

令和元年6月27日現在

機関番号：32657

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K12880

研究課題名(和文) アビジン・ビオチンを利用した微生物への機械部品の接着による高機能性付与

研究課題名(英文) Attachment of mechanical parts to microorganisms using avidin/biotin bonding for giving the high functionality as living micromachines

研究代表者

伊東 明俊 (ITO, Akitoshi)

東京電機大学・工学部・教授

研究者番号：50211743

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：アビジン・ビオチンの結合を利用して、原生生物やバクテリアに物体を接合して利用する可能性を検討した。原生生物へのビオチンコートは、生理活性を落とさず処理することが困難であった。一方でバクテリアは生理活性を保った状態でコート可能であり、混在培養による自然接着、光ピンセットとマイクロピペットを利用した強制接着を検討した。後者は、サイズの小ささから、狙った位置への接着はまだ難しい。前者においては、菌体前方にビーズがつくことが多く、大きなビーズをつけて高速遊泳できるため、動力源として有望である。また、菌体が連続回転するテザードセル状態となる場合があり、これは、連続振動を与える応用が可能である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

サイズの小さいバクテリアに機械的仕事をさせようという試みはほとんどなく、生物学の実験においてアビジン・ビオチン結合は利用されているものの、それをマイクロマシンの作業用具に利用しようという視点で使う研究はない。今回の研究で、枯草菌の菌体前方にアビジンビーズを接着したものが、枯草菌の化学走性で操ることによって、動くマイクロビーズとして物体輸送に利用可能であることを示せたことは学術的、社会的に意義がある。また、菌体が連続回転するテザードセル状態のバクテリアを、ビーズをコントロールすることで弱い連続振動を与える振動減として利用可能であることを示せたのも、学術的・社会的に意義深いと考えている。

研究成果の概要(英文)：We examined the possibility of using an avidin-biotin bond to attach an object to a protist or a bacterium. Biotin coating on protists was difficult to process without loss of physiological activity. On the other hand, bacteria can be coated while maintaining physiological activity, and natural adhesion by mixed culture and forced adhesion using optical tweezers and micropipette were examined. The latter is still difficult to bond to the target position because of its small size. In the former case, beads are often attached in front of the cells, and large beads can be attached for high-speed swimming, which is promising as a power source. In addition, the cells may be in a continuously rotating tethered cell state, which can be applied to give continuous vibration.

研究分野：メカノバイオフィジオンシステム

キーワード：バクテリア 行動制御 アビジンビーズ 作業用具 マイクロマシン

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

マイクロマシンを考える上で、ナノレベルの構造を持つ素材で構成しようとする時、現時点では、各種の生物自身および生物由来素子を利用することが、もっとも手っ取り早い方法であろう。この観点から、生物と機械が融合した微小機械システムを作ろうという研究は、徐々に増えつつある。生物・生体由来素子と機械システムを融合しようという試みとしては、大きく分けて、a) 生体由来素子レベル、b) 細胞レベル、c) 個体レベルがあり、a) の生体由来素子レベルの研究が、古くは清水・矢野らのアクチン・ミオシンによる生物分子モータをはじめとして様々な挑戦がある。また、しかしながら、生体構成物質を細胞から取り出してシステムに組み込む方法は、細胞の補修機構を利用できないため、生体高分子のナノレベルのメカニズムが熱揺動などにより損傷したら終わりのため、長期間の利用には全く目処が立っていない。b) のセンサとしては、東京大学の神崎らが、昆虫の嗅覚システム構成細胞を遺伝子工学で再現し、をロボットに融合しようとしている。アクチュエータ・動力源としては、ラットや昆虫の筋肉細胞自体をロボットの駆動源に使用しようとする大阪大学森島らの研究がある。これらの多細胞生物の細胞を取り出して利用する場合、細胞の補修機構は利用できることになるが、細胞の安定培養、細胞と機械システムとのインターフェース、制御の問題など、困難な問題が多い、c) の個体レベルの利用に関しては、北陸先端科学技術大学院大学の平塚らの、マイクロ加工技術で通路を構成し、それに沿って歩くマイコプラズマにてマイクロロータを回転させる研究がある。この場合、a, bの持つ問題点はないが、行動制御はしておらず、マイコプラズマの自由行動を利用している。以上の研究いずれも、本来生物・生体材料が持つ機能を利用しているものであり、用具・人工物と生物を融合させることで、生物の機能を拡張しようという研究例は、申請者らの研究を除きまだ見られない。

