, Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka Univ.
Special Awards	2005	Encouragement Award, Japanese Society for Plant Cell and Molecular Biology

より安全な手術、全身麻酔のためのバイトブロック — 医工連携による医療機器開発 —

鈴木 明 / 浜松医科大学医学部附属病院医療安全管理室 特任講師

医療現場では、使い捨ての針から人工心肺装置や手術支援ロボットまで様々な道具が使用されているが、改良の余地があると感じるものも多い。

全身麻酔で行う手術中は、麻酔薬の副作用で呼吸が止まってしまうため、人工呼吸が必要である。人工呼吸を行うには、直径約1cmのチューブを口から肺まで入れ人工呼吸器に接続する必要がある。さらに麻酔から覚める時などに、そのチューブを無意識に噛み潰さないために厚さ2cm弱のブロック状の物（バイトブロック）を歯の間に入れる必要もある。そのバイトブロックにより舌や口の中、唇が傷つかないよう医師と看護師が注意しているが、長時間の手術、うつ伏せで行う手術等では、舌や唇がブロックと歯に挟まれて傷ができてしまう事がある。そこで、チューブを保護する機能に加え、舌や唇を傷つけない機能を持ったバイトブロックが臨床現場では求められていた。

現場医師は新たな形状のアイデアは持っていたが、

具体的にそれを形にする方法がわからなかった。そこで、JST事業「はままつ次世代光・健康医療産業創出拠点」に相談し、新たに医療機器分野に参入を考えている地元企業を紹介してもらうことが出来た。また、研究開発をすすめるにあたり、上記事業の医工連携スタートアップ支援事業、並びに静岡県産業振興財団の産学官連携研究開発助成事業から資金援助も得た。

形状、硬さ、材質の検討、そして材料の安全性試験を行い、試作品を作成、浜松医科大学附属病院手術部で臨床試用、改良を繰り返し、平成28年4月、今までとは異なった形状のバイトブロックが完成し、「バイトガード」と命名された。

また、開発と並行して、浜松医科大学知財活用推進本部の協力で研究開発成果を特許出願し1件が特許査定となった。

初めてモノづくりを経験した臨床医の視点から、この医療機器の開発の経緯をお話する予定である。



鈴木 明

略 歴	年	経歴
	1991	浜松医科大学医学部医学科卒業
	1991	浜松医科大学医学部附属病院麻酔科蘇生科
	1996	静岡県立こども病院麻酔科
	1999	浜松医科大学医学部麻酔・蘇生学 助手
	2001	米国ペンシルベニア大学麻酔科 客員研究員
	2004	博士（医学）浜松医科大学
	2010	浜松医科大学医学部附属病院集中治療部 助教
	2011	浜松医科大学医学部附属病院医療安全管理室 特任講師

Bite block for safer surgery and general anesthesia: Development of Medical Instruments through medical-engineering collaboration

**Akira Suzuki / Senior Assistant Professor, Department of Patient Safety,
Hamamatsu University Hospital**

In a medical setting, we use a lot of medical equipment such as disposable needles, cardio pulmonary bypass machines, and surgical robots, but there is some equipment which need to be improved.

During the operation with general anesthesia, we need a mechanical ventilation because anesthetics stops patients to breathe spontaneously. We inserted a tracheal tube into the trachea through a mouth to make an airway from ventilating device to patient's trachea. Additionally, a rectangular block with a height of approximately two cm (a bite block) was inserted between the teeth to protect the tracheal tube. Consequently, a tongue, a lip, and/or an inner wall of the mouth were injured by the bite block, and we needed a bite block that prevent these problems.

We had an idea about the new shape of the bite block, but we could not make the product by ourselves. JST Program "Hamamatsu Medical and Engineering Technology Innovation Core"

introduced us a company who was interested in our idea and developing the new bite block together.

Throughout the joint research, we made various trial products, tested at the operating room of the Hamamatsu University Hospital, and improved the product numerous times.

With the help of a grant from Medical and Engineering collaboration startup support program (Hamamatsu Medical and Engineering Technology Innovation Core) and Industry-academia-government collaboration Research and Development Grant Program (Shizuoka Prefecture Industrial Promotion Foundation) we have completed the development of the "Bite guard" in April 2016. Hamamatsu University School of Medicine Intellectual Property Management Division helped us to have a patent application on this product, and the decision to grant a patent was made.

In this session I will explain how this medical instrument was developed.

Akira Suzuki

Past Records	1991	Graduated from Hamamatsu University School of Medicine
	1991	Resident, Department of Anesthesiology & Critical Care Medicine, Hamamatsu University Hospital
	1996	Department of Anesthesia, Shizuoka Children's Hospital
	1999	Research Associate, Anesthesiology & Critical Care Medicine, Hamamatsu University School of Medicine
	2001	Visiting Scholar, Department of Anesthesiology and Critical Care, University of Pennsylvania, USA.
	2004	Ph.D., Hamamatsu University School of Medicine
	2010	Assistant Professor, Intensive Care Unit, Hamamatsu University Hospital
	2011	Senior Assistant Professor, Department of Patient Safety, Hamamatsu University Hospital