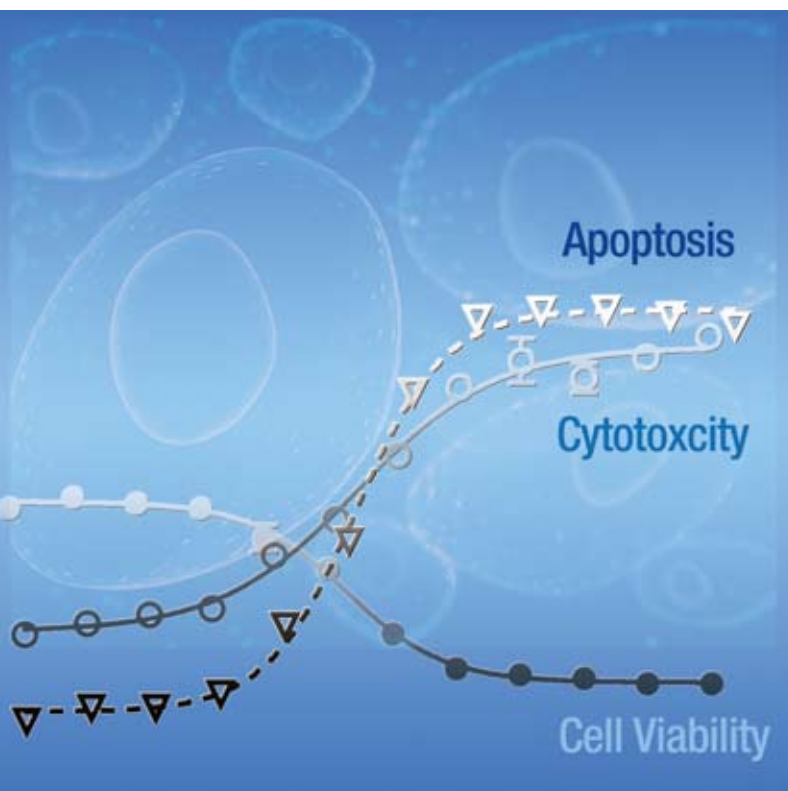


マルチアッセイガイド

培養細胞からより多くの情報を引き出すヒント



アッセイの項目

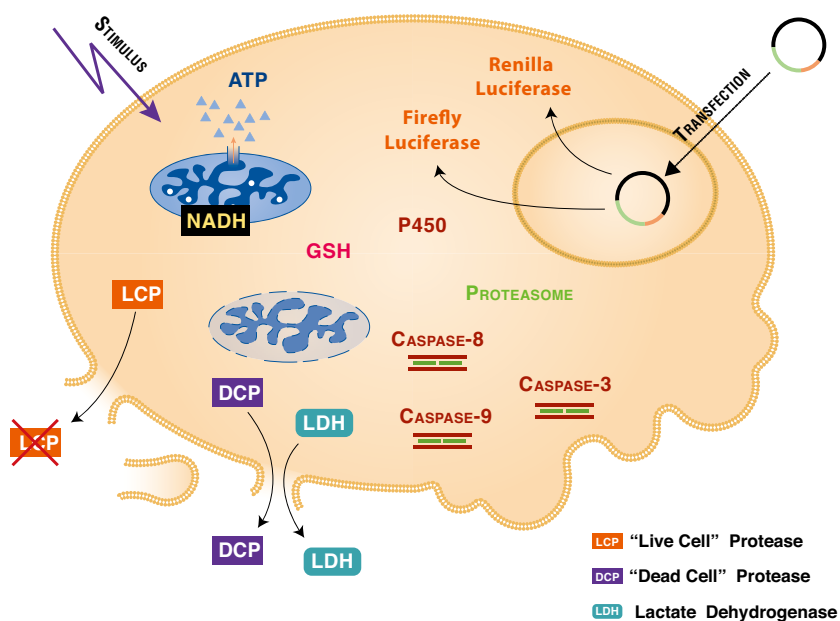
- 細胞増殖/毒性試験
- アポトーシスアッセイ
- レポーターアッセイ
- ADME/Tox アッセイ

