

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2008～2011

課題番号：20240043

研究課題名（和文） 高機能人工骨の創製

研究課題名（英文） Development of high performance artificial bone

研究代表者

鄭 雄一（TEI YUICHI）

東京大学・大学院工学系研究科・教授

研究者番号：30345053

研究成果の概要（和文）：

人工骨は自家骨や他家骨に比べて機能が劣るため、臨床家は不満を抱いている。高い生体適合性と生体安全性と生体分解吸収性をもつリン酸カルシウム粉体の三次元形状を制御して人工骨の造形を行う方法と、バイオマテリアルへ生理活性物質を付与して周囲の細胞の機能を制御する方法を開発して、融合することで、機能を大幅に向上させたオーダーメイド型人工骨およびテトラポッド型人工骨の2種類の新規人工骨を創製した。

研究成果の概要（英文）：

Artificial bones are inferior to autograft and allograft bone in performance, leaving clinicians dissatisfied. We integrated the method to control 3D shape of artificial bones made of calcium phosphate powder materials, which have high biocompatibility, biosafety and biodegradability, and the method to endow biomaterials with bioactivity, which controls the function of surrounding cells, and created two types of novel artificial bones: custom-made artificial bone and tetrapod-shaped artificial bones.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	10,300,000	3,090,000	13,390,000
2009年度	9,400,000	2,820,000	12,220,000
2010年度	9,400,000	2,820,000	12,220,000
2011年度	9,400,000	2,820,000	12,220,000
年度			
総計	38,500,000	11,550,000	50,050,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学、医用生体工学・生体材料学

キーワード：人工臓器学・再生医工学

1. 研究開始当初の背景

不可逆性骨欠損・変形に対する治療としては次の自家骨移植・他家骨移植・人工骨移植三種類が行われている。人工骨としては、リン酸カルシウムを主成分とするものが広く使用されている。リン酸カルシウムは生体適合性が高く、生体安全性も保証され、さらには骨伝導能を持ち、金属・ポリマー・他のセ

ラミックス等と比較して人工骨の出発素材としては最適と考えられるが、理想的な人工骨は未だ実現していない。このような問題点を解決するためには、リン酸カルシウムの造形法を研究して、形状・操作性、分解吸収、強度の改善を図ることと、素材に生理活性を付与することが必要である。

2. 研究の目的

①リン酸カルシウム造形法の研究：インクジェットプリンターによるオーダーメイド型人工骨に関しては、造形精度の向上、分割による操作性の向上、内部構造設計による分解吸収性の向上、後処理により力学的強度の改善を図る。

テトラポッド型微小人工骨に関しては、後処理による力学的強度の向上、焼結温度の調節による分解吸収性の向上を図る。

②生理活性物質の同定と付与方法の研究：バイオセンサーによる生理活性物質同定と作用機序の分子生物学的解析を行い、同定された生理活性物質について、リン酸カルシウムに付与した際の最適の送達制御法を明らかにする。

③動物実験での検証：人工骨の試作と動物実験による安全性・有効性の証明を行った後、臨床研究へ向けての準備を行う。

3. 研究の方法

①リン酸カルシウム造形法の研究

インクジェット式粉体積層造形によるオーダーメイド型人工骨の形状、操作性、分解吸収性、強度の改善、微小射出成形によるテトラポッド型微小人工骨の強度と分解吸収性の測定

②生理活性物質の同定と付与方法の研究
バイオセンサーによる骨形成性生理活性物質の同定と作用機序の分子生物学的解析
リン酸カルシウムに付与する際の最適な送達制御法の解析

③動物での検証

高機能人工骨の試作

動物実験による安全性・有効性の証明
臨床研究の準備

4. 研究成果

①オーダーメイド型人工骨に関しては、連通孔を開ける位置を軟部組織の側に設けると、軟部組織の侵入によりかえって骨再生が妨げられること、連通孔は骨の断端を結ぶように作成すると良いことを明らかにした。成長因子の一つである FGF2 を搭載した人工骨を作製し、ビーグル犬の頭蓋骨欠損（径 2 cm）に埋植したところ、高濃度の生理活性物質を投与した群で、放射線学的、組織学的に良好な骨形成が確認された。

