

令和元年6月17日現在

機関番号：33919

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08385

研究課題名(和文) 脳内異物解毒機構の変動に基づく適正な脳精神疾患薬物治療戦略の構築

研究課題名(英文) Changes in the expression of drug metabolizing enzymes in the brain by the brain disease and its therapeutic drugs

研究代表者

加藤 美紀 (KATOH, Miki)

名城大学・薬学部・准教授

研究者番号：70345594

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：脳精神疾患の一つであるてんかんにより、脳内異物解毒機構を担う薬物代謝酵素の発現が、てんかん発作の伝わる脳部位で変動することが明らかになった。その変動は、酵素により異なった。てんかん発作により生じる活性酸素、神経細胞の異常興奮をもたらす細胞内カルシウムイオンの動態変動により、薬物代謝酵素の発現が変動すると示唆された。また、てんかんの治療薬によっても、薬物代謝酵素の発現が変動した。従って、疾病のみならず治療薬によっても脳内異物解毒機構は変動する可能性があることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

社会の高度化、複雑化、高齢化に伴い、脳神経疾患の罹患率が増加している。脳神経疾患の一つであるてんかんは、主として薬物療法が行われるが、薬物抵抗性を示す難治性のものが増えている。薬物は一般的に生体内で異物解毒機構により解毒されて、薬理効果を失う。てんかんの発症部位であり、かつ治療薬の作用部位である脳において、疾病と治療薬の両者が異物解毒機構を担う薬物代謝酵素に及ぼす影響を解明した本結果は、脳精神疾患の薬物治療を適正化するために、重要な情報を提供できたと考える。

研究成果の概要(英文)：This study has shown that status epilepticus affects the expression of several drug-metabolizing enzymes (DMEs) in the cortex and hippocampus, where epileptiform activity propagated and oxidative stress occurred. The changes in their expression varied among the enzymes. The oxidative stress and the alteration of cytosolic calcium concentration could be involved in the alteration. The interaction between nuclear receptors is also responsible for the DME expression. Moreover, anti-epileptic drugs also changed the DME expression in the brain. Therefore, we clarified that the DME expression in the brain regions would be changed by both brain disease and its therapeutic drugs.

研究分野：薬物動態学

キーワード：異物解毒機構 薬物代謝酵素 脳疾患 てんかん UDP-グルクロン酸転移酵素 シトクロムP450 発現変動

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳科学は21世紀の自然科学の柱の一つである。社会の高度化、複雑化に伴い、うつ病などの精神疾患や、てんかんのような神経活動の異常が引き起こす脳疾患の罹患率が増加している。両疾患ともに薬物療法が主たる治療法になっているが、薬物療法に抵抗性を示す難治性のものも増えている。従って、脳精神疾患の薬物治療戦略の適正化は、最重要かつ必須の課題であり、社会的ニーズが高い。

薬物の治療効果を適正化するためには、薬物の体内動態を理解する必要がある。全身の体内動態だけでなく、標的部位(脳内)での動態を考慮することが、薬物治療の適正化を図る上で最も重要と考えられる。標的部位での薬物の体内動態は、生体がつもつ異物解毒機構である代謝的解毒反応と細胞外への排泄反応により決定づけられる。注目すべきは、脳内にも異物解毒機構が存在することである。代謝的解毒反応は、薬物代謝酵素により行われる。代表的なものとして、シトクロム P450 (CYP) や UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT) が挙げられる。CYP や UGT は抗うつ薬、てんかん治療薬や麻薬性鎮痛薬など、脳内で薬効を発現する薬物を代謝して解毒する。すなわち、脳内の薬物代謝酵素は薬効に深く関係していると考えられる。