マルチアッセイ

ゲノム分析からプロテオーム分析、細胞解析へと進むに従い、複雑性はよりいっそう高まり、分析対象を厳密に捕え、正確に解釈することがより困難になります。生体の複雑なシステムで特定の事象を調べる際にはそれに連動するマーカーを追跡します。培養細胞を用いた実験を行う場合にも、外部からの刺激や培養条件に対する応答性を様々なマーカーを用いて調べることができます。近年の生物学実験では分析項目や検体数が増加する傾向にあり、優れたマーカーの発見とそれに対する効率的なアッセイ法や試薬が望まれてきています。

1つのプレートの各ウェル内で複数マーカーを同時に測定するマルチアッセイは、データの精度を向上させることができると同時に時間や費用を節約することができます。現在、正確な生物学的情報を取得するために、生存性、アポトーシス、細胞毒性（ネクローシス）およびレポーター活性などのパラメータが用いられ、それらのマーカー（細胞内在性/外来性）の測定が行われています（下図参照）。これらのパラメータのいくつかを統合あるいは多重化してアッセイすることにより、1回の実験からより多くの情報を得ることができます。

2つの異なるレポーター酵素（細胞外来性マーカー）を測定するデュアル-ルシフェラーゼアッセイシステムはプロメガで開発され、分子生物学から細胞生物学における幅広い分野で利用されています。プロメガでは、これまでに蓄積された細胞ベースのアッセイ技術から新規バイオマーカーの創出、同時多項目解析を可能にするマルチアッセイ技術の開発を行い、培養細胞を用いた優れたアッセイ系を提案しています。



細胞ベースアッセイで用いられる様々なバイオマーカー

- ・各マーカーのアッセイシステムについては14ページ参照
- ・マルチアッセイの組み合わせ例については5ページ参照

マルチアッセイの最新情報については
www.promega.co.jp/multiassay.htmlを参照下さい。

バイオマーカー

細胞内在性マーカー

- ・細胞生存性：ATP、NADH、LCP（生細胞プロテアーゼ）
- ・細胞毒性：LDH、DCP（死細胞プロテアーゼ）
- ・アポトーシス：カスパーゼ 3/7、8、9
- ・酸化ストレス：GSH（グルタチオン）
- ・薬物動態：P450
- ・その他：プロテアソーム

細胞外来性マーカー（レポーター）

- ・ホタル-ルシフェラーゼ
- ・ウミシイタケ-ルシフェラーゼ

新規バイオマーカー：LCP, DCPについての詳細は以下の文献をご覧ください。

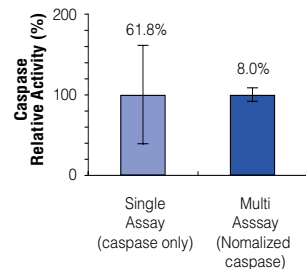
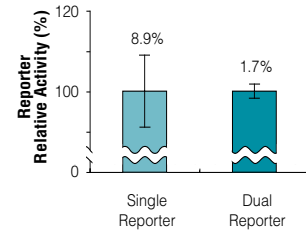
1. Prometech Journal **25**, 6-14
2. Niles, A. *et al.* (2007) *Cell Notes* **19**, 16-20
3. Niles, A. *et al.* (2007) *Anal. Biochem.* **366**, 197-206

マルチアッセイの利点

■ 情報・信頼性の増加

1) 補正用データ取得による正確性・信頼性の向上

- 培養細胞で実験を行う場合、様々な事象の数値化は細胞単位あたりの値として算出し、補正を行うことにより、細胞数などに依存しないデータが得られます。例えば、細胞生存性に関するパラメータを内部コントロールとして組み入れることで、データのバラツキの程度（変動係数: CV%）が抑えられ、実験間での比較や解釈も容易に行えます（右グラフ参照）。
- 外来性のマーカーであるレポーターを利用する場合、レポーターベクターを細胞内に導入する必要があります。この場合、レポーターアッセイで得られる値は細胞内に導入されたベクターの割合（トランスフェクション効率）に影響されるため、トランスフェクション効率について補正をかける必要性が生じます。デュアルルシフェラーゼレポーターシステムは、この問題を解決するために第2のレポーターを内部コントロールとして用いたシステムです（右グラフ、11ページ参照）。