テトラポッド型人工骨に関しては、射出成型により製造した、均一な形状とサイズを持つ人工骨を作成した。この人工骨は、多孔体ブロックを粉砕して作った、従来用いられてきた形状もサイズも不均一な人工骨に比して、細胞や血管が侵入するのに都合の良い粒

子間構造を持っていることを明らかにした。粒子間構造は、これまで直接評価されたことはなく、Mercury Porosimetry や 2 次元画像から間接的に推定されてきたため、実際には細胞や血管がはいりこむことのできない構造まで過大に評価されていた。今回、正確に 3 次的に評価するために、50~600 マイクロメートルの高分子性球状粒子を疑似細胞として用いることで、初めて細胞や血管にとって意義のある粒子間構造を 3 次的に評価することができた。また、欠損部に埋植した際の強度を計測し、従来の人工骨よりも初期強度が高いことを明らかにした。

②バイオセンサーにより骨形成性低分子化合物を同定した。いくつかの低分子化合物を同定した。それらの作用機序の分子生物学的解析を行い、BMP 依存性の骨誘導効果があることを明らかにした。

同定した薬物をリン酸カルシウム製人工骨に付与する際の最適な送達制御法に関しては、低分子化合物においては、とくに DDS を用いずとも、薬物は人工骨に担持され、1 週間から 1 ヶ月の時間で徐放されることが明らかになった。

同定した低分子化合物の中でも、ヘッジホッグシグナル作動薬 SAG が主に骨芽細胞の初期分化を、ヘリオキサンチン誘导体である TH が主に骨芽細胞の後期分化を誘導することに着目し、SAG と TH を組み合わせ、未分化細胞を刺激することを着想した。その結果、両者を組み合わせることで、単独の場合を大きく凌駕する、きわめて強力な骨誘導能力を持つことが明らかになった。小動物での効果を確認した。

③インクジェットプリンターを用いて、生理活性物質を適切な送達システムとともに望みの位置に望みの量噴霧した人工骨の作製を試みた。作製した人工骨に関して、マウスを用いた実験による安全性・有効性の検証を継続して行った。C57BL/6 マウス頭蓋骨臨界骨欠損（直径 5 mm）に埋植し、その骨誘導性、生体親和性、免疫反応について血液生化学的、組織学的、放射線学的に評価した。埋植 1、2、3 週後、1、2、4、6 ヶ月後に安楽殺し、血液生化学的検討と埋入部の肉眼的及び放射線学的（X 線、CT）評価とともに、組織切片（脱灰及び非脱灰）を作製して HE 染色、von Kossa 染色、I 型コラーゲン・オステオカルシン免疫染色などで骨再生を評価したが、良好な骨再生誘導が見られた。ビーグル犬の頭蓋骨欠損（径 2 cm）を作成して人工骨を埋植したところ、高濃度の生理活性物質を投与した群で良好な結果が得られた。

オーダーメイド型人工骨の臨床治験が終了し、データ解析も終わった。現在、オープンデバイスとしての承認申請をするために、厚生労働省および PMDA との協議を行っている

る。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 68 件、全て査読有)

