

MATERIAL TECHNOLOGY

材料技術



November-December

2021

Vol. 39, No. 6

ISSN 0289-7709

CODEN: MTECFQ

材料技術研究協会

Japan Research Institute of
Material Technology

<https://www.jrint.jp>

Contents

<Articles>

Basic study of alarm sounds of electronic medical devices focusing on frequencies based on auditory characteristics

聴覚的感受性に基づく周波数に着目した医療機器オリジナルアラーム音の基礎検討

Takahiro Wabe, Akimitu Fujii, Yuma Ambiru, Manon Igarashi, Takanori Kunishi,
Ryuhei Shimizu, Kazuki Harada, Yuhei Abe, Hiroteru Okoshi, Aika Suzuki, Jun Hatano,
Keisuke Hirata59

6,6'-Bis(*O*-4-pyren-1-yl-ethynylbenzoyl)- α,α -trehalose (aryl-substituted trehalose) activates the NF- κ B signaling pathway and is an effective fluorescent probe for cell imaging in HeLa CD4⁺ cells

Rumiko Saito, Takanobu Nakayama, Kahoko Hashimoto, Naoko Miyano-Kurosaki64

<報告>

2021年度 材料技術研究協会討論会報告

討論会委員会 委員長 酒井 秀樹73

<Editorial Note>

2021年度 統合版の発行に寄せて76

聴覚的感受性に基づく 周波数に着目した医療機器オリジナルアラーム音の基礎検討

和部 崇洋^{a,b}, 藤井 昭光^b, 安晝 佑真^b, 五十嵐真音^b, 國司剛典^b, 清水竜平^b,
原田一希^b, 阿部雄平^b, 大越啓央^b, 鈴木愛華^b, 波田野純^b, 平田圭祐^b

Basic study of alarm sounds of electronic medical devices focusing on frequencies based on auditory characteristics

Takahiro Wabe^a, Akimitu Fujii^b, Yuma Ambiru^b, Manon Igarashi^b, Takanori Kunishi^b,
Ryuhei Shimizu^b, Kazuki Harada^b, Yuhei Abe Hiroteru Okoshi^b, Aika Suzuki^b, Jun Hatano^b, Keisuke Hirata^b

Abstract

Incidents and accidents related to alarm sounds of electronic medical devices used in hospitals are increasing every year. It has been reported that the cause is alarm fatigue (including carelessness due to becoming accustomed to the alarms) by the medical staff involved in the hospital department where the total time for the alarming sound exceeds ten hours per day. Alarm fatigue commonly occurs, and responding to alarms and improving the systematic hospital environment are difficult in such situations. As such, in the medical field, countermeasures against these problems are urgently required. Accordingly, the purpose of this study was to make a prototype of an original alarm sound that medical staff can react to even in a hospital environment where alarm fatigue occurs or where it may occur. The alarm sound of medical device is specified by JIS, but in order to draw more attention, in this study, we prototyped an alarm sound based on auditory sensitivity such as maximum audible frequencies and unpleasant audible frequencies. From a questionnaire given to 85 people, we selected notable maximum audible frequencies (3kHz, 4kHz, 4.5kHz, 5kHz, 5.5kHz) and unpleasant audible frequencies (11kHz, 12kHz, 13kHz, 14kHz, 15kHz) and prototyped the original alarm sound. A questionnaire and an electroencephalograph were used to evaluate the original alarm sound. As a result, we were able to prototype an original alarm sound that attracts more attention than the existing alarm sound.

Keywords : Medical device alarm sound; Alarm fatigue; Maximum audible frequency;
Discomfort audible frequency; Auditory characteristics

Received November 25, 2021; accepted February 1, 2022

a Teikyo University of Science, Department of Life & Health Sciences, Faculty of Life & Environmental Sciences, 2-2-1 Senjyusakuragi, Adachi-ku, Tokyo, 120-0045, Japan

b Tokyo college of Medico-Pharmaco Technology, 2-11-1 Higashikasai, Edogawa-ku, Tokyo, 134-0084, Japan

a 帝京科学大学 生命環境学部生命科学科 (〒120-0045 東京都足立区千住桜木 2-2-1)

b 東京医薬専門学校 (〒134-0084 東京都江戸川区東葛西 6-5-12)

1 緒言

医療事故の報告件数は年々、増加の一途を辿っている¹⁾。そのなかで、病院で用いられる電子医療機器に関するアクシデント・インシデントも発生件数も伸びている。電子医療機器は、生理学的モニタリング、生命維持管理装置、治療機器と多岐に渡って医療に関わっているため、事故防止措置は高いレベルで施されている。そのなかの一つに、異常事態を知らせるアラームが存在する。反面、アラーム音による医療事故（インシデントも含む）は、頻繁に発生しているのが現状である。原因としては、アラーム音の見過ごしがあり、緊急事態への対応を遅らせてしまう²⁾。アラーム見過ごしが発生する理由としてはアラーム発生時間が1日の43.7%にもなるような集中治療室でのアラーム疲労（アラームへの慣れによる不注意も含む）によるものだと考えられている³⁾。アラーム疲労とは、過度のアラームが鳴る環境（一種の騒音下）を経験した結果として、医療従事者のアラームへの応答時間の延長や、アラームに対する応答率の低下が発生することを指す。アラーム疲労になるのは一般的であり、病院環境が深く関わっていると言われている。日頃より余りにも時間的に多すぎるアラームに医療スタッフの感覚が麻痺することが原因だとされている。注意するにも、アラーム疲労がおこるような状況では、アラーム対応が極めて難しいとされ、アラーム疲労を組織的に軽減する研究もなされている^{4,5)}。しかし、組織的に病院環境の改善は、即座に行うには難しく、医療現場において、これらの問題への対策が急務で求められている。そこで、本研究で着目したのがアラーム音の改善である。アラーム音は、JISにより規定されている。

JISには、アラーム信号の周波数範囲（200 Hz～5 kHz）について、推奨範囲（500 Hz～3 kHz）について記されている。また、大きな病棟のように、遠距離からでもアラーム信号が聞こえる

必要がある場合の周波数（1 kHz 以下）や、障害物又は間仕切りがある場合（500 Hz 以下）などの推奨周波数範囲も示されている⁶⁾。しかし、JIS規格の基となったIEC規格については識別が難しいなどの報告もされているため^{7,8)}、必ずしもJIS規格のアラーム音が上記の諸問題により、気づき難くなった場合に有効的とは言えない。そこで、本研究では、アラーム疲労が起こるような病院環境においても、既存のアラームより、強制力が強く働き意識がアラームに向くようなオリジナルアラーム音の試作を目的とした。オリジナルアラーム音の試作に際しては、患者の負担になるような音量をあげるといった対処法ではなく、周囲環境の変化が起きても、注意を促せるように聴覚的感受性に基づくオリジナルアラーム音試作を目指した。

2 実験方法

2.1 最大可聴・不快感可聴周波数の特定

騒音のなかでも、人の注意を引き付ける不快音に着目してオリジナルアラーム音を試作する。注意を引き付ける音として聴覚的感受性に着目して、人が不快に感じる音（不快感可聴周波数）と、人に聞こえやすい音の周波数（最大可聴周波数）を探った。dBで表現される音圧は単純に音（振動）の大きさを表すが、人間には周波数によって音圧が小さくても「大きく聞こえる音」と、音圧が大きくとも「小さく聞こえる音」が存在する。この感覚的な音の聞こえ方をラウドネスという。ちなみに、赤ん坊の泣き声や、女性の悲鳴、家電製品は2 kHz～4 kHzの周波数を用いている。不快感可聴周波数と、最大可聴周波数を探るために可聴領域の周波数である20 Hz～20 kHzの間で周波数を30段階に分けて、模擬アラーム音を発生させ、85名に聞き取り調査を行った。聞き取り調査には、アンケートを用いた。聞き取り調査の環境はFig.1の通りである。音源（スピーカー）から70cm

離れた場所に椅子を置き、耳と音源の高さが同じになるように椅子の高さを調整した (80 cm). 測定時には、院内を想定しているので、騒音を別のスピーカーから流した. 騒音は院内の雑然とした状況時に測定した音圧と同じ約 60dB として、アラーム音源は 75dB とした. 再生にはフリーソフトの Audacity を用いた. なお、JIS を参考に、強度の基準を 20 μ Pa としている.