補正されたカスパーゼアッセイおよびデュアルレポーターアッセイにおけるCV%の低減
棒グラフ上部にCV%を示す。

2) 異なるパラメーターを測定し、より多くの実験情報を取得できる

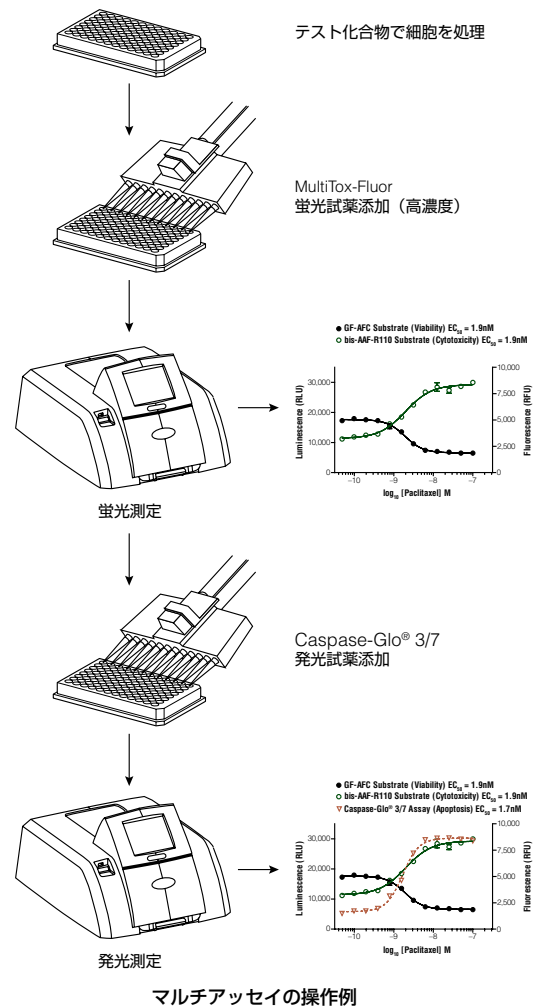
- 細胞死メカニズム:カスパーゼアッセイ(アポトーシス)と細胞膜完全性(ネクローシス)の測定
- タンパク質レベルと転写レベルのP450を測定:P450アッセイとレポーターアッセイなど

■ コスト・労力の削減

- プレート、ピペットチップなどの消耗品、試薬、テスト化合物などが節約できる。
- パラメータ測定ごとに培養細胞を用意する必要がない。
- アッセイを繰り返す労力と時間が節約できる。

マルチアッセイの操作概要

多くのマルチアッセイで採用される手法は、発光法と蛍光法を組み合わせたものです。プロメガにはすでに2つのアッセイが1つのマルチアッセイシステムとして機能する製品（Dual-Glo™, Multi-Tox など）と、単一のマーカーを測定する様々な製品を用意しており、組み合わせ可能な製品を用いてマルチアッセイをデザインすることができます（5ページ参照）。右図のプロトコルは、1つのキットで2つのパラメーター（細胞生存性と毒性）を測定できるMultiTox-Fluorと、カスパーゼ3/7活性を測定するCaspase-Glo® 3/7によるトリプルアッセイの例です。このプロトコルでは、高濃度のアッセイ試薬を用いて蛍光アッセイを最初に行った後に発光アッセイを行います。

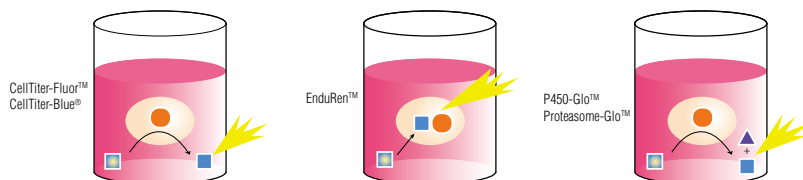


マルチアッセイを理解するために

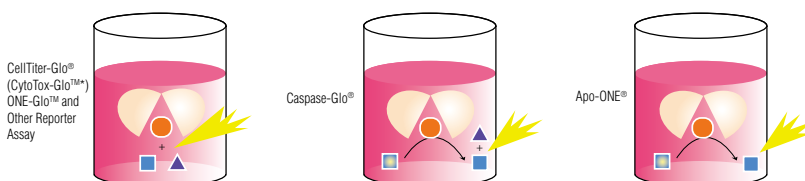
■ 細胞状態とアッセイケミストリー

マルチアッセイは、各アッセイ法に用いられるアッセイケミストリー（測定反応化学）が互いに適応するか隔離（時間的、空間的）されること、また、生じるシグナルを分離して検出できることが重要です。マルチアッセイをデザインするには、個々のアッセイ法で用いられるケミストリーを十分に理解する必要があります。マルチアッセイでは、反応試薬の組成、反応時の細胞膜の完全性（細胞膜を隔てた反応の独立性）、試薬の分注方法、発生するシグナルの特性などを考慮する必要があります。