薬物は一般的に代謝的解毒反応を受ける。多くの薬物が代謝されるにもかかわらず、現在までに脳精神疾患が異物解毒機構に及ぼす影響について、ほとんど研究が進んでいない。従って、疾患による異物解毒機構への影響を考慮しないまま、漫然と脳を標的とした薬物治療が行われてきた。また、脳精神疾患の治療では薬物を長期間連続服用することが多いため、治療薬による異物解毒機構への影響も考慮する必要があるが、その影響の解明は未だ不十分である。

疾患や治療薬による薬物代謝酵素の脳部位特異的な発現変動を明らかにすることで、より詳細に脳内動態を理解できる。また、ヒトの脳を用いて実験することは倫理的にも極めて困難であるため、動物実験を代替法とすることが現状では最も妥当である。人間の脳はラットやマウスに比して圧倒的に大脳が大きい。小脳や脳幹は類似しており、神経伝達の基本回路や基本的反応も同じと言われている。そこで、実験動物を用いて疾患やその治療薬による脳内異物解毒機構の変動とそのメカニズムを明らかにし、それを基にヒトへの外挿を模索することが最善であると考えられる。

2. 研究の目的

本申請課題では、脳精神疾患やその治療薬による脳内異物解毒機構の部位特異的な変動を定量的に解明し、その変動メカニズムを明らかにすることを目的とした。さらに、疾患の発症メカニズムを考慮し、培養細胞において疾患の発症要因と考えられている因子を変動させることにより、脳内異物解毒機構の変動の解明を目指した。具体的には下記について明らかにすることを目的とした。

- (1) 脳精神疾患による脳内異物解毒機構の部位特異的な変動とそのメカニズムの解明
- (2) 脳精神疾患治療薬による脳内異物解毒機構の部位特異的な変動とそのメカニズムの解明
- (3) 疾患の発症要因の変動による異物解毒機構の変動の解明

なお、脳精神疾患として、てんかんについて重点的に検討を行った。

3. 研究の方法

本実験は名城大学動物実験委員会の承認を得て実施した。

(1) 実験材料

TRIzol 試薬は Life Technologies (Carlsbad, CA, USA) より購入した。ReverTra Ace qPCR Kit は TOYOBO (Osaka, Japan) より購入した。SYBR Premix Ex Taq は TAKARA B10 (Shiga, Japan) より購入した。ウサギ抗 nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) 抗体、ウサギ抗 constitutive androstane receptor (CAR) 抗体、ウサギ抗ヒストン脱アセチル化 (HDAC) 1 抗体は abcam (Cambridge, UK) より購入した。ウサギ抗アセチル化 H3K9 抗体、ウサギ抗ヒストン H3 は Millipore (Bedford, MA, USA) より購入した。マウス抗 HDAC1 抗体、マウス抗 octamer transcription factor 1 (Oct-1) 抗体、マウス抗 yin yang-1 (YY1) 抗体は Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) より購入した。

(2) てんかん重積発作 (SE) モデルの作成

7 週齢の雄性 Sprague-Dawley (SD) ラットにカイニン酸 (KA) 10 mg/kg またはコントロールとして生理食塩水を単回腹腔内投与した。KA 投与後、2.5 時間行動観察を行い、てんかん発作の有無を Morales-Garcia らの評価尺度 (J. Neurosci. Res., 87, 3687-3696 (2009)) により判定した。評価尺度として、Stage 0: 無反応 (NR)、Stage 1: 口、顔の歪み、Stage 2: 頷き、Stage 3: 前肢クローヌス、Stage 4: 立ち上がり、Stage 5: 立ち上がり後、転倒と設定した。Stage 4 または Stage 5 が 10 分以上持続したラットを SE とした。KA 投与 24 時間後に臓器を摘出した。

(3) 薬物投与

カルバマゼピンがラット脳 Ugt1a6 および Ugt1a7 の発現に及ぼす影響

8 週齢の雄性 SD ラットを用い、カルバマゼピン (CBZ) を 100 mg/kg、1 日 1 回 7 日間連続腹腔内投与した。なお、コントロールとしてコーンオイルを投与した。最終投与 24 時間後に臓器を摘出した。