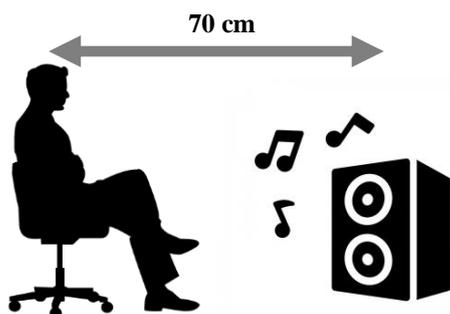


Fig.1 Interview survey environment

2.2 最大可聴・不快感可聴周波数を組み合わせたオリジナルアラーム音試作

アラームには様々な種類の音が扱われているが、パルス音は記憶、識別が容易でないと報告されている⁹⁾. そこで、本研究では、周波数の合成ソフトを用いて、メロディを作成する. 本実験では、合成ソフトの上限である三種類の周波数を一音 (和音) として、三音組み合わせでオリジナルアラーム音 (メロディ) とした. メロディ (時間的に連続して的变化する音) はメッセージ性を持たせることができ、パルス音と比較すると印象に残りやすいことを、科学的に証明されているわけではないが、作曲家たちは経験的に理解している. 2.1 節同様に 85 名にアンケートを取り、より注意を引く和音を特定した. 三種類の周波数には、最大可聴周波数を一種類、不快感可聴周波数を二種類で構成したため、組み合わせた周波数は 50 種類以上となった. 合成ソフトには、Wave Gene Ver1.5 sz0 を用いた. 周波数の組み合わせにはフリー

ソフト (再生: Audacity) を使用してアラーム音を作成した.

2.3 既存のアラーム音との比較

2.2 節で特定したオリジナルアラーム音と既存のアラームを比較した. 院内で使用頻度の高いシリンジポンプ TE-351 (テルモ株式会社)、重要パラメータ付き多項目モニタ (ベッドサイドモニタ) CSM-1701 (日本光電工業株式会社) を比較対象とした. 評価には脳波を用いて、測定には脳波計 EEG-1250 (日本光電工業株式会社) を使用した. 仕様は以下の通りである (Sensitivity=10 μ V, Time Constant=0.1s, High pass Filter=35 Hz). 脳波は、ストレス波とも呼ばれている β 波までを対象とした. なお、HF は余裕を持って 35 Hz とした. 脳波測定に使用するヘッドギアは、AE-120A (日本光電工業株式会社) を用いた. 脳波のチャンネル数は 10 チャンネルである (F3-0V, C3-0V, O1-0V, T3-0V, F4-0V, C4-0V, O2-0V, T4-0V, F3-T3, T3-O1, F3-C3, C3-O1, F4-T4, T4-O2, F4-C4, C4-O2). 被験者は、既存医療機器のアラーム音を聞きなれていない 12 名とした.

3 結果及び考察

3.1 最大可聴・不快感可聴周波数の特定

アンケート結果を Fig.2 に示す. 緑のグラフを最大可聴周波数として、黒いグラフを不快感可聴周波数とした. 特にアンケートの結果が高い周波数を赤い丸で括った. さらに、上位 5 つの周波数を Table1 に記した. Table1 の赤字はアンケート結果が最も高い周波数である.

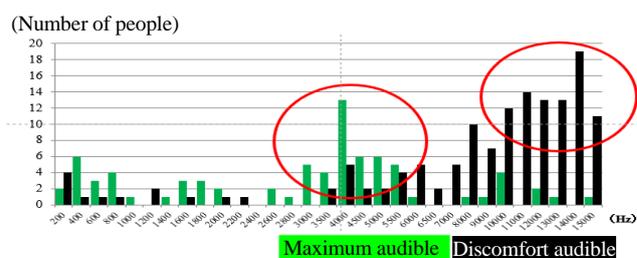


Fig.2 Questionnaire results on maximum audible and unpleasant audible frequencies

Table1 Questionnaire results on maximum audible and unpleasant audible frequencies (top 5)

Maximum audible (kHz)	3	4	4.5	5	5.5
Discomfort audible (kHz)	11	12	13	14	15

3.2 オリジナルアラーム試作のための周波数組み合わせ特定

Table1 からの周波数の組み合わせ 50 種類に対してアンケートを取り，注意を引く上位 3 音が Table2 の通りとなった。

Table2 Top3 sound combinations based on Table1

	1	2	3
Maximum audible frequency	4	5	4.5
Discomfort audible frequency①	11	14	1.4
Discomfort audible frequency②	13	15	1.5

(kHz)

3.3 既存のアラーム音との比

Table2 の 3 音を Fig.3 の通りに組み合わせてオリジナルアラーム音とした。それぞれのアラーム音は 0.20s 流し，各アラーム音に 0.05s の間隔を設けて，これを繰り返した。

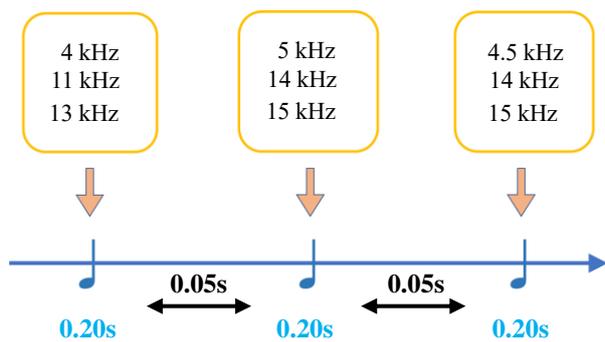


Fig.3 Original alarm

リラックス時，シリンジポンプ，ベッドサイド，オリジナルの各アラーム音の脳波の振幅と周波数を測定した。測定結果の一例を Fig.4 に示す。また，それぞれの平均値を Table3 に記す。

振幅 ($\mu\text{Vp-p}$)，周波数 (Hz) とともに既存の医療機器のアラーム音よりオリジナルアラームが高くなっており，周波数においては， β 波の周波数帯域に入っている。オリジナルアラームが聞こえやすく，注意が向きやすいアラーム音であると考えられる。

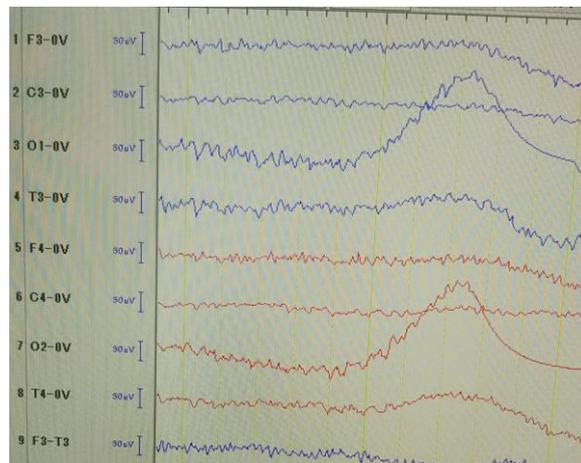


Fig.4 An example of measurement results (brain waves)

Table3 Comparison of original alarm and existing medical device alarm

	Relax	Syringe pump	Bed side monitor	Original alarm
Amplitude($\mu\text{Vp-p}$)	24.5	29.5	33.6	40.2
Frequency(Hz)	6.4	10.6	13.38	16.8