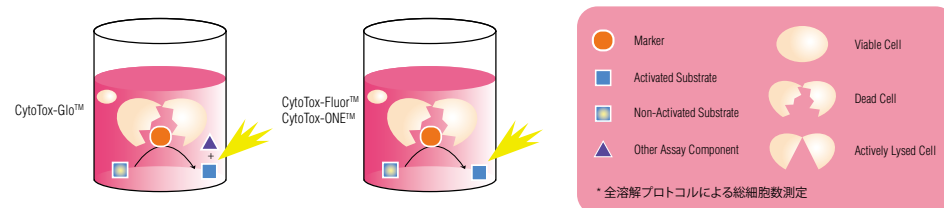
(I) 非破壊アッセイ



(II) 能動的破壊アッセイ



(III) 細胞死に伴う破壊アッセイ



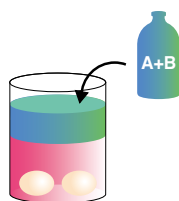
細胞状態とアッセイケミストリー

細胞非破壊アッセイ(I)はインタクトな生細胞を維持できるため様々なマルチアッセイに応用することができます。最初のアッセイが非破壊的に実施され、アッセイケミストリーが細胞に負の影響を与えなければ、第2のケミストリーの選択範囲が広がります。一方、能動的な細胞破壊アッセイ(II)は、界面活性剤などを含む試薬で強制的に全細胞を溶解するため、次のアッセイに細胞を用いることができない反面、破壊直前の細胞内の状況をスナップショット的に切り取ることで正確に知ることができ、長時間アッセイケミストリーに暴露して細胞生理に影響を与えるようなことはありません。通常、細胞非破壊アッセイの後に組み合わせます。細胞死に伴う破壊アッセイ(III)は、細胞死により細胞膜が壊れ、細胞の内容物が漏出したものを培養上清などを利用して定量し、細胞毒性、生存性を評価することができます。

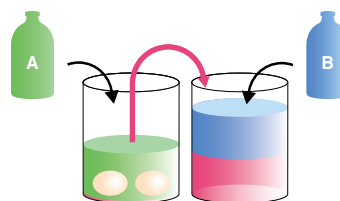
A. 同一ウェルに試薬を連続添加



B. 試薬のマスターミックスを添加



C. 細胞と上清に分けてアッセイ



試薬の分注タイプ

マルチアッセイにおける試薬の添加方式（分注タイプ）には大きく以下の3つがあります

- 同一ウェルに複数の試薬を連続して添加
- 複数のアッセイ試薬成分を含むマスターミックスを添加
- 培養細胞（マスタープレート）から培地の一部を別のプレートに分注し、それぞれをアッセイ

