

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：13601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15547

研究課題名(和文)小骨固定・骨移植・骨再生・エンテシス再建のためのチタンペーパーの開発

研究課題名(英文)Titanium fiber paper for compound fracture repair, bone tissue regeneration and enthesis reattachment.

研究代表者

齋藤 直人(Saito, Naoto)

信州大学・学術研究院保健学系・教授

研究者番号：80283258

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文):チタン繊維を素材とし、常温で圧縮荷重とせん断荷重を同時に付加し、繊維形状を残したまま板状に成形させたチタンペーパーは、骨と同等の弾性率と、骨形成に適している多孔性構造をもつ。このチタンペーパーに、骨髄間葉系幹細胞から分化させた骨芽細胞を複合し、ラットの骨欠損部に留置すると、従来のチタンプレートを用いるより高い骨組織修復能を示すことを明らかにした。長期間骨と密着して使用することが可能で、更に骨修復を促進することができるチタンプレートの用途は広く、骨折治療や骨再生医療など、今後ますます増加する骨疾患の臨床に大きく貢献することが期待できる。

研究成果の概要(英文):Titanium fiber paper, which is prepared by molding titanium fibers into plates by simultaneously applying compression and shear stress at normal room temperature to retain the original fiber shape, can exhibit an elastic modulus similar to that of bone cortex and form a porous structure suitable for cell adhesion. We combined titanium fiber paper with osteoblasts differentiated from bone marrow mesenchymal stem cells and showed that the paper was better able to facilitate bone tissue repair than conventional titanium plates when implanted into rat bone defects. Also capable of being used in close contact with bone for long periods of time and promoting bone repair, titanium fiber paper has a wide range of potential applications and is expected to make great contributions to the clinical management of bone diseases, including bone fracture repair and bone regenerative medicine.

研究分野：生体医工学、生体適合システム学

キーワード：骨折 骨移植 骨再生 エンテシス

### 1. 研究開始当初の背景

チタンは強度が高く一定の骨親和性を有するため、整形外科領域における骨接合手術のプレートやスクリュー、人工関節ステム、脊椎固定インプラント等に頻用され、その有効性と安全性が臨床で実証されている生体材料である。しかしこれまでチタンは、その強度を前提として用いられてきたため、長期間接触している骨の脆弱化等の変化は避けられないと考えられてきた。このため、骨と長期間共存することを目的としたチタンの開発研究は、国内・国外とも極めて少ない。研究代表者は、これまでの常識を打ち破る“骨との共存”を前提とした、薄くて軽い紙のようなチタン繊維薄板(チタンペーパー)を開発した。このチタンペーパーは骨皮質と同等の弾性率をもつために、長期間骨と接触していても骨の脆弱化を生じない。更に骨と高い結合性を示す多孔構造をもつ。このため、骨と長期間共存する、骨形成を促進する等の特性をもつ。また、骨形成の最適な足場材になる。これらの特性を最大限に活用したチタンペーパーの用途は、これまでのチタンと全く異なるため、整形外科の治療を大きく変える可能性がある。

### 2. 研究の目的

新規チタンペーパーの整形外科治療における以下の5つの用途の有用性と、それぞれに適切なチタンペーパーの性状を探究する。粉碎骨折や指骨等の骨折で、微小な骨片を母床の骨に固定する。骨欠損修復において、チップ状の骨や海綿骨の移植、顆粒状ハイドロキシアパタイト(HA)の充填した欠損部をカバーする。in vivo の骨再生医療において、多孔性足場材として骨形成タンパク(BMP)を複合し、必要部位に添付する。in vitro の骨再生医療において、チタンペーパー上で骨形成細胞を増殖した新しい細胞シートを開発し、骨再生部位に移植する。外傷や人工関節手術などで必要となるエンテシス(腱と骨の付着部)の再建において、チタンペーパーでオーバーラップして縫合することにより、腱と骨の組織が入り込み結合を誘導する。

試作したチタンペーパーを用いて、生物学的実験を医学系が行い、結果を工学系にフィードバックする。試作と実験を繰り返し、目的に最適なチタンペーパーを開発する。研究期間内にそれぞれの用途の実現可能性を示し、臨床応用のプロトタイプを作製することを目標とする。