4 結言

JIS による規定を考慮せず，オリジナルアラーム音を試作した。聞き取りや脳波図から，騒音化で既存のアラーム音よりオリジナルアラーム音が注意を引くことが分かった。本報告では，病院内の環境を模擬したが，今後は，実際にアラーム疲労の医療従事者からの評価を基に，オリジナルアラームの改善を行う。

参考文献

- 1) 中村美香，近藤浩子，岩永喜久子，今井裕子，杉田歩美，須川美枝子，永井弥生，北

- 関東医学会, 66 (4), 279 (2016).
- 2) 岩井完, 浅田真弓, 梶谷篤, *日外会誌*, 117 (6), 536 (2016).
 - 3) 中村恭子, 廣瀬稔, *Clinical Engineering*, 9 (22), 859 (2011).
 - 4) R. J. Keith, J. P. Bliss, *APSF Newsletter*, 34 (1), 5 (2019).
 - 5) K. C. Graham, M. Cvach, *Crit Care*, 19, 28 (2010).
 - 6) 日本工業標準調査会, *JIS T 0601-1-8:2017 医用電気機器—第1部: 基礎安全及び基本性能に関する一般要求事項* (2017).
 - 7) A. N. Wee, P. Sanderson, *Technology Computing and Simulation*, 106 (2), 501 (2008).
 - 8) P. Lacherez, E. L. Seah, P. Sanderson, *Human Factors*, 49 (4), 637 (2007).
 - 9) Y. K. Leung, S. Smith, S. Parker, *Proceedings of 4th International conference of auditory display, ICAD* (1997).

6,6'-Bis(*O*-4-pyren-1-yl-ethynylbenzoyl)- α,α -trehalose
(aryl-substituted trehalose) activates the NF- κ B signaling pathway
and is an effective fluorescent probe for
cell imaging in HeLa CD4⁺ cells

Rumiko Saito¹⁾, Takanoobu Nakayama²⁾, Kahoko Hashimoto ^{1),2)}, and Naoko Miyano-Kurosaki ^{1),2)}*

Abstract

Cell imaging is expected to contribute not only to basic life science research but also to clinical diagnosis, treatment, and drug discovery as a method for exploring and interpreting biological phenomena. We have shown that 6,6'-bis(*O*-4-pyren-1-yl-ethynylbenzoyl)- α,α -trehalose (aryl-substituted trehalose) is taken up by HeLa CD4⁺ cells, a human cervical cancer cell line, and shows bright green luminescence. In this study, we evaluated the effect of aryl-substituted trehalose on HeLa CD4⁺ cells and its utilization as a cell imaging material. An analysis of the change in intracellular fluorescence of aryl-substituted trehalose over time by fluorescence microscopy revealed uptake by HeLa CD4⁺ cells and fluorescence signals in the cytoplasm. The number of cells incorporating aryl-substituted trehalose was higher at 48 h than at 24 h after the addition. Aryl-substituted trehalose did not affect cell cycle progression in HeLa CD4⁺ cells. It was suggested that aryl-substituted trehalose is taken up into cancer cells via glucotransporter in the same way as glucose uptake. Aryl-substituted trehalose is not taken up by normal cells but is specifically taken up by cancer cells, so it may be used for detection of cancer cells.

Keywords : Aryl-substituted trehalose, Cancer cells, Cell imaging material

Received October 5, 2021; accepted November 5, 2021

1) Department of Life and Environmental Sciences, Graduate School of Engineering, Chiba Institute of Technology, 2-17-1 Tsudanuma, Narashino, Chiba 275-0016, Japan

2) Department of Life Sciences, Faculty of Advanced Engineering, Chiba Institute of Technology 2-17-1, Tsudanuma, Narashino, Chiba 275-0016, Japan.

*Corresponding author: Naoko Miyano-Kurosaki, Department of Life and Environmental Sciences, Graduate School of Engineering, Chiba Institute of Technology, 2-17-1 Tsudanuma, Narashino, Chiba 275-0016, Japan

E-mail: kurosaki.naoko@p.chibakoudai.jp

1 Introduction

Bioimaging technology has become an important tool in the field of biomedicine for the multidimensional visualization of biomolecules, cells, tissues, and organisms^{1,2}). The visualization of biological phenomena is a focus of disease research and is providing new insights into the etiology of diseases^{3,4}). In particular, fluorescence bioimaging, in which fluorescence is imparted to the target substance for visualization, is an indispensable technique in biomedical research^{3,5}). For the further development of fluorescence bioimaging technology, it is important to clarify correlations between the molecular structure of imaging materials and optical properties, toxicity, and bioactivity⁵).

Fluorescent molecules used in cell imaging include those based on small organic fluorescent molecules and those based on fluorescent proteins, such as green fluorescent protein^{6,7}). Imaging with fluorescent proteins requires gene transfer for expression in living cells⁸). Small organic fluorescent substances benefit from their ability to be quickly introduced into all cells simply via extracellular fluid⁹).

The design conditions for organic fluorescent small molecule-based imaging materials include a lack of cytotoxicity and high water solubility to ensure *in vivo* compatibility and hydrophobicity for the permeation of cell membranes¹⁰). Many organic fluorescent molecules are hydrophobic, which can result in various issues, including aggregation and precipitation in extracellular fluid, emphasizing the importance of water solubility.

Against this background, multiple cell imaging techniques in which sugars are complexed with fluorescent molecules have been reported. Hsu *et al.* reported that cell glycans incorporating hyperacetylated alkynyl fucose and *N*-acetylmannosamine by azide-alkyne click chemistry with 3-azido-7-hydroxycoumarin function as

fluorescent molecules to label and visualize intracellular complex sugars¹¹). Barattucci *et al.* reported that dimethylamino-substituted oligo (phenylene ethynylene) glucosides act as efficient biocompatible fluorescent probes^{12,13}). Ribagorda *et al.* found that dimethylamino-oligo glucoside derivatives have photophysical properties, such as high quantum yield, singlet oxygen production, biocompatibility, stability, easy intracellular internalization, and very good responsiveness; they can be utilized as photosensitizers for photodynamic therapy¹⁴). In addition, Park *et al.* monitored the fluorescence intensity of cells treated with glucosamine-modified silicone rhodamine to efficiently distinguish between cancer cells and normal cells¹⁵). Therefore, combinations of fluorescent molecules and sugars are expected to be promising fluorescent probes for cell imaging.

Trehalose (α -D-glucopyranosyl- α -D-glucopyranoside) is a disaccharide composed of two glucose molecules linked by an α , α -1,1 bond¹⁶). Trehalose is widely distributed in nature and is used as an energy source in a broad range of taxa, including bacteria, fungi, insects, plants, and invertebrates¹⁷). In addition, it is widely used in foods and biomaterials and is attracting attention as an excipient for pharmaceuticals. Trehalose has more favorable hydration properties compared with other sugars such as glucose, galactose, and sucrose. Given the need for imaging materials with water solubility for use in living tissues, as well as its hydrophobicity for penetrating the cell membrane and its low cytotoxicity, trehalose is a promising sugar.

We have previously synthesized 6,6'-bis(*O*-4-pyren-1-yl-ethynylbenzoyl)- α , α -trehalose (aryl-substituted trehalose) by TMS protection and selective deprotection of the hydroxy group of trehalose, esterification of the primary hydroxy group, and the Sonogashira coupling reaction¹³). The

aryl-substituted trehalose showed an absorption maximum in the visible region and a high fluorescence quantum yield in diluted THF solutions. It generated strong fluorescent signals. Strong fluorescence was maintained even in a THF/H₂O mixed solvent. We further confirmed that a-aryl-substituted trehalose could be introduced into HeLa CD4⁺ cells and used as a green fluorescent probe.

In this study, we evaluated the effects of a-aryl-substituted trehalose, as a candidate cell imaging material, on HeLa CD4⁺ cells.