申請者らは、ゾウリムシにワッシャ状作業用具を取り付け、それにより搬送能力を向上させること、オオミジンコに針を取り付け、オオミジンコ単体では実施不可能な風船の破壊作業をさせること等に成功してきた。これらは、微生物の機能を作業用具により拡大した先駆的な例であると自認している。しかしながら、ここで使った作業用具の取り付け法は、物理的にははめ込んだり、いわゆる瞬間接着剤により貼り付けるといふ、プリミティブな方法で、細菌レベルのサイズまで通用する方法ではない。更なる発展を図るには、用具装着に、もっとエレガントな手法を導入する必要がある。

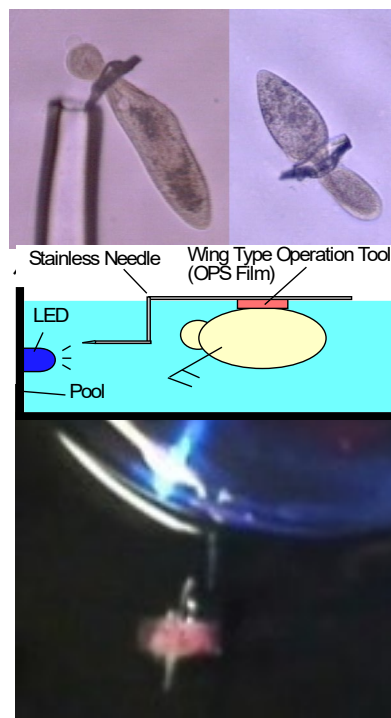
アビジン・ビオチンは、その強力な接着作用を利用して、様々な微小部品を細菌レベルの菌体に接着している実績がある。これにより、微小部品を自在に微生物に装着する技術が確立すれば、微生物を生きたマイクロマシンとして利用しようという目論見を大きく展開させられるものと申請者は信じている。

① 微生物を生きたマイクロマシンとして利用しようというプロジェクトにおいて、上述の例では、まだ応用開発の展望が開けたとは到底言えず、サイズの小型化への対応が最も重要な課題となる。本提案の手法は、既に生物物理学の実験分野で、最小の細菌(生物)であるマイコプラズマの出力を測定したり、さらに高度な細胞内のモーター分子の力学測定に利用したりされており、様々な実績があり、本提案の各種用具を微生物に接着すること自体の実現可能性は、極めて高いと思われる。本提案は、かなり奇矯なものに見える可能性があるが、申請者の考えでは、このような方向で微生物を利用しようという研究者がこれまでほとんどいなかったと言うだけで、その手法は科学的に妥当であり、実現の可能性も低くなく、本研究から、新たな微生物利用の分野が立ち上がるものと期待している。

2. 研究の目的

原生物や細菌などの微生物にアビジン・ビオチンの強力な接着反応を利用して様々な作業用具となる人工物を接着することで、「生きたマイクロマシン」として微生物を応用する可能性を調査することを目的としている。体長200 μm のゾウリムシから、数 μm の細菌まで、様々な微生物に対してプラスチック部材の接着を試みる。接着操作には、通常のマイクロマニピュレータおよびレーザー光ピンセット法を併用する。微生物の細胞膜/細胞壁の性状、繊毛などの運動器官の有無と、接着特性、生理活性への影響などを調べる。その上で、走性を利用した微生物の行動制御手法と関連させ、マイクロマシンとしての各種用途への応用展開を図っていく。

近年のマイクロ加工技術の進展は、センサなどを中心に、様々なこれまで不可能であった応用を可能にしてきた。しかしながら、独立型、自立型のマイクロマシンについては、装置構成、エネルギー供給、制御など、多くの面で、現実的にはまだ困難であると言わざるを得ない。