ジアゼパム投与が SE によるラット脳 Ugt1a の変動に及ぼす影響

ジアゼパム (DZP) 単回投与としては、7 週齢の雄性 SD ラットに KA を投与した 2.5 時間後、SE ラットに DZP 25 mg/kg または生理食塩水を単回腹腔内投与した。コントロールラットも同様に、DZP 25 mg/kg または生理食塩水を単回腹腔内投与した。KA 投与 24 時間後、脳を摘出した。

DZP 連続投与としては、KA 投与 2.5 時間後、すべての SE ラットに DZP 25 mg/kg を単回腹腔内投与した。その後、SE ラットに DZP 25 mg/kg または生理食塩水 (SE-Saline) を 1 日 1 回 13 日間連続腹腔内投与した。なお、コントロールラットには、DZP 25 mg/kg または生理食塩水を 1 日 1 回 14 日間連続腹腔内投与した。最終投与 24 時間後に脳を摘出した。

(4) RNA 抽出およびリアルタイム PCR

TRIzol 試薬を用いて total RNA を抽出した。ReverTra Ace qPCR RT Kit を用いて得られた cDNA 溶液と、標的遺伝子に特異的なプライマー、SYBR Premix Ex Taq を用いて、リアルタイム PCR を行った。

(5) SDS-PAGE ウェスタンブロット法による標的タンパク質発現量の定量

NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) により核タンパク質を抽出した。ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行った後、polyvinylidene difluoride 膜に電氣的に転写した。その後、抗体を用いて、標的タンパク質を定量した。

(6) 共免疫沈降

核タンパク質をウサギ抗 HDAC1 抗体と共に 4℃ で一晩インキュベートした。その後、protein G plus-agarose beads を添加し、4℃ でインキュベートした。洗浄後、得られた沈殿物に SDS 緩衝液を添加し、100℃ でインキュベートした。その後、遠心分離を行い、得られた上清を用いて、(5)の SDS-PAGE ウェスタンブロット法を行った。

(7) 酵素活性の測定

デキストロメトルファン O-脱メチル化酵素活性

最終濃度が 100 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4)、50 μM デキストロメトルファン、0.5 mg/mL ミクロソームタンパク質とし、³H-ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸生成系を添加することで反応を開始した。37℃ にて 60 分間インキュベートした。代謝物は液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計で定量した。

セロトニングルクロン酸抱合活性

最終濃度が 50 mM トリス緩衝液 (pH 7.4)、5 mM MgCl₂、25 μg/mL アラメチシン、1 μM セロトニン (5-HT)、0.2 mg/mL ミクロソームタンパク質とし、ウリジン 5'-³H-ジホスホグルクロン酸を添加することで反応を開始した。37℃ で 60 分間インキュベートした。代謝物は液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計で定量した。

アステミゾール O-脱メチル化酵素活性

上述 デキストロメトルファン O-脱メチル化酵素活性に準じた。ただし、1 μM アステミゾールとし、37℃ にて 20 分間インキュベートした。

(8) ヒストンアセチル基転移酵素活性と HDAC 活性の測定およびヒストン修飾の解析

ヒストンアセチル基転移酵素 (HAT) 活性の測定には、Histone Acetyltransferase Activity Assay Kit (abcam) を用いた。また、HDAC 活性の測定には、Histone Deacetylase Activity Assay Kit (abcam) を用いた。H3K4 パンメチル化および H3K9 モノメチル化状態をそれぞれ Histone H3 (pan-methyl K4) Quantification Kit、Histone H3 (mono-methyl K9) Quantification Kit (abcam) を用いて解析した。

(9) チオバルビツール酸反応物の定量

ラット脳におけるチオバルビツール酸反応物 (TBARS) 量は、Ohkawa らの方法 (Anal. Biochem., 95, 351-358 (1979)) に従い定量した。脳ホモジネートに、SDS、酢酸、チオバルビツール酸、ブチルヒドロキシルエチル酢酸を添加し、60 分間煮沸した。煮沸したサンプルを遠心分離し、n-ブタノール:ピリジン=15:1 (v/v) を加えて攪拌した後、遠心し、上清の吸光度を 535 nm にて測定した。