2 Experimental

2.1 Culture conditions and reagents. HeLa CD4⁺ cells and Vero cells were cultured as a monolayer in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Sigma-Aldrich) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Cytiva), 100 units/mL penicillin G, and 100 µg/mL streptomycin (Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation). The a-aryl-substituted trehalose was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and the final concentration of DMSO was 1%.

2.2 Observation of uptake of the a-aryl-substituted trehalose with a fluorescence microscope. The uptake of the a-aryl-substituted trehalose by HeLa CD4⁺ cells and Vero cells was observed using a fluorescence microscope. HeLa CD4⁺ cells and Vero cells were seeded on 96-well plates (2×10⁴ cells/well) for 24 h to allow adherence and were then incubated with a-aryl-substituted trehalose at concentrations of 0 (1% DMSO) and 9.4 µmol/L for 24 or 48 h. After incubation, nuclear staining was performed using Hoechst33342 (ImmunoChemistry Technologies). Cells were viewed under a fluorescence microscope (Keyence Co.).

2.3 Evaluation of the a-aryl-substituted trehalose uptake efficiency. Uptake of the a-aryl-substituted trehalose by HeLa CD4⁺ cells was

observed using a flow cytometer. HeLa CD4⁺ cells were seeded on 24-well plates (10⁵ cells/well) for 24 h to allow adherence and were then incubated with a-aryl-substituted trehalose at concentrations of 0 (1% DMSO) and 9.4 µmol/L for 24 and 48 h. After they were washed twice with PBS(-), the cells were trypsinized and collected for the measurement of uptake efficiency. Fluorescence was monitored using a flow cytometer (BD Biosciences). Ten thousand events were collected per sample, and the data were analyzed using CellQuest (BD Biosciences).

2.4 Cell proliferation and viability assays.

The trypan blue method was used to evaluate the effects of a-aryl-substituted trehalose on the viability and proliferation of HeLa CD4⁺ cells and Vero cells. The a-aryl-substituted trehalose was synthesized and diluted in DMSO. For proliferation and viability assays, 10⁵ cells were plated in 24-well plates and treated with a-aryl-substituted trehalose for 24 and 48 h. After treatment, cells were trypsinized and counted using a TC20 Automated Cell Counter (Bio-Rad Laboratories, Inc.).

2.5 Comparison of glut4 expression in cancer cells and normal cells by adding a-aryl-substituted trehalose. The expression level of glut4 present on the cell surface was compared to investigate the cell uptake pathway of a-aryl-substituted trehalose in HeLa CD4⁺ cells and Vero cells. HeLa CD4⁺ cells were seeded into 24-well plates (10⁵ cells/well) for 24 h to allow the cells to grow adherently, followed by incubation with a-aryl-substituted trehalose at 0 (1% DMSO) and 9.4 µmol/L for 48 h. Cells were stained with PE-binding anti-glut4 antibody (BioLegend) for 15 min, after which glut4 expression levels were measured with a flow cytometer.

2.6 Confirmation of NF-κB and Bcl-X expression by flow cytometry. Cells were incubated with 1% DMSO and 9.4 µmol/L a-aryl-substituted trehalose for 24 h and 48 h. NF-κB and

Bcl-XL were measured by flow cytometry using PE-conjugated NF- κ B and Bcl-X antibodies (BioLegend) along with standard binding buffer. Antibody staining was performed following the manufacturer's recommended protocol.

2.7 Statistical analysis. All data were processed using Microsoft Office Excel (Microsoft). Each experiment was repeated independently at least 3 times, and all results were expressed as mean \pm standard deviation (SD). In addition, statistical differences were analyzed by Student's *t* tests. A *p*-value of less than 0.05 was considered statistically significant.

3 Result

3.1 Aryl-substituted trehalose uptake by HeLa CD4⁺ cells. Nuclear staining and fluorescence were compared between cells

supplemented with 1% DMSO, which solubilizes aryl-substituted trehalose, and cells supplemented with aryl-substituted trehalose. We observed that aryl-substituted trehalose was taken up by HeLa CD4⁺ cells and Vero cells and then labeled the cytoplasmic compartment (Fig. 1). We have previously confirmed that trehalose at a concentration of 37.5 μ mol/L is taken up by cells; in this study, we used the minimum concentration for cellular uptake¹³). Aryl-substituted trehalose was taken up by HeLa CD4⁺ cells but not by Vero cells. This suggests that aryl-substituted trehalose is taken up by cancer cells but not by normal cells.

3.2 Evaluation of aryl-substituted trehalose uptake in HeLa CD4⁺ cells by flow cytometry.

As determined by flow cytometry, the fluorescence intensities of aryl-substituted trehalose in HeLa CD4⁺ cells at 9.4 μ mol/L for 24 and 48 h were

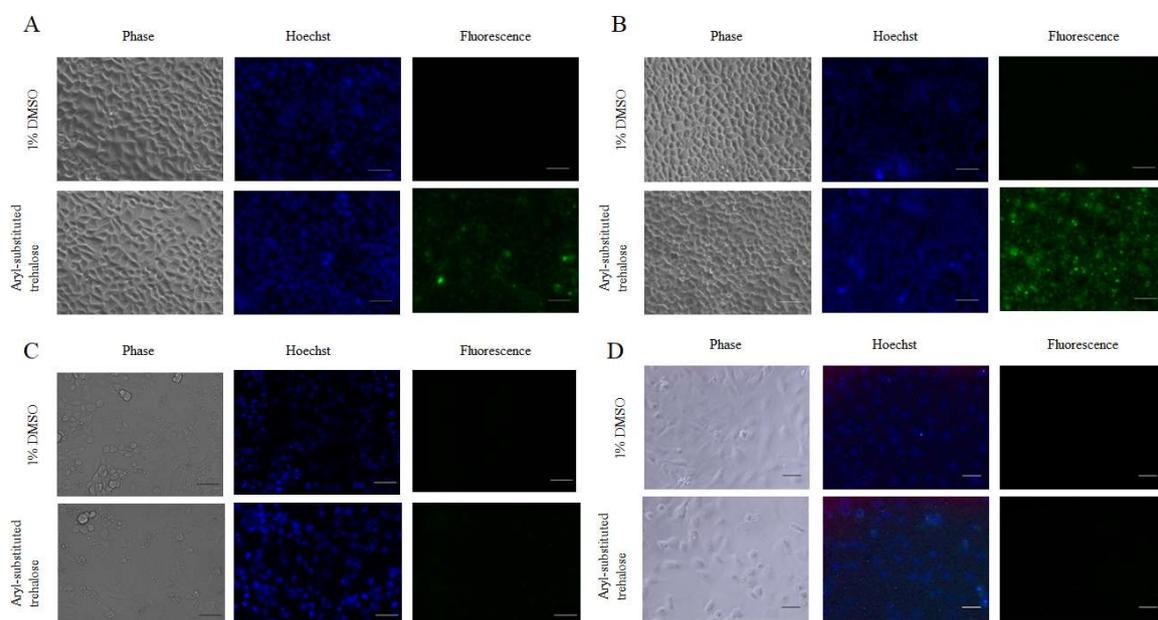


Fig. 1 Analysis of aryl-substituted trehalose uptake by HeLa CD4⁺ cells and Vero cells by fluorescence microscopy. HeLa CD4⁺ cells were incubated with aryl-substituted trehalose or 1% DMSO for 24 h (A) or 48 h (B). Vero cells were incubated with aryl-substituted trehalose or 1% DMSO for 24 h (C) or 48 h (D). From left to right, Phase, Hoechst, and Fluorescence images are shown. Scale bar represents 50 μ m.

significantly greater than that in the control by 13% and 22%, respectively (Fig. 2). The fluorescence intensity of aryl-substituted trehalose incorporated into HeLa CD4⁺ cells increased in a time-dependent manner.