針を装着したミジンコによる風船の破壊作業

一方で、目を自然界に向けてと、様々な微生物たちが存在し、これらは、センサ、アクチュエータ、制御装置、全てナノレベルの構造で構成された、極めて高度なマイクロマシンであるにとらえることもできる。これらを「生きたマイクロマシン」として工学や医学分野で応用できれば、これまで実現不可能であった様々な応用用途が開ける可能性がある。

しかしながら、微生物をマイクロマシンとして利用する上で、問題が二つある。「制御」と「機能の付与」である。前者の制御に関しては、これまでの筆者の一連の研究により、小型多細胞プランクトン、原生生物、バクテリアなどを問わず、電場、光、化学物質の濃度勾配などに対する走性を利用することで、各種の制限はあるものの、利用者の目的に合わせて行動制御することが可能であることを、実験的に示してきた。行動制御に関しては、ある程度の見通しが得られた段階と言えよう。

一方で、後者の機能の付与に関しては、ワッシャ状プラスチック部材にゾウリムシを挿入して利用すると、物体の運搬作業効率を上げることに実験的に成功したが、物理的に微生物に部品をはめ込んで装着する方法はとても難しく、実用化には大きな課題があった。

またオオミジンコの背中にプラスチック棒を化学接着し、作業用具として使って物体搬送作業をさせ、搬送効率が向上することも明らかになった。しかしながら、通常の接着剤を使った装着方法では、ミジンコ類への装着が限界であり、サイズの小さな原生生物やバクテリアへ作業用具を化学接着により装着することは、ほとんど不可能であった。

一方で、生物物理学の研究分野では、様々な生体分子モータや、また微生物自身に、アビジン・ビオチンを使ってプラスチックビーズを接着し、それにより光ピンセット法で各種操作や力学計測を用いる研究が多く見られる。この技術を使えば、原生生物からマイコプラズマなどの極小バクテリアに至るまで、各種の微生物に作業用具を装着することが可能になるのではないかと考えられる。本研究は、この可能性を検討することを目的とする。

研究期間内に、各種原生生物・バクテリアへのアビジン・ビオチンによるプラスチック器具の接着方法、接着による生理的影響、遊泳能力、行動制御特性への影響を調べる。本研究を基礎として、原生生物からバクテリアに至る様々な微生物へ人工部品を装着する基礎技術が確立できれば、様々な機能を微生物に持たせることが可能になると考えられ、例えばドラッグデリバリーやマイクロレベルの体内手術など、医学的応用が視野に入ってくる。生物学分野も、元々のマニピュレータが微生物であり柔軟構造である特徴を活かせれば、応用用途として有望であろう。また、独立型マイクロマシンとしての特徴を使い、外部から直接マニピュレータなどを挿入不可能な込み入った場所での操作を行える点が有効に使える応用用途であれば、工学分野においても、活用できる分野はあると思われる。

3. 研究の方法

最初に、アビジン・ビオチンの接着特性を把握するため、原生生物や小型プランクトンなど、大型の微生物を用い、マイクロマニピュレータを用いて小型部品への接着を試みる。

これまで、微生物に作業用具を装着するために用いられてきた方法は、前述のように、物理的にははめ込む方法と、いわゆる接着剤による化学接着のみである。

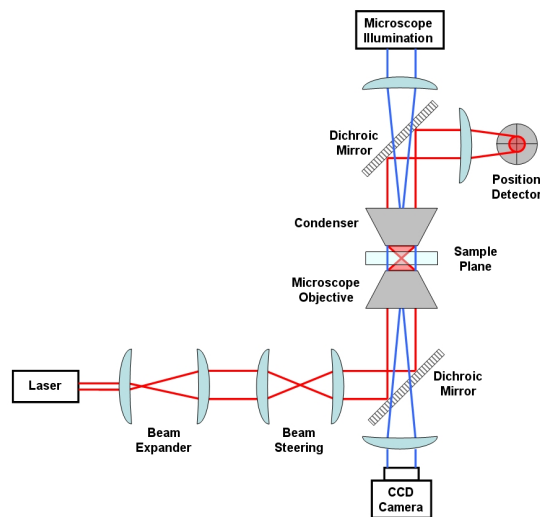
しかしながら、生物物理の分野では、例えば大阪市立大の宮田らは、マイコプラズマの滑走力を測定するのに、マイコプラズマにプラスチックビーズを接着し、ビーズを光ピンセットに固定することで、マイコプラズマの滑走力を計測している。このような特に微小な微生物に対して一桁 μm サイズの部品を接着する上で用いられている方法が、トリコーナル抗体による接着、あるいはアビジン・ビオチンの反応による接着である。特に後者は接着力が強力で、様々な生体物質（蛋白質、DNA、・・・）を金電極に接続したり、ひも状蛋白質を介してビーズを接着したり、様々な用途に利用されている。