1. Choi S, Lee J, Igawa K, Suzuki S, Mochizuki M, Nishimura R, Chung U, Sasaki N. Effect of trehalose coating on basic fibroblast growth factor release from tailor-made artificial bone implant. *J Vet Med Sci* 73:1547-1552, 2011.
2. Akagi Y, Katashima T, Katsumoto Y, Fujii K, Matsunaga T, Chung U, Shibayama M, Sakai T. Examination of the theories of rubber elasticity using an ideal polymer network. *Macromolecules* 44:5817-5821, 2011.
3. Yonezawa T, Lee J, Hibino A, Asai M, Hojo H, Ha B, Teruya T, Nagai K, Chung U, Yagasaki K, Woo J. Harmine promotes osteoblast differentiation through bone morphogenetic protein signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 409:260-265, 2011.
4. Li X, Tsutsui Y, Matsunaga T, Shibayama M, Chung U, Sakai T. Precise control and prediction of hydrogel degradation behavior. *Macromolecules* 44:3567-3571, 2011.
5. Matsunaga T, Asai H, Akagi Y, Sakai T, Chung U, Shibayama M. SANS Studies on Tetra-PEG Gel under Uniaxial Deformation. *Macromolecules* 44:1203-1210, 2011.
6. Saijo H, Kanno Y, Mori Y, Suzuki S, Ohkubo K, Chikazu D, Yonehara Y, Chung U, Takato T. A novel method for designing and fabricating custom-made artificial bones. *Int J Oral Maxillofac Surg* 40:955-960, 2011.
7. Hashimoto Y, Takasu M, Kawamoto S, Oda T, Nagao H, Sakai T, Chung U. Structure and dynamics of tetra-PEG gel by Brownian dynamics. *Trans Mater Res Soc Japan* 35:547-553, 2010.
8. Sakai T, Matsunaga T, Akagi Y, Kurakazu M, Chung U, Shibayama M. Highly elastic and deformable hydrogel formed from tetra-arm polymers. *Macromolecular Rapid Commun* 31:1954-1959, 2010.
9. Hojo H, Ohba S, Yano F, Chung U. Coordination of chondrogenesis and osteogenesis by hypertrophic chondrocytes in endochondral bone development. *J Bone Miner Metab* 28:489-502, 2010.
10. Saito T, Fukai A, Mabuchi A, Ikeda T, Yano F, Ohba S, Nishida N, Akune T, Yoshimura N, Nakagawa T, Nakamura K, Tokunaga K, Chung U, and Kawaguchi H. Transcriptional regulation of endochondral ossification by HIF2A during skeletal growth and osteoarthritis development. *Nature Med* 16:678-683, 2010.
11. Fukasawa M, Sakai T, Chung U, Haraguchi K. Synthesis and mechanical properties of a nanocomposite gel consisting of a tetra-PEG/clay network. *Macromolecules* 43:4370-4378, 2010.
12. Mori Y, Yano F, Shimohata S, Suzuki S, Chung U, Takato T. Trehalose inhibits oral xerosis by protecting cell membrane. *Int J Oral Maxillofac Surg* 36:916-921, 2010.
13. Nakajima K, Komiyama Y, Hojo H, Ohba S, Yano F, Nishikawa N, Aburatani H, Takato T, Chung U. Enhancement of bone formation ex vivo and in vivo by a helioxanthin-derivative. *Biochem Biophys Res Commun* 395:502-508, 2010.
14. Fröhlich LF, Mrakovcic M, Steinborn S, Chung U, Bastepe M, Jüppner H. Targeted deletion of the Nesp55 DMR provides evidence for another principal imprinting control region within Gnas and a mouse model of autosomal dominant pseudohypoparathyroidism type Ib. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:9275-9280, 2010.
15. Hojo H, Yano F, Ohba S, Igawa K, Nakajima K, Komiyama Y, Ikeda T, Yonezawa T, Woo J, Takato T, Nakamura K, Kawaguchi H, Chung U. Oxytetracycline induces chondrogenic differentiation without promoting terminal differentiation. *J Bone Miner Metab* 28:489-502, 2010.
16. Kurakazu M, Katashima T, Chijiishi M, Nishi K, Akagi Y, Matsunaga T, Shibayama M, Chung U, Sakai T. Evaluation of gelation kinetics of Tetra-PEG gel. *Macromolecules* 43:3935-3940, 2010.
17. Kimura A, Inose H, Yano F, Fujita F, Ikeda T, Sato S, Iwasaki M, Jinno T, Ae K, Fukumoto S, Takeuchi Y, Itoh H,