(10) 培養細胞を用いた薬物代謝酵素の発現変動

ヒト肝がん由来 HuH-7 細胞に DZP (50 μM) を 24 時間曝露した。また、ヒト神経膠芽腫由来 T98G 細胞にタブシガルギン (100 nM)、シクロピアゾン酸 (40 μM)、A23187 (1 μM)、BAPTA-AM (5 μM) を 24 時間曝露後、total RNA を抽出した。

(11) 統計学的処理

有意差検定には Student's *t* 検定を用いた。なお、*p* < 0.05 の時、有意差ありとした。

4. 研究成果

(1) 脳精神疾患による脳内異物解毒機構の部位特異的変動とそのメカニズムの解明

SE がラット脳 Ugt1a の発現に及ぼす影響

Ugt1a1 および Ugt1a7 mRNA の誘導率は、皮質と海馬にて NR ラットより SE ラットで有意に高かったため、KA 投与ではなく、SE が脳 Ugt1a1 と Ugt1a7 の発現を誘導すると考えられた (図 1)。小脳、線条体および視床では Ugt1a1 と Ugt1a7 の誘導は認められず、さらには、肝臓でも変化しなかったことから、脳 Ugt1a の誘導は神経細胞の興奮と関係があると推察された。SE は、海馬 CA 領域でのビリルビンや 5-HT 量を過剰に増加させ神経毒性を惹起することが報告されている。従って、SE により誘導された脳 Ugt1a は、これらを代謝することで神経細胞の保護作用を担う可能性がある。また、Ugt1a1 と Ugt1a7 は、酸化ストレスにより誘導されることが知られている。酸化ストレスマーカーである heme oxygenase-1 (HO-1) mRNA の誘導率は皮質と海馬で高かったことから、SE 誘発性の酸化ストレスによって Ugt1a1 と Ugt1a7 が誘導されたと考えられた。一方、Ugt1a6 は SE ラットと NR ラットでの増加率が同程度であったため、Ugt1a6 mRNA 発現量の増加は SE によるものではないと考えられた。

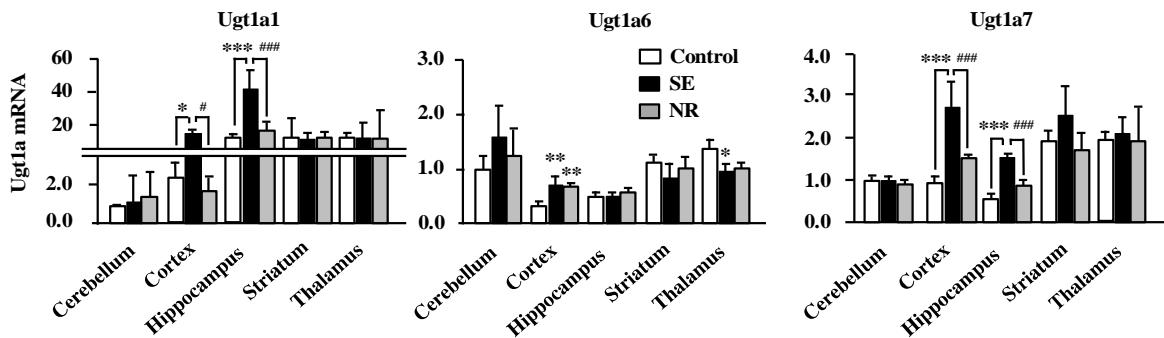


図 1. SE による脳 Ugt1a の発現変動

SE がラット脳 CYP2D4 の発現に及ぼす影響

SE が皮質および海馬での CYP2D4 の mRNA 発現量を減少させることを明らかにした (図 2)。また、NR ラットについても同様に検討したが、コントロールラットと比較して変化が認められなかったことから、KA 投与ではなく、SE が CYP2D4 の発現を低下させることが示された。従って、SE により炎症が生じた脳部位にて、CYP2D4 の発現が減少したと考えられた。また、主に CYP2D により触媒されるデキストロメトルフアン 0-脱メチル化酵素活性は、SE によって皮質と海馬で低下した。従って、SE による CYP2D の発現減少は、CYP2D で代謝される鎮痛薬の脳内薬物量および薬理効果に影響を及ぼす可能性が考えられる。