この方法では、単分子層の厚さでの接合が可能であり、生体高分子の一部を接着するなどの利用も可能なことから、接着剤による接合とは比較にならないほど、接合による影響範囲を狭く限定できる。この技術を、微生物への作業用具の装着に利用しようというものである。

研究は、以下の手順で行って行く

・大型微生物へのアビジン・ビオチンによる作業用具の接着

最初に、アビジン・ビオチンによる、微生物へのプラスチック部材の接合を、数100～数10 μm レベルのサイズから確認していく。このサイズでは、通常のマイクロマニピュレータ、マイクロピペットの圧力調整による物体の固定・開放などの技術で、実験が可能であろう。対象とする微生物は、これまでの行動制御技術が確立されている、ゾウリムシ、ミドリムシ、



レーザー光ピンセットの一般的構成

テトラヒメナなどである。サイズはさらに大きくなるが、外骨格を持つオオミジンコについても本手法適用の可否を実験する。アビジン代替物質として用いられているストレプトアビジンについても実験し、アビジンとの違いを比較する。

・小型微生物作業用具装着システムの開発

平行して、バクテリアなどの小型微生物に作業用具の装着を可能にするための実験システムの構築を行う。レーザ光ピンセット、ナノマニピュレータを組み合わせ、小型微生物の固定・操作、レーザ光ピンセットによるビーズの操作を行えるようにする。

■バクテリアへのビーズ取り付け法の検討

レーザ光ピンセットとナノアクチュエータを利用した小型微生物への物体装着システムを利用し、実際に枯草菌、乳酸菌、マイコプラズマ・モビーレなどにマイクロビーズを接着する。そのために、バクテリアの捕捉、固定、開放を実現する装置を開発していく。具体的には、ゾウリムシで用いてきたマイクロピペットを用いた方法、走性を使った化学物質による誘引、マイクロチャンネルなどの通路の物理的規制による方法などから検討を開始する予定である。

・大型微生物への作業用具装着による新機能の付与

平行して、原生動物や多細胞プランクトンレベルの大型の微生物に対して、より複雑な機能を持たせた作業用具を装着することで、これまでできなかったような新機能を付与することを試みる。例えばロック機構つきはさみを構成して、物体を挟んで微生物に装着することを試みる。ゼリー状物質を装着・開放できる作業用具を微生物に実装できれば、必要な薬液を患部に運ぶ、ドラッグデリバリーへの応用が見えてこよう。

微生物用の加工工具についても検討を行いたい、生体材料の切除が可能になれば、体内微細手術への応用も見えてこよう。

・小型微生物へ装着する作業用具の開発

サイズがバクテリアレベルになると、物体の移動、組み立て、装着などに対する難易度は飛躍的に増大する。現時点では、ナノアクチュエータとレーザ光ピンセット法を使っていく必要がある。レーザ光ピンセット法で捕捉できるのは、光が捕捉方向へ屈折する透明の球体に限られるため、光ピンセットで操作するためには作業用具に操作ポイントとしてのビーズを装備させておかなければならない。しかしサイズが数 μm レベルになると、ビーズとロッドや板などのプラスチック部材と組み合わせて組み立てるのは、とても困難な課題である。複数のプラスチック部材を組み合わせる上で、鎖状蛋白質をアビジン・ビオチンでプラスチック部材に接着し、鎖状蛋白質を介してプラスチック部材を接合していく方法で組み立てること検討する。これに成功すれば、複雑な構成の微小メカニズムを構成する目処が立ち、微生物に搭載可能な作業用具の複雑性を一気に増加できる可能性がある。そうなれば、より複雑な機能を持つ作業用具を搭載することで、微生物が生きたマイクロマシンとしてしうる仕事のレベルを、大幅に向上させ、複雑な応用が具現化するであろう。