本研究で検証するチタンペーパーの5つの用途は、全て現在の整形外科治療における重要な課題を解決する。粉碎骨折や骨欠損修復への応用は実現性が高く、早期に整形外科手術への導入が期待できる。in vivo の骨再生医療は現在一般臨床に普及していないが、本研究により高い有効性を認められれば、その普及に貢献する。in vitro の骨

再生医療は新規性が高く、再生医療のイノベーションを生み出す可能性がある。エンテシス再建は整形外科の多分野における古くからの課題であり、チタンペーパーにより強固な結合が実現すれば、大きな意義がある。工学系の技術シーズと医学系の臨床ニーズが合致し、整形外科治療に有用な全く新しいチタンペーパーを着想した。このチタンペーパーは骨皮質と同等の弾性率と約3倍の強度をもち、小骨を保持し長期間母床の骨と共存することに適している。また、骨と高い結合性を示す多孔構造を合わせ持つため、骨形成を促進することができる。これらの特性を生かして、小骨片の母床骨への固定・骨移植部のカバー・骨再生の足場材・エンテシス再建の足場材等、多彩な用途をもつ世界初のチタンペーパーを開発する。

### 3. 研究の方法

チタンペーパーの技術開発を信州大学工学部が行い、試作されたチタンペーパーの生物学的評価を信州大学医学部が行う。得られた結果を、随時フィードバックし、さらに実効性の高い機能性チタンペーパーを開発していく。このように医学と工学がそれぞれの専門知識と実験技術を動員・統合して、横断的な新知見を獲得していく。研究終了時の目標は、それぞれの用途の実現可能性を示し、最適なチタンペーパーのプロトタイプを完成させることである。

#### チタンペーパーの試作

金属金型の間にチタン繊維を充填し、圧縮荷重とせん断荷重を同時に負荷させることでチタン繊維を薄板状に成形する(常温圧縮せん断法)。成形に用いるチタン繊維のアスペクト比(繊維の直径と長さの比)・成形時の圧縮荷重・せん断荷重・成形温度を変化させ、常温圧縮せん断法により整形外科治療の用途に最適なチタンペーパーを試作する。チタンペーパーは、純チタン及びチタン合金(Ti-6Al-4V)の2種類で、それぞれ厚さ100 $\mu\text{m}$ -1mmで変化させる。多孔構造は等方的で均一であり、porosityは30-40%である。

#### 細胞培養試験

チタンペーパーの基本的な生物学的反応として、骨芽細胞・破骨細胞・線維芽細胞を表面で培養する。分化・増殖能を調べ、各細胞に特徴的な遺伝子発現・タンパク誘導を解析する。先行試験として、直径9.0mmの円形サンプル上に骨芽細胞を3500cells/cm<sup>2</sup>播種し、1, 3, 24, 72, 168時間での細胞数を計測したところ、骨芽細胞が経時的に増加した。

#### 正常骨の反応評価

チタンペーパーを実験動物の正常な長管骨に縫い付け、経時的に摘出して骨組織の反応を形態学的に観察する。また、チタンペーパーと骨界面及び周囲組織での遺伝子の発現とその機能を解析する。コントロール群はチタン圧延材とし、処置をしない反対側を比較対象とする。

#### 微小骨片の固定

実験動物の長管骨に粉碎骨折を作製し、チタンペーパーでカバーして固定する。コントロール群は通常のチタン圧延材とする。骨癒合を動物用 CT で継時的に評価し、一定期間後に骨を摘出して評価する。3 月の短期群と 12 月の長期群を設け、組織学的検査及び骨量検査を行う。

#### 移植骨または HA による骨欠損修復

実験動物に自然修復しない骨欠損を作製し、腸骨から採取したチップ状の骨を移植して、チタンペーパーでカバーする。コントロール群は通常のチタン圧延材とする。また、骨移植を行わないでチタンペーパーのカバーのみをする群も設ける。骨欠損の修復を動物用 CT で継時的に評価し、一定期間後に骨を摘出して評価する。3 月の短期群と 12 月の長期群を設け、組織学的検査及び骨量検査を行う。全く同じ実験を、骨移植ではなく HA 顆粒を充填して行う。