Oct-1 が CYP2D4 の転写開始点上流 -116 から -90 bp に存在する応答配列に結合することで、CYP2D4 の転写を活性化することが明らかにされている。そこで、SE が核内 Oct-1 タンパク質量に及ぼす影響を検討したところ、皮質と海馬で有意な減少が認められた。一方、小脳では変化しなかったことから、SE による核内 Oct-1 タンパク質量の低下により CYP2D4 の発現が抑制されたと考えられた。また、YY1 は、Oct-1 の応答配列への結合を阻害することで CYP2D4 の転写を抑制する。YY1 は、補因子である HDAC1 と複合体を形成することで機能する。そこで、共免疫沈降法により HDAC1 に結合した YY1 タンパク質量を定量したところ、皮質および海馬での増加が認められた。従って、SE により YY1 と HDAC1 との相互作用が増加することで、Oct-1 の応答配列への結合を阻害したと考えられた。

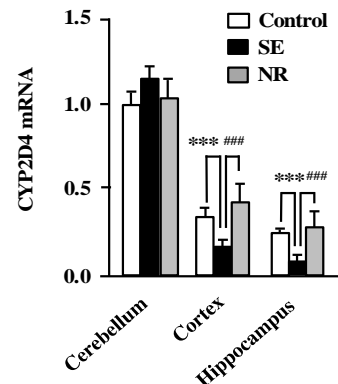


図 2. SE による脳 CYP2D4 の発現変動

SE がラット脳 CYP2J3 の発現に及ぼす影響

脳には多価不飽和脂肪酸が多く存在しており、これらの不飽和脂肪酸が脳形成や脳機能に多大なる影響を及ぼしていると考えられている。脳における主要な不飽和脂肪酸の一種であるアラキドン酸は、脳内では CYP2J に属する分子種によっても代謝されることが明らかになっている。そこで、SE による CYP2J3 の発現変動について検討した。その結果、CYP2J3 mRNA 発現量は、SE により皮質と海馬で低下することが明らかになった。一方で、小脳では低下が認められなかった。さらに CYP2J の指標活性であるアステミゾール 0-脱メチル化酵素活性は、SE により皮質と海馬で低下した。一方、小脳では本酵素活性に変動は認められなかった。これまでに、炎症性サイトカインが SE ラットの皮質と海馬において増加するが、小脳では変動しないことが報告されている。従って、てんかん発作の伝播と CYP2J3 の減少は関連していると考えられた。

(2) 脳精神疾患治療薬による脳内異物解毒機構の部位特異的変動とそのメカニズムの解明

CBZ がラット脳 Ugt1a6 および Ugt1a7 の発現に及ぼす影響

CBZ 投与により小脳、梨状皮質および海馬において Ugt1a6 と Ugt1a7 が共に誘導されることを明らかにした (図 3)。従って、CBZ による Ugt1a6 および Ugt1a7 の mRNA 発現量の増加は、共通のメカニズムによる可能性が示唆された。また、Ugt1A6 の指標活性である 5-HT グルクロン酸抱合活性の誘導率は、Ugt1a6 mRNA