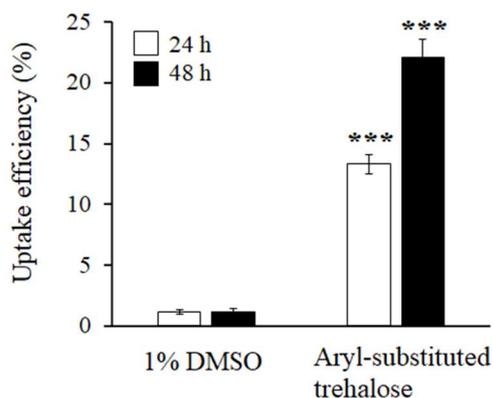


Fig. 2 Flow cytometer analysis of the fluorescence intensity of aryl-substituted trehalose incorporated into HeLa CD4⁺ cells. Cells were incubated with aryl-substituted trehalose for 24 h (□) or 48 h (■) at concentrations of 9.4 μmol/L and 1% DMSO. Compared with the control, $p < 0.001$ (***). All data are representative of three experiments (\pm SD).

3.3 Cytotoxicity of aryl-substituted trehalose.

The trypan blue method was used to evaluate the effect of aryl-substituted trehalose on the viability and proliferation of HeLa CD4⁺ cells and Vero cells. After treatment with aryl-substituted trehalose, cell viability was greater than 90% at both 24 and 48 h. In addition, viability did not differ significantly between treated cells and 1% DMSO (data not shown). There was no difference in cell proliferation between cells that were and were not supplemented with aryl-substituted trehalose after 24 and 48 h (Fig. 3). It was suggested that aryl-substituted trehalose does not affect the proliferative potential of cancer cells and normal cells.

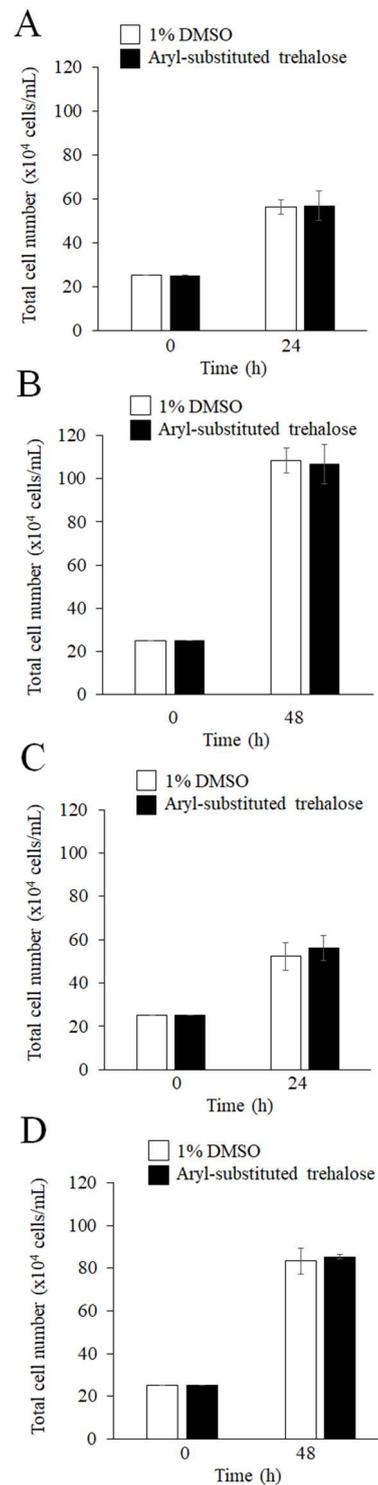


Fig. 3 Proliferation analysis of HeLa CD4⁺ cells and Vero cells. HeLa CD4⁺ cells were treated with 1% DMSO and aryl-substituted trehalose for 24 h (A) or 48 h (B). Vero cells were treated with 1% DMSO and aryl-substituted trehalose for 24 h (C) or 48 h (D). All data are representative of three experiments (\pm SD).

3.4 Intracellular uptake of aryl-substituted trehalose. Cellular glucose uptake is mediated by membrane-bound glucose transporters. The expression level of glut4 present on the cell surface was compared to investigate the cell uptake pathway of aryl-substituted trehalose of HeLa CD4⁺ cells, which are cancer cells, and Vero cells, which are normal cells. The expression level of glut4 was increased in HeLa CD4⁺ cells supplemented with

aryl-substituted trehalose, but not in Vero cells (Fig. 4). This result suggests that aryl-substituted trehalose is taken up into cells via glut4.

3.5 Expression of factors related to the NF- κ B signal transduction pathway. NF- κ B expression levels were 14% higher than those in the control for concentrations of 9.4 μ mol/L after 24 h and 10% higher after 48 h (Fig. 5A, B). Furthermore, Bcl-XL expression levels were 15% higher than