#### in vivo の骨再生試験

チタンペーパーの小円形ペレットを作製し、多孔構造に rhBMP-2 を複合して実験動物に移植する。筋膜下に埋植して経時的に摘出し、骨形成を X 線像と組織像で評価すると共に骨塩量を計測する。コントロール群はゴールドスタンダードである同形のコラーゲンシートを用いる。次に実験動物に骨欠損を作製し、同じ rhBMP-2 を複合したチタンペーパーまたはコラーゲンシートでカバーする。骨欠損の修復を動物用 CT で継時的に観察し、一定期間後に骨を摘出して評価する。3 月の短期群と 12 月の長期群を設け、組織学的検査及び骨量検査を行う。以上の実験において、チタンペーパーの厚さと多孔構造を変化させて比較し、最適な条件を決定し、新しい骨再生用足場材を開発する。

#### in vitro の骨再生試験

実験動物から骨髄細胞を採取してチタンペーパー上で培養し、同じ個体の筋膜下組織に移植する。経時的に摘出し、骨形成を画像と組織像で確認する。次に実験動物に骨欠損を作製し、同じ手技で培養した自家骨髄細胞を複合したチタンペーパーでカバーする。骨欠損の修復を動物用 CT で継時的に評価し、一定期間後に骨を摘出して評価する。3 月の短期群と 12 月の長期群を設け、組織学的検査及び骨量検査を行う。以上の実験で最適な条件を決定し、チタンペーパー上で骨形成細胞を増殖した新しい細胞シートを開発する。

骨髄細胞と成長因子を用いて、チタンペーパー上での新生骨形成に挑戦する。骨再生研究者の夢である培養液中で 1 辺 1cm 以上の骨形成を達成するために、様々な成長因子を利用し、チタンペーパーによる立体形状構築を工夫する。

#### エンテシスの再建

実験動物の長管骨から腱を切離し、一定期間経過してから縫合する。この際に、そのまま縫合する群と、チタンペーパーでカバーし腱

と骨の両方とオーバーラップして縫合する群を作製する。継時的に摘出して、組織像で接合部を評価する。また、一部の検体は機械的な引き抜き強度試験を実施する。

#### 複合研究

と の試験結果から新規開発した骨再生用足場材および細胞シートを用いて、と の微小骨片の固定試験および骨欠損修復試験を行う。さらに のエンテシス再建にも応用する。チタンペーパー単独と比較して、より良好な結果が得られることが期待できる。

臨床応用のためのチタンペーパーのプロトタイプの作製

以上の医学系の培養実験および動物実験の結果を、常に工学系のチタンペーパーの設計・作製にフィードバックし、反復しながら適切な条件を見出す。最終的にはそれぞれの用途に最適なチタンペーパーのプロトタイプを完成させることを目標とする。

#### 4. 研究成果

H27 年度から H29 年度まで「小骨固定・骨移植・骨再生・エンテシス再建のためのチタンペーパーの開発」というテーマで研究を行った。この中で「小骨固定」「骨再生」について論文報告をした (Takizawa T, Saito N, et al, Titanium fiber plates for bone tissue repair, Advanced Materials, 2018 Jan;30(4)). 以下にその成果内容を示す。

Titanium fiber plate (TFP) は純度 99%、繊維直径は約 20  $\mu\text{m}$ 、繊維長は約 500  $\mu\text{m}$  の繊維状のチタンを圧縮加工したペーパー状構造で、骨皮質に近い強度と弾性率を有しストレスシールドの影響なく長期間骨と共存できる利点を有する。さらに TFP の有する多孔性構造が、細胞の接着保持や欠損骨修復の足場に適しており、また形状を母床の骨形状に自在に調節できるため粉碎骨折の小骨片固定にも有用と考えられる。

今回我々は TFP が従来のチタンプレート (Conventional titanium plate; CTP) と比較して骨再生の足場材 (scaffold) になり得るか検討するため、同サイズの形状に揃えて in vitro 及び in vivo で比較した。

in vitro で各 Scaffold 上にマウス前骨芽細胞 (MC3T3-E1 細胞) を播種し、顕微鏡観察による細胞接着形態と蛍光強度の比較で細胞増殖能を評価した。また、ラット大腿骨から採取した間葉系骨髄細胞をリコンビナントヒト BMP-2 (rh-BMP2) を用いて 7 日間骨芽細胞に分化誘導した細胞を各 Scaffold 上に播種し、細胞接着形態を走査型電子顕微鏡 (SEM) と共焦点レーザー顕微鏡 (LSM) を使って観察し、定量 PCR を用いて細胞接着関連遺伝子の発現比を比較評価した。in vivo でウサギの尺骨骨幹部中央に小骨片を含む粉碎骨折を作製し、長方形の TFP とステンレス製のミニスクリューを用いて両端をプレート様に固定、術後 4 週で単純レントゲンと  $\mu$