マルチアッセイの組合わせ

1st アッセイ	2nd アッセイ	分注タイプ*	シグナルの分離技術
細胞生存性および細胞毒性 (生プロテアーゼ) (死プロテアーゼ) MultiTox-Glo Assay		A	検出法 (蛍光-発光)
細胞生存性および細胞毒性 (生プロテアーゼ) (死プロテアーゼ) MultiTox-Fluor Assay		B	蛍光 (400Ex/505Em-485Ex/520Em)
細胞毒性および全細胞数 (死プロテアーゼ) (死プロテアーゼ) CytoTox-Glo™ Assay		A	細胞状態 (死細胞-細胞溶解)
細胞生存性 (生プロテアーゼ) CellTiter-Fluor™ Assay	レポーターアッセイ (ホタルルシフェラーゼ) ONE-Glo™ Assay 他	A	検出法 (蛍光-発光)
	アポトーシス経路 (カスパーゼ3/7 or 8 or 9) Caspase-Glo® 3/7, 8 または9 Assay	A	検出法 (蛍光-発光)
	細胞生存性 (ATP) CellTiter-Glo® Assay	A	検出法 (蛍光-発光)
	グルタチオンアッセイ GSH-Glo™ Assay	A	検出法 (蛍光-発光)
細胞生存性 (NADH) CellTiter-Blue® Assay	アポトーシス (カスパーゼ3/7) Apo-ONE® Caspase-3/7 Assay	A	蛍光 (560Ex/590Em-499Ex/521Em)
	アポトーシス (カスパーゼ3/7) Caspase-Glo® 3/7 Assay	A	検出法 (蛍光-発光)
細胞毒性 (死プロテアーゼ) CytoTox-Fluor™ Assay	アポトーシス経路 (カスパーゼ3/7 or 8 or 9) Caspase-Glo® 3/7, 8 または9 Assay	A	検出法 (蛍光-発光)
	細胞生存性 (ATP) CellTiter-Glo® Assay	A	検出法 (蛍光-発光)
	レポーターアッセイ (ホタルルシフェラーゼ) ONE-Glo™ Assay 他	A	検出法 (蛍光-発光)
細胞毒性 (LDH) CytoTox-ONE™ Assay	細胞生存性 (ATP) CellTiter-Glo® Assay	A or C	検出法 (蛍光-発光)
	アポトーシス (カスパーゼ3/7) Caspase-Glo® 3/7 Assay	A	検出法 (蛍光-発光)
	アポトーシス (カスパーゼ3/7) Apo-ONE® Caspase-3/7 Assay	C	蛍光 (560Ex/590Em-499Ex/521Em)
レポーターアッセイ (ウミシイタケルシフェラーゼ) EnduRen™ Live Cell Substrate	細胞生存性 (ATP) CellTiter-Glo® Assay	A	細胞状態 (生細胞-細胞溶解)
	アポトーシス (カスパーゼ3/7) Apo-ONE® Caspase-3/7 Assay	A	細胞状態 (生細胞-細胞溶解) 検出法 (発光-蛍光)
	アポトーシス (カスパーゼ3/7) Caspase-Glo® 3/7 Assay	A	細胞状態 (生細胞-細胞溶解)
アポトーシス経路 (カスパーゼ8 or 9) Caspase-Glo® 8 または9 Assay	アポトーシス経路 (カスパーゼ3/7) Apo-ONE® Caspase-3/7 Assay	B	検出法 (発光-蛍光)
誘導 P450 P450-Glo™ Assay	細胞生存性 (ATP) CellTiter-Glo® Assay	C	培地と細胞の分取
	レポーターアッセイ (ホタルルシフェラーゼ) ONE-Glo™ Assay 他	C	培地と細胞の分取
レポーターアッセイ (ホタルルシフェラーゼ) (ウミシイタケルシフェラーゼ) Dual-Glo™ または Dual-Luciferase® Assay		A	基質 (ルシフェリン-セレンテラジン)
レポーターアッセイ (緑ルシフェラーゼ) (赤ルシフェラーゼ) Chroma-Glo™ Assay		B	測定波長 (Em537-Em613)
1st / 2nd アッセイ	3rd アッセイ	分注タイプ*	シグナルの分離技術
細胞生存性および細胞毒性 (生プロテアーゼ) (死プロテアーゼ) MultiTox-Fluor Assay	アポトーシス経路 (カスパーゼ3/7 or 8 or 9) Caspase-Glo® 3/7, 8 または9 Assay	A	検出法 (蛍光-発光)
	レポーターアッセイ (ホタルルシフェラーゼ) Bright-Glo™ Assay または Steady-Glo® Assay、他	A	検出法 (蛍光-発光)

* 分注タイプ (4ページ参照)

- A. 同一ウェルに複数のアッセイ試薬を連続して添加。
- B. 複数のアッセイ試薬成分を含むマスターミックスを添加。
- C. 培養細胞 (マスタープレート) から培地の一部を別のプレートに分注し、それぞれアッセイ。

マルチアッセイに適したプロメガ試薬の特性

■ ホモジニアス

多くのプロメガのアッセイシステムは、簡便な操作（試薬添加 → 混和 → 測定）でアッセイが行えるホモジニアスフォーマットを採用しており、培地の除去や細胞の洗浄を行わずに培養ウェルでそのままアッセイを実施することができます。これは、採用されているアッセイケミストリーが、培地や血清、界面活性剤などに影響を受けにくい性質を持つために実現するものです。マルチアッセイに使用する試薬を随時添加するだけでそれぞれのシグナルが得られるため、自動化も容易です。