4. 研究成果

・ミドリムシ・クラミドモナスへのアビジンビーズの接着

最初に一般的な方法でミドリムシと枯草菌にビオチンコートしたところ、ミドリムシにビオチンコートをするとう活性が落ちてしまうが、バクテリアであればビオチンコートしても生理活性が落ちないことが判明した。しかしながら、バクテリアはサイズが小さいため、光トラップやマニピュレータを用いた操作が困難であり、実験しづらい。そこで、もう少し大きな原生動物の中で生理活性が落ちない種類がないかを探すため、遊泳能力の高いクラミドモナスを使って実験することにした。

最初に、ビオチンコートにより原生動物の生理活性が低下する問題について、ビオチン化試薬の量が不適なために活性が落ちると考え、試薬の量を変えて実験した。しかし濃度を変えても活性の低下は防ぐことができなかった。

そこで次に、ホールディングピペットにクラミドモナスを吸着した状態で、クラミドモナスに部分的にビオチンコートする方法を試した。ホールディングピペット内にビオチン化試薬を入れたり、ホールディングピペットにクラミドモナスを大部分格納した状態で外からビオチン試薬を吹きかけたりしたが、いずれの場合も、生理活性は大幅に低下し、部分的に試薬を付けても、生理活性を改善することはできないと判明した。

このことから、活性低下の原因として、試薬の溶媒として用いているPBS(リン酸緩衝生理食塩水)の影響を考え、これを精製水に変更したところ、鞭毛が損傷する個体の数が減った。この条件で再びビオチンコートしたクラミドモナスとアビジンビーズを混ぜておき、自然な衝突により接着させる実験を行ったところ、ビーズをつけて泳ぐクラミドモナスを発見した。

ようやく生きたクラミドモナスへのアビジンビーズの接着が可能になった。しかし実験の結

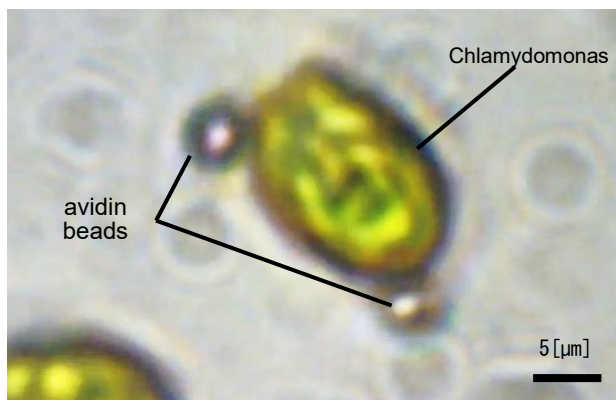


Fig. Avidin beads are bonded chemically to a living chlamydomonas

果からクラミドモナスへのビオチンコートは、その作業自体が、クラミドモナスの生理活性に重大な影響を与えている可能性が高いため、根本的な解決にはビオチン標識薬の開発が必要であるものと思われる。

・枯草菌へのアビジンビーズ接着と挙動調査

研究対象を細菌の一種である枯草菌に変更することにした。枯草菌の体長は約2[μm]である。納豆菌も枯草菌の一亜種であり、人体への悪影響はない。

この枯草菌に対してアビジンビーズの接着を試みた結果、遊泳速度の低下は見られたものの、観察しうるほぼすべての個体がうごめいており、ビオチンコートにより生理活性を失う枯草菌は見られなかった。また、アビジンビーズをつけて泳ぐ個体も確認することができた。

そこで、今後はこの枯草菌を使った実験を行っていくことにした。

次に、マイクロピペットの操作と光トラップを用いて、任意の位置関係で接着を行うことを試みたが、枯草菌のサイズがあまりにも小さいことから、接着をコントロールすることが難しいことが判った。そこで、ランダムに接着される枯草菌とビーズの中から、作業を行わせるのに適したものを取り出すことを考えた。最初に接着パターンによりどのような挙動を示すのか、ビーズ付き枯草菌の挙動を調べた。