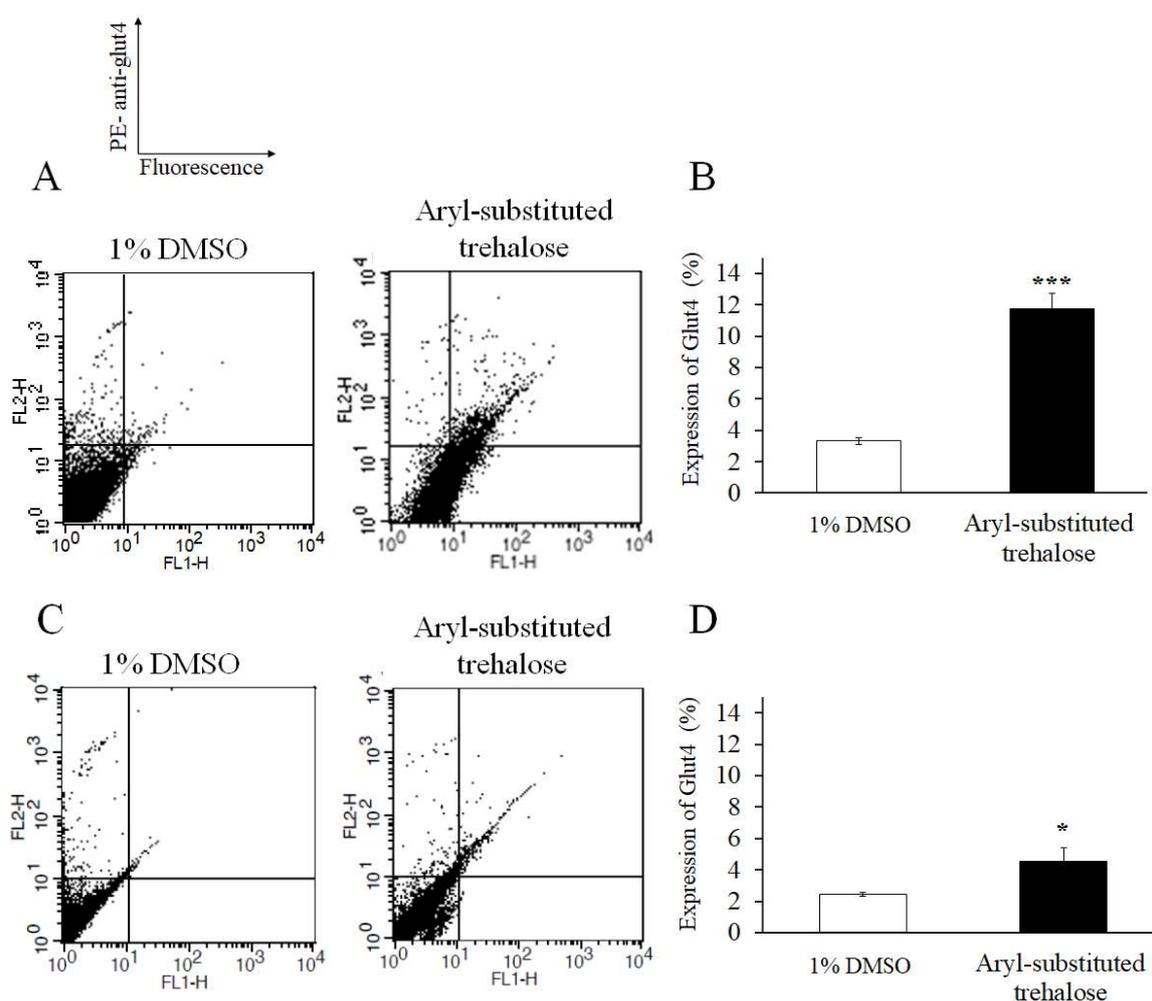


Fig. 4 Comparison of glut4 expression by addition of aryl-substituted trehalose in cancer cells and normal cells. The aryl-substituted trehalose was added to HeLa CD4⁺ cells (A,B) and Vero cells (C,D). Populations of glut4-positive cells were analyzed using a flow cytometer. Compared to 1% DMSO, $p < 0.05$ (*) or $p < 0.001$ (***). All data are means \pm SD of three samples from three independent experiments.

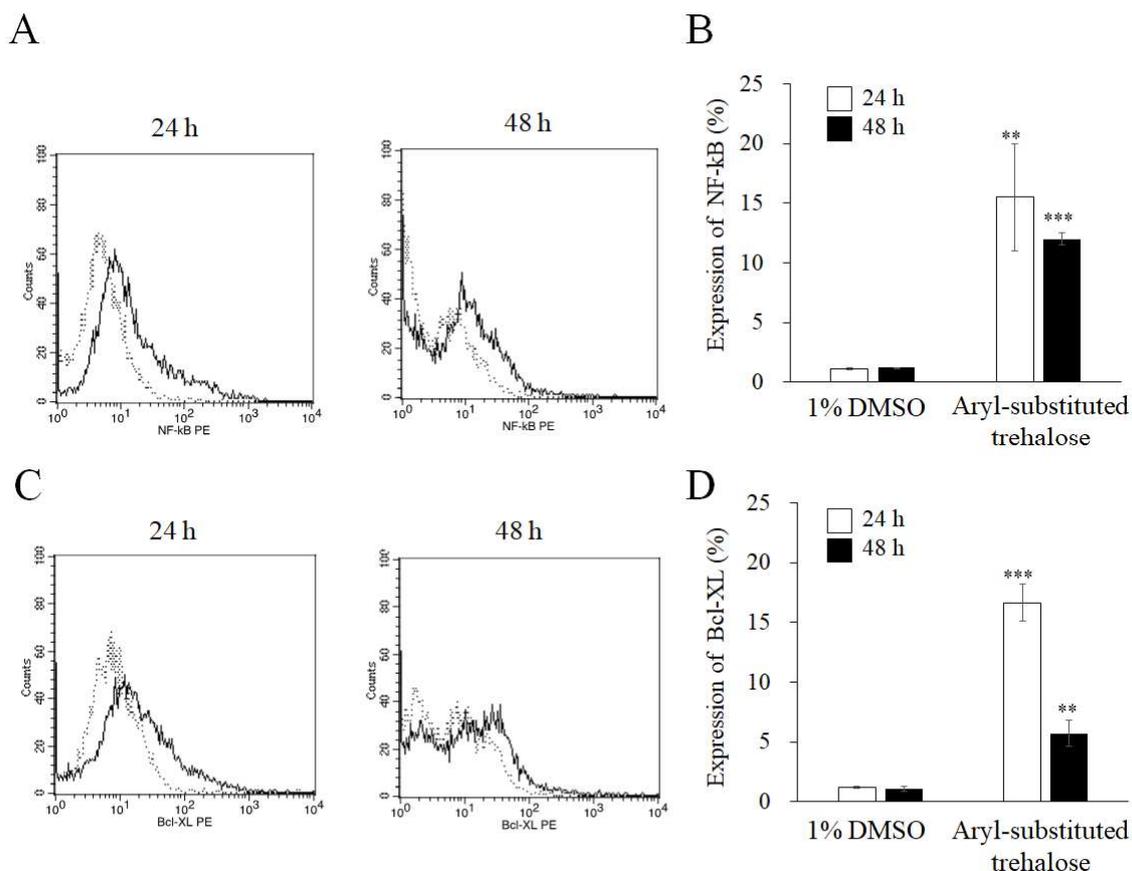


Fig. 5 NF- κ B and Bcl-XL expression in response to aryl-substituted trehalose. HeLa CD4⁺ cells were stained with NF- κ B-PE (A,B) or Bcl-XL-PE (C,D) for flow cytometry. (A,C) Representative profile. The solid line and dashed line represent the aryl-substituted trehalose and 1% DMSO, respectively. (B,D) Each bar represents the mean \pm SD of three independent experiments ($p < 0.01$ (**)) or $p < 0.001$ (***) compared to 1% DMSO).

those in the control for concentrations of 9.4 μ mol/L after 24 h and 4% higher after 48 h (Fig. 5C, D). The addition of aryl-substituted trehalose increased the expression of NF- κ B signaling pathway-related factors (i.e., NF- κ B and Bcl-XL), thereby promoting the survival of HeLa CD4⁺ cells.

4 Discussion

Cell imaging is expected to contribute to clinical diagnosis, treatment, drug discovery, and life science research as a methodology for exploring and interpreting biological phenomena from a new perspective¹⁸). One of the design requirements for organic fluorescent small molecule-based imaging

materials is a lack of cytotoxicity. Another requirement for the design of an imaging material is good water solubility for adapting to the biological environment and hydrophobicity for penetrating the cell membrane. Therefore, we focused on trehalose, which is a water-soluble sugar. Trehalose has beneficial characteristics for applications as a raw material for processed foods and as an excipient for pharmaceuticals¹⁹). We successfully synthesized aryl-substituted trehalose, in which trehalose with high hydration ability was combined with a hydrophobic organic fluorescent molecule, for cell imaging. Aryl-substituted trehalose showed efficient time-dependent cellular uptake (Fig. 1).

We verified that aryl-substituted trehalose was taken up by HeLa CD4⁺ cells and verified its effectiveness as a cell imaging probe. In addition, a quantitative flow cytometry analysis revealed that the fluorescence intensity of aryl-substituted trehalose in HeLa CD4⁺ cells depends on the treatment duration. HeLa CD4⁺ cells supplemented with aryl-substituted trehalose did not show morphological changes typical of apoptosis, as evaluated by light microscopy, even 48 h after treatment. During the early stages of apoptosis, cell contraction and enrichment can be observed using a light microscope. Cells show a reduced cell size, dense cytoplasm, densely packed organelles, and pyknosis as a result of chromatin condensation, a morphological feature of apoptosis²⁰).

NF-κB is a nuclear transcription factor involved in the response to stimuli, such as stress²¹). NF-κB has important roles in inflammatory and immune responses²²). It also regulates cytokines, which are growth factors in tumor cells, thereby contributing to cell proliferation²³). In addition, NF-κB activation controls the anti-apoptotic cascade and anti-apoptotic genes, such as genes in the Bcl-2 family²⁴). The anti-apoptotic Bcl-2 protein family prevents the physiological destruction of mitochondria, prevents the release of cytochrome c from mitochondria in p53-regulated apoptosis, and suppresses apoptosis^{25,26}).

Our experimental results showed that the introduction of aryl-substituted trehalose significantly increases the expression levels of NF-κB and Bcl-XL, which act as anti-apoptotic proteins in HeLa CD4⁺ cells (Fig. 5). These results suggest that the NF-κB signaling pathway is activated in HeLa CD4⁺ cells treated with aryl-substituted trehalose. Furthermore, the aryl-substituted trehalose-induced increases in the expression of NF-κB and Bcl-XL promoted the maintenance of HeLa CD4⁺ cell survival. In other words, aryl-substituted

trehalose is easily taken up by cells via glut4 and does not affect cell viability and proliferation, so we expect it to be useful as a new cell imaging technology.