■ 高感度

発光測定および蛍光測定はともに感度に優れた方法であり、現在では多くのアッセイシステムで広く利用されています。特に発光法は蛍光法よりも感度が高く、さらにバックグラウンドが低いため、複雑な生体環境を有する培養細胞を用いたアッセイ系には最適です。弊社は安定性や頑健性に関する特殊な発光技術を有しており、他のアッセイケミストリーとの相性に優れています。発光法と蛍光法を組み合わせた高感度マルチアッセイは、より多くの情報を少スケール（>96ウェル形式）でも取得することができます。

■ 幅広いアッセイケミストリー

プロメガには様々な測定原理を採用した細胞ベースのアッセイシステムが揃っています。その原理の違いをマルチアッセイの設計に応用することにより、様々なバリエーションのアッセイを構築することができます。特にルシフェラーゼ反応は、高感度に測定できる発光シグナルを生じ、この反応を構成するルシフェラーゼ、ルシフェリン、ATPそれぞれを細胞内マーカーの測定に利用することができます（右図参照）。

マルチアッセイに利用可能な反応シグナルの分離要素

検出法の違い：発光 + 蛍光

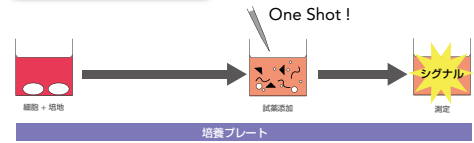
波長の違い：蛍光波長

細胞状態の違い：生細胞アッセイ + 細胞溶解アッセイ

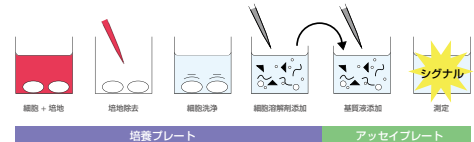
基質の違い：ルシフェリン + セレンテラジン

各アッセイについては14ページをご覧ください。

ホモジニアスアッセイ

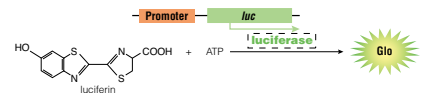


従来のアッセイ方法

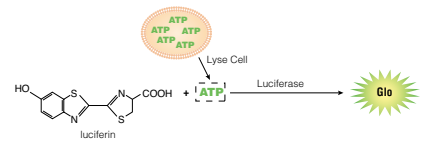


ホモジニアスアッセイの操作概要

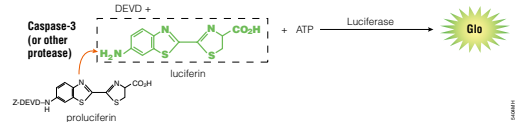
ルシフェラーゼを定量するアッセイ



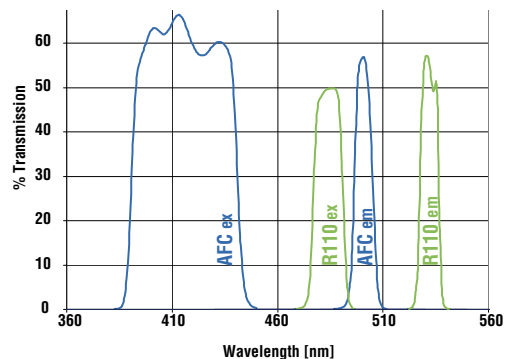
ATPを定量するアッセイ



ルシフェリンを定量するアッセイ



ルシフェラーゼ反応の様々な発光測定法への応用



蛍光物質 AFCとR110の励起波長と蛍光波長の違い

フィルターを用いることにより異なるシグナルとして検出することができます。

マルチアッセイの実例 (1)

A. 細胞死のメカニズム

細胞の生存性の決定は、癌、アポトーシス、細胞病理、発生メカニズム、薬物毒性などの理解に必要です。また、薬剤の有効性や安全性を見る上でも細胞の変化やメカニズムを調べることは重要です。マルチアッセイにより同一サンプルのカパーゼ活性（アポトーシス）や細胞膜の障害性（ネクローシス）、生存性などを同一ウェルで検出することができます。

また、細胞ベースのアッセイ系は、in vivoでの実験を予見できる可能性を有する生物学実験において必須の技術ですが、細胞内の複雑性は特有の生物学的変動を示す結果となり、データの解釈を複雑にする場合があります。そのため、細胞の生存性について補正を行い、実験で得られた反応結果の有効性について確認する作業が必要になる場合があります。

カパーゼ経路の同定

(カパーゼ 3/7とカパーゼ 8 または9) [例A-1参照]