ランダムに接着された枯草菌とビーズの接着パターンを右図に示す3つのパターンに分類した。

Aは細胞先端が接点になっている。この場合、枯草菌の進行方向の部位にビーズが接着されている。このパターンが最も多く見られた。細菌が前方へ進行中にビーズと衝突することで接着したと考えている。観察事例33例中22例が、この接着パターンであった。

Bは細胞の側方が接点となっている場合である。この位置関係で接触することが稀なためか、あまり多くは見られなかった。33例中7例を占めた。

Cはべん毛がビーズに接着されており、稀ではあったが特徴的な動きをするものがいた。この動きは、細菌のべん毛が連続回転する証拠として発見された、いわゆるテザードセルである。Cの接着は、33例中4例であり、うち2例がテザードセル状態であった。

Aの中にはビーズが接着されていない時同様に活発に遊泳している個体が多く見られた。遊泳速度は枯草菌単体で23.1[$\mu\text{m}/\text{sec}$]なのに対し16.7[$\mu\text{m}/\text{sec}$]と3割弱の低下であったため、枯草菌の強い遊泳力がうかがえる。接着されているビーズは枯草菌自体よりも大きい他物体への衝突確率が大きく向上し、物体搬送等の作業を行わせる上で非常に有利になると考えられる。

Bでは泳ぎ回る個体は確認できず、その場でブラウン運動よりは大きく揺れるものが少数見られた程度であった。観察前は、このような接着で、ビーズが連続回転するようなものを作れるのではないかと考えていたが、実際に観察すると、この接着パターンでは、細菌つきビーズは、ブラウン運動的な挙動以外ではほとんど動いていないことが分かった。すなわち、細菌が泳ぐできないような接着の仕方になっているのではないかと考えられる。

Cは細菌がビーズをけん引するように泳ぐものが少数(二例)いた他に、べん毛モータによって菌体側が連続回転する、いわゆるテザードセル状態の個体が見られた。(二例)この、細菌菌体が連続回転し続ける現象は、いわゆる物体搬送用途としては利用しづらいが、細菌を使って微小物体を回転させたり、連続振動を発生させたり、より高度な用途としての応用が考えられ、大変興味深い。

接着確率の向上策についても検討した。細菌とビーズの接着はまだコントロールできていないため、容器内で混合して、細菌とビーズが自然に接着する接着方法を行っている。

しかし、調査したところでは、細菌が接着されているビーズはほんの数パーセントであった。よって、接着確率を向上させることが必要であった。

そのために、ビオチンコートした細菌とアビジンビーズを混ぜた培地に振動を与えた。

42000[Hz]の超音波加振機で1日1時間振動を加えて数日間観察したところ、観察したすべての培地において、接着率が2倍になっていることが確認できた。よって、以降の実験では、超音波加振を使用し、加振を行うことでビーズと細菌の接着率を向上させて実験を行った。

なお、ビオチンコートの方法やビーズの再選定等については、今後行っていく予定である。

・ビーズ付き細菌による物体の移動実験

ビーズが接着された細菌についての各種挙動の観察から、当初は、細菌と作業用具接着のためのつなぎとして想定していたアビジンビーズ自体が、微生物の作業効率を向上させる可能性や、または単体では行えない仕事を可能にする作業用具として機能する可能性が得られたため、その検証を行うことにした。

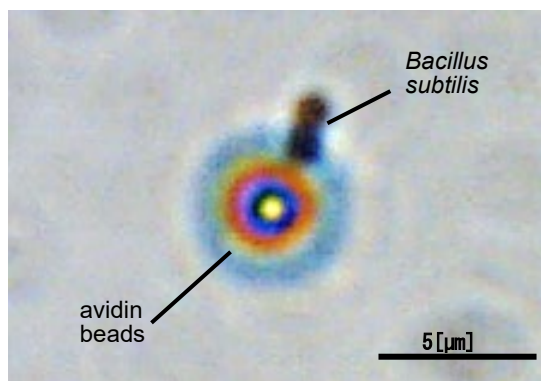


Fig. A *Bacillus subtilis* is bonded chemically to an avidin bead

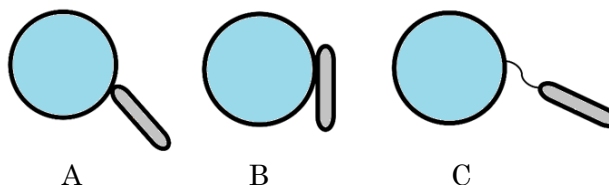


Fig.5 bonding patterns of beads and *Bacillus subtilis*

最初にパターン A の利用を検討した。ビーズを接着された枯草菌は、搬送物体との接触面積が増大することから、物体搬送などが行いやすくなると考えられる。その検証を行った。