In addition, aryl-substituted trehalose did not influence cell proliferation in HeLa CD4⁺ cells and Vero cells. In this assay, we used HeLa CD4⁺ cells as a representative cancer cell line and Vero cells as a representative normal cell line. Aryl-substituted trehalose was not taken up by Vero cells but was specifically taken up by HeLa CD4⁺ cells, suggesting that it may be used for cancer cell detection and drug discovery. We believe that aryl-substituted trehalose will serve as a valuable tool in the treatment of cancer.

Acknowledgments. We would like to thank all of our colleagues for their assistance, especially Ms. K. Kobayashi and Dr. T. Shimasaki, who synthesized the aryl-substituted trehalose (Chiba Institute of Technology).

Conflicts of interest

The authors have no potential conflicts of interest to disclose.

References

- 1) A. Shibata, *Yakugaku Zasshi*, **2017**, *137*, 1323-1337.
- 2) J. Cao, B. Zhu, K. Zheng, S. He, L. Meng, J. Song, H. Yang, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, **2020**, *7*, 487.
- 3) L. Lu, Z-Y. Wu, X. Li, F. Han, *Acta. Pharmacol. Sin.*, **2019**, *40*, 717-723.
- 4) Y. L. Pak, K. M. K. Swamy, J. Yoon, *Sensors*, **2015**, *15*, 24374-24396.
- 5) A. S. Boutorine, D. S. Novopashina, O. A. Krasheninina, K. Nozeret, A. G. Venyaminova, *Molecules*, **2013**, *18*, 15357-

- 15397.
- 6) Y. Jung, J. Jung, Y. Huh, D. Kim, *J. Anal. Methods. Chem.*, **2018**, *14*, 5249765.
 - 7) T. Ebe, *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, **2007**, *52*, 1766-1767.
 - 8) S. Subramanian, F. Srienc, *J. Biotechnol.*, **1996**, *49*, 137-151.
 - 9) Y. Shinden, H. Ueo, T. Tobo, A. Gamachi, M. Utou, H. Komatsu, S. Nambara, T. Saito, M. Ueda, H. Hirata, S. Sakimura, Y. Takano, R. Uchi, J. Kurashige, S. Akiyoshi, T. Iguchi, H. Eguchi, K. Sugimachi, Y. Kubota, Y. Kai, K. Shibuta, Y. Kijima, H. Yoshinaka, S. Natsugoe, M. Mori, Y. Maehara, M. Sakabe, M. Kamiya, J. W. Kakareka, T. J. Pohida, P. L. Choyke, H. Kobayashi, H. Ueo, Y. Urano, K. Mimori, *Sci. Rep.*, **2016**, *6*, 27525.
 - 10) Y. Urano, M. Kamiya, K. Kanda, T. Ueno, K. Hirose, T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 4888-4894.
 - 11) T-L. Hsu, S. R. Hanson, K. Kishikawa, S-K. Wang, M. Sawa, C. H. Wong, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2007**, *104*, 2614-2619.
 - 12) A. Barattucci, E. Deni, P. Bonaccorsi, M. G. Ceraolo, T. Papalia, A. Santoro, M. T. Sciortino, F. Puntoriero, *J. Org. Chem.*, **2014**, *79*, 5113-5120.
 - 13) K. Kobayashi, R. Saito, K. Udagawa, N. Miyano-Kurosaki, N. Asano, T. Iwanaga, N. Teramoto, T. Shimasaki, M. Shibata, *Euro. J. Org. Chem.*, **2018**, *26*, 3444-3453.
 - 14) E. Deni, A. Zamarrón, P. Bonaccorsi, M. C. Carreño, Á. Juarranz, F. Puntoriero, M. T. Sciortino, M. Ribagorda, A. Barattucci, *Eur. J. Med. Chem.*, **2016**, *111*, 58-71.
 - 15) A. Jo, J. Sung, S. Lee, H. Nam, H. W. Lee, J. Park, H. M. Kim, E. Kim, S. B. Park, *Bioconjug. Chem.*, **2018**, *29*, 3394-3401.
 - 16) S. Ohtake, Y. J. Wang, *J. Pharm. Sci.*, **2011**, *100*, 2020-2053.
 - 17) A. Patist, H. Zoerb, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **2005**, *40*, 107-113.
 - 18) T. Haraguchi, *Cell Struct. Funct.*, **2002**, *27*, 333-334.
 - 19) C. Colaço, S. Sen, M. Thangavelu, S. Pinder, B. Roser, *Biotechnology (N Y)*, **1992**, *10*, 1007-1011.
 - 20) S. Elmore, *Toxicol. Pathol.*, **2007**, *35*, 495-516.
 - 21) J. F. R. Kerr, *Toxicology*, **2002**, *181-182*, 471-474.
 - 22) S. Ghosh, M. J. May, E. B. Kopp, *Annu. Rev. Immunol.*, **1998**, *16*, 225-260.
 - 23) N. S. Chandel, W. C. Trzyna, D. S. McClintock, P. T. Schumacker, *J. Immunol.*, **2000**, *165*, 1013-1021.
 - 24) B. B. Aggarwal, *Cancer Cell*, **2004**, *6*, 203-208.
 - 25) K. S. Ahn, G. Sethi, B. B. Aggarwal, *J. Immunol.*, **2007**, *178*, 2507-2516.
 - 26) Y. Dogu, J. Díaz, *Biophys. Chem.*, **2009**, *143*, 44-54.

2021 年度 材料技術研究協会討論会報告

討論会委員会 委員長 酒井 秀樹 (東京理科大学)

2021 年 12 月 2 日 (木)、3 日 (金) の 2 日間、2021 年度 材料技術研究協会討論会が開催されました。コロナウィルスの流行がまだ収まらない中、討論会で発表していただいた方々、参加いただいた方々、また討論会運営へのご支援をいただいた方々に心よりお礼申し上げます。

本年度も討論会は Zoom を用いたリモート開催となりましたが、昨年度は実施を見合わせたポスターセッションを復活させ、Zoom のブレイクアウトルームの活用により活発な議論を行うことができました。

討論会 1 日目 (12月2日)

討論会委員長による開会挨拶の後、9 時 30 分から A 会場、B 会場の 2 セッションに分かれて口頭講演が始まりました。オンライン開催も 2 年目となり、円滑な進行のもと、活発な質疑が行われました。

その後 10 時 35 分からは、学生論文賞受賞講演が実施され、受賞者の文化学園大学大学院 危 希曦氏、柚本 玲氏らにより「ショーツ内体臭成分のガスクロマトグラフマスマスペクトルによる分析」のタイトルで講演が行われました。

続いて 11 時からは、阿部 正彦先生 (東京理科大学名誉教授、本会前会長) による総合講演が、「記憶に残る私の研究アラカルト ―その切っ掛けとその後―」の演題で行われました。阿部先生がこれまで遂行されてきた多岐に渡る研究が始まる切っ掛け、そしてそれがどのように花開いたかが説明され、これから研究を展開される若い研究者、学生の皆さんには大変勉強になったのではないかと思います

昼食後には、科学技術振興機構(JST)の渡辺美代子先

生による特別講演が、「今、多様性が世界の科学技術を変える～競争による発展より持続できる社会へ～」の演題で行われました。世界の科学技術を発展させていくためには、競争よりも Diversity & Inclusion の推進により持続できる社会を構築していくことが重要であるとのお話に感銘を受けました。