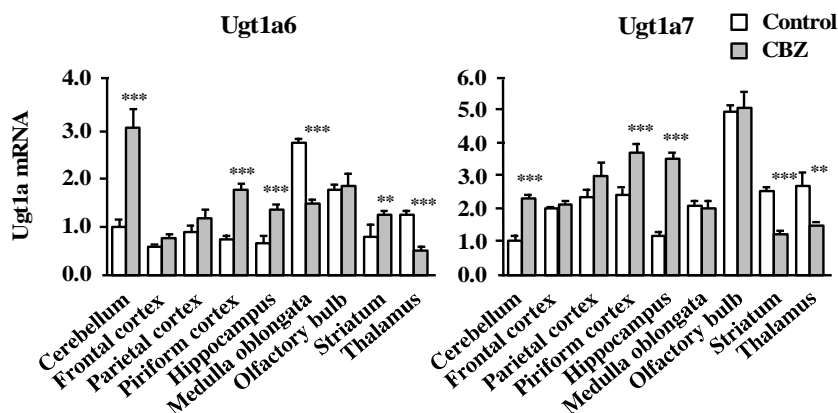


図 3. CBZ による脳 Ugt1a6 と Ugt1a7 の発現変動

の誘導率と相関したことから、Ugt1a6 mRNA 発現量が増加することで Ugt1a6 酵素活性が増加したと示された。ラット脳において常的な pregnane X receptor mRNA 発現が認められなかったことや、核内 Nrf2 タンパク質量に変化が認められなかったことから、CBZ によるラット脳 Ugt1a6 および Ugt1a7 の誘導は pregnane X receptor や Nrf2 を介さないと示唆された。CBZ 投与により、小脳、梨状皮質にて核内 CAR タンパク質量が増加したことから、CAR を介した機序により Ugt1a6 と Ugt1a7 が誘導されたと考えられた。しかし現在のところ、ラット Ugt1a6 と Ugt1a7 の転写開始点上流に存在する CAR の結合領域は同定されていない。一方、海馬では核内 CAR タンパク質量は増加しなかったことから、他の機序により Ugt1a6 と Ugt1a7 が誘導された可能性がある。さらに、CBZ は HepG2 細胞において HDAC 活性を阻害したことが報告されているが、ラット脳では H3K9ac タンパク質量に変化が認められなかったことから、CBZ はラット脳 HDAC 活性に影響を及ぼさなかったと示唆された。H3K4 パンメチル化は転写を活性化するが、H3K9 モノメチル化は転写抑制に働く。CBZ によって H3K4 パンメチル化の増加と H3K9 モノメチル化の減少が小脳、梨状皮質、海馬にて共に起こらなかったことから、Ugt1a6 と Ugt1a7 の誘導に対するこれらヒストンメチル化の寄与は低いと考えられた。

DZP がヒト UGT1A1 および UGT1A6 の発現に及ぼす影響

DZP を HuH-7 細胞に曝露したところ、UGT1A1、UGT1A6 とともに発現量の減少が認められた。ラットでは、SE 後にジアゼパムを投与すると Ugt1a1 の増加率は低下した。これより、種差を考慮する必要はあるが、てんかん治療薬がてんかん発作により生じた UGT の発現変動を抑制する可能性があると考えられる。

DZP 投与が SE によるラット脳 Ugt1a の変動に及ぼす影響

DZP の単回投与後の脳内 DZP 量には部位差は認められなかったが、SE 誘発性の H0-1 の発現誘導は皮質でのみ低下した。神経細胞は、不飽和脂肪酸を多く含むために過酸化反応を受けやすいことが知られている。そこで、脂質過酸化反応の最終産物である TBARS を定量した結果、SE により増加した TBARS 量は DZP の単回投与により CT-Saline ラットと同程度まで減少した。Ugt1a1 mRNA の誘導は、DZP の単回投与によって海馬では減少したが、皮質では変化しなかったことから、DZP 投与による Ugt1a1 の誘導の抑制には、酸化ストレスとは異なる機序が関係すると示唆された。また、Ugt1a7 の誘導率は、皮質と海馬では DZP の単回投与により有意な減少は認められなかったことから、SE 後に DZP を単回投与した場合の Ugt1a1 および Ugt1a7 発現量の変動は、脳部位と Ugt 分子種により異なることが明らかとなった。Ugt1a7 mRNA の誘導は、DZP を連続投与しても抑制できなかったことから、DZP を連続投与しても、一度生じた Ugt1a7 の増加は長期間持続すると示唆された。