CTにて骨折治癒を評価した。また、rh-BMP2を添加した各 Scaffold をマウス背筋内に移植して、術後3週間で組織を摘出し $\mu$ CTと骨組織像で骨再生を比較評価した。また、ラット間葉系骨髄細胞をrh-BMP2を用いて骨芽細胞系細胞に分化誘導した細胞を各 Scaffold 上に播種し、5mmの骨欠損部を作製したラット頭蓋骨にこれを移植し、8週後の骨組織像により骨再生の比較評価を行った。

(1)MC3T3-E1細胞のTFP上での接着と増殖  
マウス前骨芽細胞であるMC3T3-E1細胞を、直径5mmの円盤状に成形した各 Scaffold に初期細胞濃度  $1.0 \times 10^5$  cells/plate で播種した。

24時間後にMC3T3-E1細胞の細胞核をBisbenzimidazole H33342 (以下 H33342) で染色し蛍光顕微鏡を用いて観察したところ、両群ともで辺縁まで良好な細胞接着が認められた。2日後と5日後にAlamar blue assay で細胞増殖を測定した。

TFP、CTP、Cell culture plateともに、2日後より5日後の細胞が有意に増殖した ( $p < 0.01$ )。5日後ではTFPはCTPと比べて同等の増殖能を示し ( $p = 0.45$ )、両群とも cell culture plate よりも有意に高い細胞増殖能を示した。

(2)分化誘導ラット骨髄間葉系細胞によるTFP評価

10週齢のオスWistarラットの大腿骨から採取した骨髄間葉系幹細胞を10cm dishを用いて培養した。

骨芽細胞分化を100ng/ml rh-BMP2で培養液に加えて7日間培養して行った。分化した骨芽細胞を各 Scaffold に播種した。播種後1日目の Scaffold 上の骨芽細胞の核をH33342で、アクチン繊維をPhalloidin-FITCで染色し、LSMにて観察したところ、骨芽細胞に分化させた細胞の接着形態はどちらも細胞突起の拡がり観察された。TFP上では、骨芽細胞がチタン繊維に沿って接着していた。SEMによる観察において、細胞突起がチタン繊維に絡むように接着していた。

遺伝子発現解析は  $1.0 \times 10^5$  個のラット骨髄間葉系細胞を、rhBMP-2を用いて7日間骨芽細胞に分化誘導させ、各 Scaffold に播種し1日後にトータルRNAを採取し、cDNAを合成後Adherens Junctions用のRT2 Profiler PCR Arrayを用いて、細胞接着関連遺伝子の発現量の比を評価した ( $n = 3$ )。TFP群がCTP群よりも有意に高い発現をしている遺伝子は、84種類中8種類であった。特にDspは遺伝子発現量が69.7倍、Dsc3は22.2倍、Ppap2bは8.7倍、Dsc2は5.3倍とCTPに対して高値を示した ( $p < 0.01$ )。一方、CTP群の方が有意に高い発現をしている遺伝子は9種類であった。特にCdhは13.6倍、Dlg5は10.6倍とTFPに対して高値を示した ( $p < 0.01$ )。骨芽細胞の接着様式が遺伝子レベルでそれぞれ異なった。

(3)TFPを用いたウサギの粉碎骨折治癒  
6週齢雄のJapan Whiteウサギの尺骨骨幹部

中央に  $3 \times 3 \times 3$ mmの粉碎骨折を作製した。この粉碎骨折に対して  $5 \text{mm} \times 20 \text{mm}$ の長方形のTFPを圧着させて、ステンレス製のミニスクリュー2本を用いて尺骨に固定した。コントロール群は、同様の粉碎骨折を作製して、そのまま固定を行わなかった。3匹ずつ2群の骨折治癒について、4週後に単純レントゲン像及びmicro-computed tomography ( $\mu$ CT)像を用いて評価した。両群とも骨片の転位を認めず、TFP群ではインプラントの折損を認めなかった。TFPで固定した群は十分な骨修復を認め全周性に骨癒合していた。