- Imamura T, Kawaguchi H, Chung U, Martin JF, Iseki S, Shinomiya K, Takeda S. Runx1 and Runx2 cooperate during sternum morphogenesis. *Development* 137:1159-1167, 2010.
18. Akagi Y, Matsunaga T, Shibayama M, Chung U, Sakai T. Evaluation of topological defects in Tetra-PEG gels. *Macromolecules* 43:488-493, 2010.
 19. Fukai A, Kawamura N, Saito T, Oshima Y, Ikeda T, Kugimiya F, Higashikawa H, Yano F, Ogata N, Nakamura K, Chung U, Kawaguchi H. Akt1 in chondrocytes controls cartilage calcification during endochondral ossification under physiological and pathological conditions. *Arthritis Rheum* 62:826-836, 2010.
 20. Shinoda Y, Kawaguchi H, Higashikawa A, Nakamura K, Chung U, and Ogata N. Mechanisms underlying catabolic and anabolic functions of parathyroid hormone on bone by combination of culture systems of mouse cells. *J Cell Biochem* 109:755-763, 2010.
 21. Zhao J, Ohba S, Komiyama Y, Shinkai M, Chung U, Nagamune T. Icariin: A potential osteoconductive compound for bone tissue engineering. *Tissue Eng Part A* 16:233-243, 2010.
 22. Lee S, Miwa Y, Nishimura R, Chung U, Suzuki S, Sasaki N. Effects of trehalose and sodium carboxymethyl cellulose on prevention of organ adhesion after laparotomy: a preclinical study. *Jpn J Vet Anesth Surg* 40:19-26, 2009.
 23. Choi SJ, Lee JI, Igawa K, Sugimori O, Suzuki S, Mochizuki M, Nishimura R, Chung UI, Sasaki N. Bone regeneration within a tailor-made tricalcium phosphate bone implant with both horizontal and vertical cylindrical holes transplanted into the skull of dogs. *J Artif Organs* 12:274-7, 2009.
 24. Matsunaga T, Sakai T, Akagi Y, Chung U, Shibayama M. SANS and SLS Studies on Tetra-Arm PEG Gels in As-prepared and Swollen States. *Macromolecules* 42:6245-6252, 2009.
 25. Saijo H, Kanno Y, Igawa K, Mori Y, Kondo K, Shimizu K, Suzuki S, Chikazu D, Iino M, Sasaki N, Anzai M, Chung U, Takato T. Maxillofacial reconstruction using custom-made artificial bones fabricated by inkjet printing technology. *J Artif Organs* 12:200-205, 2009.
 26. Matsunaga T, Sakai T (Co-first), Akagi Y, Chung U, Shibayama M. Structure characterization of Tetra-PEG Gel by Small-angle Neutron Scattering. *Macromolecules* 42:1344-51, 2009.
 27. Adams GB, Alley IR, Chung U, Chabner KT, Marsters ES, Chen M, Weinstein LS, Kronenberg HM, Scadden DT. Haematopoietic stem cells depend on G α s-mediated signalling to engraft bone marrow. *Nature* 459:103-7, 2009.
 28. Kan A, Ikeda T, Saito T, Yano F, Ogata N, Nakamura K, Chung U, Kawaguchi H. Screening of Chondrogenic Factors by a Real-Time Fluorescence Monitoring Cell Line ATDC5-C2ER: Identification of Sorting Nexin 19 as a Novel Factor. *Arthritis Rheum* 60:3314-3323, 2009.
 29. Ushita M, Saito T, Ikeda T, Yano F, Higashikawa A, Ogata N, Chung UI, Nakamura K, Kawaguchi H. Transcriptional induction of SOX9 by NF- κ B family member RelA in chondrogenic cells. *Osteoarthritis Cartilage* 17:1065-1075, 2009.
 30. Wang W, Itaka K, Ohba S, Nishiyama N, Chung U, Yamasaki Y, Kataoka K. 3D spheroid culture system on micropatterned substrates for improved differentiation efficiency of multipotent mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 30:2705-15, 2009.
 31. Yamamoto K, Igawa K, Ueno H, Yano F, Chung U, Koshima I. Temporal and spatial changes in element distribution in bone and cartilage. *J Orthop Sci* 14:190-203, 2009.
 32. Zhao J, Shinkai M, Takezawa T, Ohba S, Chung U, Nagamune T. Bone Regeneration Using Collagen Type I Vitrigel with Bone Morphogenetic Protein-2. *J Biosci Bioeng* 107:318-323, 2009.
 33. Higashikawa A, Saito T, Ikeda T, Kamekura S, Kawamura N, Kan A, Oshima Y, Ohba S, Ogata N, Nakamura K, Chung U, Kawaguchi H. Identification of the core element responsive to Runx2 in the promoter of human type X collagen gene. *Arthritis Rheum* 60:166-178, 2009.
 34. Hirata M, Kugimiya F, Ohba S, Kawamura N, Ogasawara T, Kawasaki Y, Fukai A, Ikeda T, Nakamura K, Chung UI, Kawaguchi H. C/EBP β promotes transition from proliferation to