搬送する微小物体として砥粒の一種である GC 微粉 #3000(炭化ケイ素研磨剤)を用いた。枯草菌の行動制御は化学走性を使った方法でしか実現できておらず、制御が大変困難なため、行動制御するのではなく、遊泳するビーズ付き枯草菌が GC 微粉を押している様子を探索し、それを観察することにした。その結果として、図に示すような、枯草菌の遊泳力によって GC 微粉を回転させる様子を確認することができた。他にもビーズ付き枯草菌が GC 微粉に影響を与えている様子は確認できたが、回転させることができたのは 1 例のみであった。枯草菌単体で影響を与えられている様子は見られなかったため、ビーズの存在によって枯草菌の能力が向上できたと考えられる。

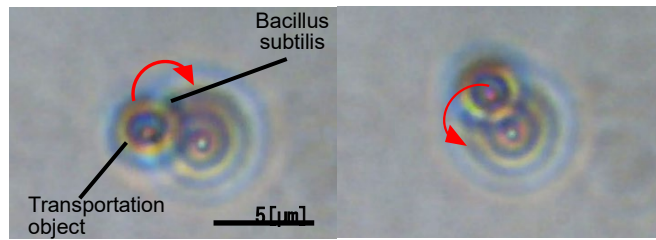


Fig. Vibrating the objects by continuously rotating

このように、ビーズ付き枯草菌での物体搬送が行えると考えられるため、次に、枯草菌が持つ走化性を利用して、集まってくるビーズ付き枯草菌より物体を搬送する実験を行った。実験方法としては、内部に塩酸を満したマイクロピペットをプール中に配置し、塩酸に誘引されて集まってくる枯草菌の遊泳力で GC 微粉を搬送することを狙った方法である。

結果として、枯草菌とビーズ付き枯草菌がピペット先端に集結する様子が見られるものの、ビーズ付き枯草菌によって物体が搬送される様子は確認することができなかった。このようなマクロスコピックな方法では、制御が粗すぎ、微小物体に衝突して搬送できる確率は高くなく、ピペット先端へ菌体は集まるが、それによって押される搬送物体がそこまで搬送されることはほとんどないのであろう。解決の方法として、搬送物体と接着する・集団を扱う・搬送物体に引っかかる形状の作業用具を接着する等が考えられる。今後検討していきたい。

次に、パターン C の利用を検討した。べん毛が接着されているパターン C では菌体が連続回転する、テザードセル状態になる場合があることが、確認されている。そこで、この状態の枯草菌の利用について検討してみることにした。連続回転する枯草菌がくっついているビーズを光トラップし、別のビーズを近づけてぶつけることで、別のビーズに影響を与えることができるか、検証した。テザードセル状態の結合を作り出すのは偶然に頼っており、まれなため、このような状態の結合を発見次第、実験を行ったところ、枯草菌の連続回転によってビーズが 1 往復だけ大きく振れる様子が確認できた。この結果から菌体の連続回転を利用して他の物体を動かすことが可能であったため、今後は微小羽根車の駆動への利用を検討していきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

〔学会発表〕 (計 2 件)

1. 日本機械学会 Robomech2018, © 廣岡孝介, 早坂望, 伊東明俊, “アビジン・ビオチン接着による微生物用作業用具装着方法の検討”, 2P1-G08, 2018
2. 日本機械学会 Robomech2019, © 廣岡孝介, 伊東明俊, “アビジンビーズを結合した枯草菌の生きたマイクロマシンとしての機械的利用法の検討”, 2A2-R06, 2019

〔図書〕 (計 1 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者 なし

(2) 研究協力者 なし

※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。