一方、コントロール群は骨修復が不十分で、骨の連続性がない部分が認められた。

(4)TFPを用いたrhBMP-2によるマウスでの異所性骨形成

$5 \mu\text{g}$ のrhBMP-2を円盤状の各 Scaffold に附着させ、6週齢の雄ddYマウスの背筋内に4匹ずつ埋植した。術後3週でマウスを犠牲にし、 $\mu$ CTを用いて背筋部を撮影した。 $\mu$ CT像で、各 Scaffold ともに明瞭な異所性骨形成を認めた。

各マウスで形成された異所性骨のBone Volume/Tissue Volume (BV/TV) ( $\text{cm}^3$ )を算出した。また平均CT値を計測することから総骨質量を算出して比較した。骨形成体積はTFP群が  $0.56 \pm 0.02 \text{ cm}^3$ 、CTP群が  $0.53 \pm 0.02 \text{ cm}^3$  で有意差を認めなかった ( $p = 0.83$ )。また総骨質量も、TFP群が  $347.4 \pm 59.5 \text{ mg}$ 、CTP群が  $364.5 \pm 145.4 \text{ mg}$  で有意差を認めなかった ( $p = 0.73$ )。

$\mu$ CT撮影後に各 Scaffold を周囲の軟部組織とともに取り出し、組織標本を作製して光学顕微鏡で観察した。

両群ともプレートを取り囲むように異所性骨形成を認め、TFPでは繊維間の内部にも骨組織の形成が認められた。

(5)TFPと骨芽細胞によるラットの骨欠損部の骨再生

10週齢の雄Wistar Ratの大腿骨から採取した骨髄間葉系幹細胞を7日間rhBMP-2を含むMEM培地中で培養しALP assayを行った。rhBMP-2を含まない培地で培養した細胞と比較し、rhBMP-2を含む培地で培養した細胞では、ALP activityが有意に増加しており (BMP+;  $1.825 \pm 0.415 \text{ mol/g}$  vs BMP-;  $1.052 \pm 0.067 \text{ mol/g}$ ,  $p = 0.001$ )、骨芽細胞に分化していることが確認された。TFPまたはCTPに、それぞれ  $1.0 \times 10^5$  cellsを播種し、一晚培養し接着させた。10週齢の雄Wistar Ratの頭蓋骨中央部に5mm欠損孔を1箇所作製し、細胞を接着させたTFPとCTPを、頭蓋骨欠損部に設置した ( $n = 5$ )。8週後にラットを犠牲にして、頭蓋骨の組織標本を作製し、骨再生能を評価した。両群共に頭蓋骨欠損部両端から中央部にかけて、骨髄組織を伴う骨梁構造が認められた。

TFP群ではプレートを取り囲むように骨組織が形成され良好な骨再生が観察された。しかし、CTP群ではプレートの一部にのみ骨組織が形成され欠損部の再生は不十分であった。

プレートと骨組織の接触率（再生骨組織とプレートの接触長/プレートの全長）を計測すると、TFP 群が  $72.0 \pm 27.1\%$  であるのに対し CTP 群は  $25.4 \pm 17.7\%$  であり、TFP 群が約 2.8 倍で、有意に高かった ( $p=0.012$ )。

TFP と CTP で細胞接着形態が同じであったが両群とも良好な細胞接着を示した点、細胞接着遺伝子では TFP は CPT と異なる発現遺伝子を持っていた点、同所性骨修復実験では TFP の方が骨修復に CTP よりも有利な組織接触率を示した点と併せると、総合的に TFP は CPT より細胞接着保持性が高く骨修復能が高いことが示唆された。その理由の1つとして、scaffold 表面の立体的繊維構造が大きく寄与していると考えられる。