- hypertrophic differentiation of chondrocytes through transactivation of p57Kip2. *PLoS ONE* 4:e4543, 2009.
35. Sakai T, Matsunaga T, Yamamoto Y, Ito C, Yoshida R, Sasaki N, Suzuki S, Shibayama M, Chung U. Design and fabrication of a high-strength hydrogel with ideally homogeneous network structure from tetrahedron-like macromonomers. *Macromolecules* 41:5379-84, 2008.
 36. Hojo H, Igawa K, Ohba S, Yano F, Nakajima K, Komiyama Y, Ikeda T, Lichtler AC, Woo J-T, Yonezawa T, Takato T, Chung U. Development of high-throughput screening system for osteogenic drugs using a cell-based sensor. *Biochem Biophys Res Commun* 376:375-379, 2008.
 37. Oshima Y, Akiyama T, Hikita A, Iwasawa M, Nagase Y, Nakamura M, Wakeyama H, Kawamura N, Ikeda T, Chung U, Hennighausen L, Kawaguchi H, Nakamura K, Tanaka S. Pivotal role of Bcl-2 family proteins in the regulation of chondrocyte apoptosis. *J Biol Chem* 283:26499-508, 2008.
 38. Shinoda Y, Ogata N, Higashikawa A, Manabe I, Shindo T, Yamada T, Kugimiya F, Ikeda T, Kawamura N, Kawasaki Y, Tsushima K, Takeda N, Nagai R, Hoshi K, Nakamura K, Chung UI, and Kawaguchi H: Kruppel-like factor 5 causes cartilage degradation through transactivation of matrix metalloproteinase 9. *J Biol Chem* 283:24682-9, 2008.
 39. Kawasaki Y, Kugimiya F, Chikuda H, Kamekura S, Ikeda T, Kawamura N, Saito T, Shinoda Y, Higashikawa A, Yano F, Ogasawara T, Ogata N, Hoshi K, Hofmann F, Woodgett JR, Nakamura K, Chung U, Kawaguchi H. Phosphorylation of GSK-3 β by cyclic GMP-dependent protein kinase II promotes chondrocyte hypertrophy and skeletal growth. *J Clin Invest* 118: 2506-2515, 2008.
 40. Wu S, Nishiyama N, Kano MR, Morishita Y, Miyazono K, Itaka K, Chung UI, Kataoka K. Enhancement of Angiogenesis Through Stabilization of Hypoxia-inducible Factor-1 by Silencing Prolyl Hydroxylase Domain-2 Gene. *Mol Ther* 16:1227-34, 2008.
 41. Ohba S, Kawaguchi H, Kugimiya F, Ogasawara T, Kawamura N, Saito T, Ikeda T, Fujii K, Miyajima T, Kuramochi A, Miyashita T, Oda H, Nakamura K, Takato T, Chung U. Patched1 haploinsufficiency increases adult bone mass and modulates Gli3 repressor activity. *Dev Cell* 14:689-699, 2008.
 42. Yamakawa K, Kamekura S, Kawamura N, Saegusa M, Kamei D, Murakami M, Kudo I, Uematsu S, Akira S, Chung U, Nakamura K, Kawaguchi H. Association of microsomal prostaglandin E synthase 1 deficiency with impaired fracture healing, but not with bone loss or osteoarthritis, in mouse models of skeletal disorders. *Arthritis Rheum* 58:172-183, 2008.
 43. Zhao J, Shinkai M, Ohba S, Chung U, Nagamune T. Icarin induce osteoblastic differentiation in vitro by a BMP and runx2 pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 369:444-448, 2008.
 44. Jang K, Sato K, Igawa K, Chung U, Kitamori T. Development of an osteoblast cell-based 3D continuous perfusion microfluidic system for drug screening. *Analytical Bioanalytical Chemistry* 390:825-832, 2008.
- 他 24 件
- [学会発表] (計 45 件)
- ①Hosaka Y, Saito T, Sugita S, Fukai A, Hikata T, Akiyama H, Nakamura T, Nakamura K, Chung UI, Kawaguchi H. Notch/Rbpj/Hes1 signal in chondrocytes modulates terminal stage of endochondral ossification during skeletal growth and osteoarthritis development. 33th annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR). 2011. 9.16-20 San diego, America
 - ②Ito S, Saito T, Hirata M, Ushita m, Ikeda T, Nakamura K, Chung UI, Kawaguchi H. GSK-3 \cdot and GSK-3 \cdot modulate early stages of chondrocytes differentiation through phosphorylation of RelA/NF- κ B p65. 2011 World Congress on Osteoarthritis (OARSI) 2011. 9.15-18 San diego, America
 - ③Fukai A, Kawamura N, Saito T, Oshima Y, Ikeda T, Yano F, Ogata N, Nakamura K, Chung UI, Kawaguchi H. Akt in chondrocytes controls cartilage calcification during skeletal growth and osteophyte formation in osteoarthritis. 56 th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society (ORS) 2010. 3.6-9 New Orleans, Louisiana, USA