(3) 疾患の発症要因の変動による異物解毒機構の変動の解明

てんかん発作は神経細胞における過剰興奮が原因と考えられており、その過剰興奮の一因として、細胞へのナトリウムイオンやカリウムイオンの流入が挙げられる。細胞内カルシウムイオン濃度を変動させる化合物であるタブシガルギン、シクロピアゾン酸、A23187、BAPTA-AM を T98G 細胞に曝露し、薬物代謝酵素の発現変動を明らかにすることを目的に検討した。その結果、タブシガルギンの曝露により UGT1A6 mRNA の発現量はコントロールと比較して有意に低下した。タブシガルギンは、小胞体内へカルシウムイオンを取り込む Sarco/endoplasmic reticulum Ca_2^+ -ATPase (SERCA) の阻害薬である。タブシガルギンと同じく SERCA 阻害薬であるシクロピアゾン酸によっても同様に、UGT1A6 mRNA は有意に減少した。カルシウムイオノフォアである A23187 の曝露により UGT1A6 mRNA 発現量は減少したが、キレート薬である BAPTA-AM によっても変動が認められなかった。

以上より、脳精神疾患や脳精神疾患治療薬により脳内異物解毒機構の部位特異的変動が認められること、また、その変動は、全容は解明できていないが、核内受容体を介する可能性があることを明らかにした。さらに、疾患の発症要因の変動により、異物解毒機構が変動する可能性も示唆された。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

Asai Y, Tanaka H, Nadai M, Katoh M. Effect of status epilepticus on expression of brain UDP-glucuronosyltransferase 1a in rats. *Biopharm Drug Dispos.* 39:75-82, 2018. doi: 10.1002/bdd.2114. 査読有

Asai Y, Tanaka H, Nadai M, Katoh M. Status Epilepticus Decreases Brain Cytochrome P450 2D4 Expression in Rats. *J Pharm Sci.* 107:975-978, 2018. doi: 10.1016/j.xphs.2017.11.010. 査読有

Asai Y, Sakakibara Y, Nadai M, Katoh M. Effect of carbamazepine on expression of UDP-glucuronosyltransferase 1A6 and 1A7 in rat brain. *Drug Metab Pharmacokinet.* 32:286-292, 2017. doi: 10.1016/j.dmpk.2017.09.002. 査読有

[学会発表](計 4 件)

Katoh M, Asai Y, Nadai M. Status epilepticus changes brain cytochrome P450 2J3 expression in rats. 22nd Microsomes and Drug Oxidations (MDO) and 33rd Japanese Society for the Study of Xenobiotics (JSSX) meeting (Kanazawa) 平成 30 年 10 月 2 日

Asai Y, Tanaka H, Nadai M, Katoh M. Effect of status epilepticus on expression of brain ugt1a in rats. 日本薬物動態学会第 32 年会 (東京) 平成 29 年 11 月 30 日

Asai Y, Katoh M, Sakakibara Y, Nadai M. Mechanism on Ugt1a6 and Ugt1a7 induction by carbamazepine treatment in rat brains. 日本薬物動態学会第 31 年会 (松本) 平成 28 年 10 月 13 日

Asai Y, Katoh M, Sakakibara Y, Nadai M. Effect of carbamazepine on expression of UGT1A6 and UGT1A7 in rat brain. International Workshop on Conjugation 2016 (Vancouver, Canada) 平成 28 年 6 月 20 日

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：灘井 雅行

ローマ字氏名：(NADAI, Masayuki)

所属研究機関名：名城大学

部局名：薬学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 00295544

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。