特別講演に引き続き、表面改質部会の特別セッションが開催され、以下 4 件の依頼講演が行われました。

・「高速気流中衝撃法による新規相変化マイクロカプセルの開発」(北海道大学大学院) 能村貴宏先生、坂井浩紀氏、石田良介氏

・「水系導電性ポリマーの技術と用途紹介」(綜研化学株式会社) 上川原タケル先生

・「建物・街区における水素エネルギー利活用、水素吸蔵技術」(清水建設株式会社) 下田英介先生

・「筆記具インキの技術紹介」(ぺんてる株式会社技術研究所) 名須川 良先生

その後 16 時 15 分からは、再び A, B 2 会場に分かれて口頭講演が実施され、最新成果の発表ならびに活発な質疑応答が行われました。

討論会 2 日目 (12月3日)

討論会 2 日目の朝のセッションでは A, B 2 会場において口頭講演が行われました。

その後 10 時 20 分からは、令和 3 年度論文賞の受賞講演 2 題が行われました。はじめに、株式会社 L.V.M.C. の金子晃久先生による「 β -シトステロール硫酸ナトリウム存在下におけるジパルミトイルホスファチジルコリン/水系の水和特性に関する研究」のご講演が、続いて、株式会社ジェイテクト研究開発本部の南里浩

太先生による「純水およびアルコール水溶液中における低 Reynolds 数領域の光ピンセットを利用した抗力係数の測定」のご講演があり、多くの注目を集めました。

その後、11 時からは、令和 3 年度「小石眞純賞」受賞者である大澤 敏先生（金沢工業大学学長）の受賞講演が、「生分解性高分子材料の環境・医療・生活分野への応用」のタイトルで行われました。大澤先生のごこれまでのご研究を、多くの「材料技術」誌掲載論文を引用しながらご紹介いただきました。なお、授賞式は、2022 年度本協会総会にて行われる予定です。

昼食を挟んで 13 時からは、岩手医科大学薬学部の杉山育美先生による特別講演が「少しニッチなアンチ・ドーピングの世界」のタイトルで行われ、杉山先生が関わられているアンチドーピングへの試みの事例について、分かり易くご説明いただきました。

その後、再び口頭講演が 2 会場に分けて実施された後、15 時からはポスター発表が、Zoom のブレイクアウトルーム機能を用いて行われました。各講演（ブレイクアウトルーム）について絶えず多くの方々聴講されており、オンラインながらも十分な討論ができたようでした。

ポスターセッション終了後、鈴木昇先生（副会長）の閉会のご挨拶をもって討論会は閉会となりました。

本討論会の開催は、非常に多くの方々のご尽力により可能となりました。Zoom の運営は、今年も羽田宣弘実行委員長が経営されているベンチャー企業のスタッフの方にお願ひし、機器トラブルなどもなく順調に運営することができました。またリモート開催では従来以上に重要となる討論会 HP の管理や要旨集のアップロードは長谷川裕之副実行委員長と事務局のご尽力により円滑に行われました。また、討論会委員をはじめとする先生方には、座長や賞の審査などご協力いただき心よりお礼申し上げます。

さらに、下記の方々から、討論会運営に協賛金、ご

寄付の形で多大なご支援をいただきました。心よりお礼申し上げます。（敬称略、50音順）

エムディージャパン株式会社

株式会社 L.V.M.C.

折原勝男（自己組織化ナノテクノロジー研究所）

小石眞純（東京理科大学名誉教授）

材料技術研究協会 表面改質研究会

株式会社 ジェイテクト

株式会社 細川洋行

ユニ・チャーム株式会社

米山雄二（文化学園大学教授）

口頭講演賞・ポスター賞について

口頭講演・ポスター発表について、複数審査員による審査を実施し、特に優れた講演について、優秀口頭講演賞、ゴールドポスター賞、シルバーポスター賞を選考いたしました。以下に優秀口頭講演賞、ゴールドポスター賞の受賞者を記載させていただきます。

優秀口頭講演賞受賞者（敬称略）

- ・マイクロ波加熱を用いたゴム加硫における発熱メカニズム解明およびその応用について
（上智大）○奥村恭輔
- ・六方晶フェライト $\text{Ba}(\text{Fe}_{1-x}\text{Sc}_x)_2\text{O}_{19}$ のアンチフェロ磁気構造（公立諏訪東京理科大）丸山健一
- ・六角板状酸化亜鉛ヤヌス微粒子を用いた微粒子担持薄膜の調製（千葉工大）橋本忠樹
- ・エタノール水溶液中で調製した O/W 型エマルションの分散安定化機構（東理大理工）本山拓実
- ・エマルション界面を反応場としたシリカ粒子の表面修飾と界面活性化（弘前大院）磯嶋柚希
- ・複合有機テンプレート法によるチタニア/リン酸カルシウム複合粒子の調製（千葉工大）大澤朗人
- ・火花放電パルスアノード酸化による複合酸化物固溶体皮膜の作製と深さ方向結晶構造解析

(近畿大院) 東中庸太

- ・ ウルトラファインバブル水を用いた新規サーファクタントフリーエマルジョンの探究とそのメカニズムの解明 (千葉工大) 加藤優志
- ・ ITO 基板上に成膜したフォトレジストのプルロニック系界面活性剤による剥離機構: 炭酸アルキレンの組成依存性 (東理大理工) 永井泰史
- ・ 種々の極性溶媒を用いた Oil-in-Oil 型エマルジョンの調製と分散安定性向上 (東理大理工) 横地智貴
- ・ 麻繊維強化植物由来 PA1010 バイオマス複合材料の各種物性に及ぼすエポキシ樹脂処理の処理濃度の影響 (工学院大院) 森野麻衣子
- ・ 光触媒を用いたバイオエアロゾル処理装置の設計 (千葉工業大学) 山野 凌

着材料への応用 (福井高専) 鷲田圭司

- ・ ナノ電解法による新規フタロシアニンナノ単結晶の作製とその物性 (島根大学教育) 織部太智

ゴールドポスター賞受賞者(敬称略)

- ・ 電気泳動電着における浴条件が及ぼす酸化セリウム膜への影響 (千葉工大院) 佐藤終哉
- ・ CVD グラフェンの転写法の検討 (千葉工大院) 小井出涼太
- ・ バクテリオロドプシン Gabor フィルタを用いたパターン認識 (島根大院自然) 坂本海里
- ・ フッ素系低表面エネルギーの実現に向けた非フッ素系界面活性剤の構造最適化 (弘前大理工) 込山ひなた
- ・ 非フッ素系ノニオン性物質による水/超臨界 CO₂ 分散系の安定化 (弘前大学院理工) 飯塚大登
- ・ テンプレート法を利用した中空粒子の調製における基礎的研究 (新潟大自) 真下稜平
- ・ 微細藻類由来 β -1,3-グルカンのナノファイバー化と水系塗料添加剤に期待されるレオロジー特性 (金沢工大院) 小泉樹奈
- ・ フェロセンを有する有機-無機ハイブリッドベシクルの崩壊検討 (山形大院理工) 茂原虎勢
- ・ ジスルフィド結合含有 UV 硬化膜の作製と重金属吸

<Editorial Note> 2021年度 統合版の発行に寄せて

材料技術の2021年、第39巻、第6号を公開いたします。印刷版（第1号～第6号の統合版）の発行が遅れておりますが、できるだけ早く皆様のお手元にお届けできるよう努力いたします。

2021年度に御投稿いただいた論文の投稿から掲載（公開）決定までの日数は平均40日で、2020年度よりさらに短縮されました（ほぼ半数の論文掲載が投稿から30日未満で決定しております）。今後も迅速な審査に努めます。奮って御投稿いただけますようお願い申し上げます。

（浜松医科大学 三浦康弘）



MATERIAL TECHNOLOGY 材料技術

昭和62年8月5日第三種郵便物許可 令和3年12月25日発行（隔月25日発行） 第39巻 第6号
定価2,100円