④Hirata M, Kugimiya F, Fukai A, Saito T, Yano F, Ikeda T, Nakamura K, Chung UI, Kawaguchi H. Molecular network on the C/EBP-beta axis including Runx2, MMP13, and HIF2A controls osteoarthritis development. 2010 World Congress on Osteoarthritis (OARSI) 2010. 9.23-26 Brussels, Belgium

⑤ Chung U. Signaling factors coordinating chondrogenesis and osteogenesis in endochondral bone development. The 26th Naito Conference on Osteobiology. Hyogo, November 4-7, 2009

⑥酒井崇匡、松永拓郎、柴山充弘、鄭 雄一。均一構造を有する tetra-PEG ゲルの構造解析。第 20 回高分子ゲル研究討論会、東京、2009. 1. 15

⑦矢野文子、池田敏之、斎藤琢、緒方直史、木村文子、竹田秀、中村耕三、高戸毅、川口浩、鄭雄一。新規低分子化合物チエノインダゾール誘導体は Runx1 と Sox trio を介して永久軟骨再生を誘導する。第 26 回日本骨代謝学会 大阪国際会議場、大阪 2008. 10 29-31 (口頭発表、優秀演題賞 (基礎系)、IBMS-ANZBMS Meeting Travel Award 2009)

⑧F. Yano, T. Ikeda, T. Saito, N. Ogata, K. Nakamura, T. Takato, H. Kawaguchi, U. Chung. A novel small thienoindazole-derivative compound promotes chondrogenic differentiation without inducing hypertrophy through production of Runx1. 2008 OARSI (The Osteoarthritis Research Society International) World Congress on Osteoarthritis, Roma, Italy, 2008. 9 18-21 (口頭発表、Young Investigator Award)
他 37 件

[図書] (計 6 件)

①鄭 雄一『図解 骨博士が教える「老いない体」のつくり方 実践編』(単著)、ワック株式会社、2011、全 111 頁

②鄭 雄一『骨博士が教える「老いない体」のつくり方』(単著) ワック株式会社、2010、全 180 頁
他 4 件

[産業財産権]

○出願状況 (計 16 件)

名称：人工骨構成ユニット及び人工骨構成システム

発明者：鄭 雄一 他

権利者：東京大学 他

種類：特許

番号：PCT/JP2010/004690

出願年月日：2010年7月22日

国内外の別：国外
他 15 件

○取得状況 (計 3 件)

名称：組織癒着防止液及び組織癒着防止方法

発明者：鄭 雄一 他

権利者：東京大学 他

種類：特許

番号：4447640

取得年月日：2010年7月27日

国内外の別：国内

他 2 件

[その他]

ホームページ等

www.tetrapod.t.u-tokyo.ac.jp

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鄭 雄一 (TEI YUICHI)

東京大学・大学院工学系研究科・教授

研究者番号：30345053

(2) 研究分担者

酒井 崇匡 (SAKAI TAKAMASA)

東京大学・大学院工学系研究科・教授

研究者番号：70456151

(3) 連携研究者 なし