TFP は CTP に比べて骨形成細胞及び再生組織との接着率が高く骨欠損を修復する能力が高かった。骨と密着して骨修復を促進できる TFP の用途は広く、骨疾患の臨床に大きく貢献することが期待できる。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Takizawa T, Nakayama N, Haniu H, Aoki K, Okamoto M, Nomura H, Tanaka M, Sobajima A, Yoshida K, Kamanaka T, Ajima K, Oishi A, Kuroda C, Ishida H, Okano S, Kobayashi S, Kato H, Saito N\*. Titanium fiber plates for bone tissue repair. Adv Mater 30: 1703608, 2017. 査読有

〔学会発表〕(計4件)

滝沢崇, 青木薫, 岡本正則, 田中学, 傍島淳, 吉田和薫, 鎌仲貴之, 加藤博之, 羽二生久夫, 安嶋久美子, 大石歩, 黒田千佳, 石田悠, 齋藤直人, 中山昇. 骨組織修復のためのチタンファイバープレート. 第119回信州整形外科懇談会, 松本, 2017.02.11.

滝沢崇, 中山昇, 羽二生久夫, 青木薫, 岡本正則, 田中学, 傍島淳, 吉田和薫, 鎌仲貴之, 安嶋久美子, 加藤博之, 齋藤直人. 骨組織修復のためのチタンファイバープレート. 第32回日本整形外科学会基礎学術集会, 沖縄, 2017.10.26-27.

滝沢崇, 齋藤直人, 中山昇, 羽二生久夫, 青木薫, 岡本正則, 田中学, 傍島淳, 吉田和薫, 大石歩, 安嶋久美子. チタンペーパーの骨再生における足場材としての有用性の検討(その2). 第31回日本整形外科学会基礎学術集会, 福岡, 2016.10.13-14.

滝沢崇, 田中学, 齋藤直人, 羽二生久夫, 中山昇, 青木薫, 岡本正則, 高梨誠司, 小林伸輔, 野村博紀, 加藤博之. チタンペーパーの骨再生における足場材としての有用性の検討. 第30回日本整形外科学会基礎学術集会, 富山, 2015.10.22-23.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.shinshu-u.ac.jp/institution/>

[iccer/topics/iccer/post-31.html](http://iccer/topics/iccer/post-31.html)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

齋藤 直人 (SAITO, Naoto)  
信州大学・学術研究院保健学系・教授  
研究者番号: 80283258

##### (2) 研究分担者

中山 昇 (NAKAYAMA, Noboru)  
信州大学・学術研究院工学系・准教授  
研究者番号: 80336445

##### (3) 連携研究者

滝沢 崇 (TAKIZAWA, Takashi)  
信州大学・医学部附属病院・医員  
研究者番号: 40748109  
羽二生 久夫 (HANIU, Hisao)  
信州大学・学術研究院医学系・准教授  
研究者番号: 30252050  
田中 学 (TANAKA, Manabu)  
信州大学・医学部附属病院・医員  
研究者番号: 30723069  
青木 薫 (AOKI, Kaoru)  
信州大学・医学部・准教授  
研究者番号: 30467170  
岡本 正則 (OKAMOTO, Masanori)  
信州大学・医学部附属病院・診療助教  
研究者番号: 50596781  
安嶋 久美子 (AJIMA, Kumiko)  
信州大学・先鋭領域融合研究群バイオメディカル研究所・研究員  
研究者番号: 70584051  
傍島 淳 (SOBAJIMA, Atsushi)  
信州大学・医学部附属病院・医員  
研究者番号: 00770760  
鎌仲 貴之 (KAMANAKA, Takayuki)  
信州大学・医学部附属病院・医員  
研究者番号: 30791884  
高梨 誠司 (TAKANASHI, Seiji)  
信州大学・医学部附属病院・医員  
研究者番号: 70596783  
小林 伸輔 (KOBAYASHI, Shinsuke)  
信州大学・医学部附属病院・医員  
研究者番号: 40624705  
野村 博紀 (NOMURA, Hiroki)  
信州大学・医学部附属病院・医員  
研究者番号: 40646543  
吉田 和薫 (YOSHIDA, Kazushige)  
信州大学・医学部附属病院・医員  
研究者番号: 60770774  
加藤 博之 (KATO, Hiroyuki)  
信州大学・学術研究院医学系・教授  
研究者番号: 40204490

##### (4) 研究協力者

黒田 千佳 (KURODA, Chika)  
岡野 怜己 (OKANO, Satomi)  
石田 悠 (ISHIDA, Haruka)