アポトーシス、ネクローシスと細胞数（生存性）

(カパーゼ 3/7 と 細胞内酵素の漏出) [例A-2参照]

本当に細胞死を起こしているのか？

(毒性試験および生存性試験による確認) [例A-3参照]

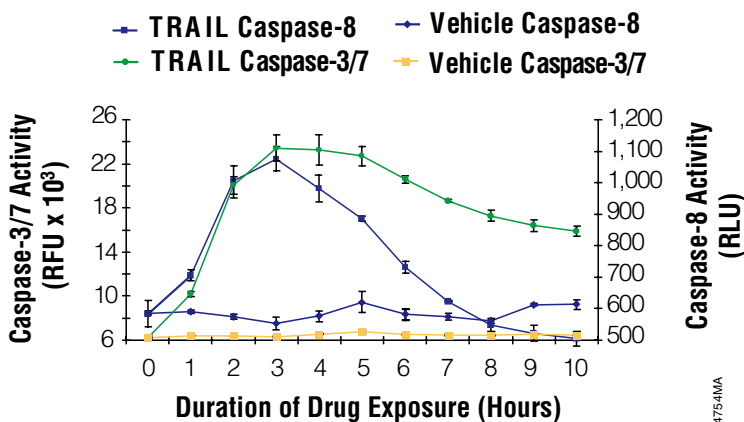
例A-1) カパーゼ-8アッセイとカパーゼ3/7アッセイのマルチアッセイ

使用キット：Apo-ONE® + Caspase-Glo®-8

シグナルの分離：蛍光 - 発光

分注タイプ：Bタイプ

Jurkat 細胞を25,000個/ウェルで播種した。TRAIL (Chemicon, 終濃度100ng/ml) またはコントロール (10% FBSを含むRPMI 1640) 50μlをタイムポイントごとの複製ウェルに1時間づつずらして10時間にわたって添加した。Caspase-Glo® 8 Reagentはアッセイバッファーと基質を組み合わせて調製した。蛍光カパーゼ3/7基質 (Z-DEVD-R110) をCaspase-Glo® 8 Reagentに混和し、終濃度50μMにした。調製した試薬100μlを添加した後、60分間インキュベーションし、発光および蛍光を測定した。



<プロトコル>

- 96ウェルプレート（黒または白）で細胞を培養（培地100μl）し、薬剤で処理。
- Caspase-Glo® 8または9 Assay Reagentを調製。Apo-ONE® Substrateを解冻し、Caspase-Glo® 8または9 Assay Reagentで200倍に希釈（50μl/10ml Caspase-Glo® Reagent）。このアッセイ法ではApo-ONE® Bufferは未使用。各ウェルに等量（100μl）添加。
- 室温で1時間インキュベーション
Technical Bulletin #TB332または#TB333に従い発光を測定し、カパーゼ-8または-9活性を測定。
- Technical Bulletin #TB295に従いApo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assayで蛍光（485Ex/527Em）を測定し、カパーゼ-3/7活性を測定。

TRAIL添加によるアポトーシス誘導がカパーゼ-8およびカパーゼ3/7の経路によるものであることが示唆された。

例A-2) 細胞生存性/毒性試験とカスパーゼ3/7アッセイのマルチアッセイ

使用キット：MultiTox-Fluor + Caspase-Glo® 3/7

シグナルの分離：蛍光-発光 および 蛍光波長

分注タイプ：Aタイプ

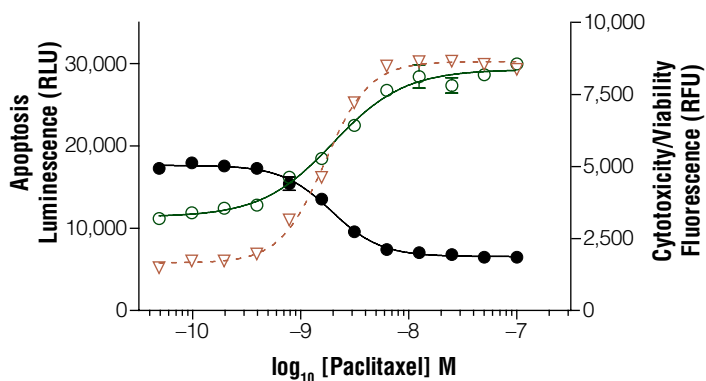
Jurkat細胞を、さまざまな濃度のパクリタキセル（24時間）またはイオノマイシン（6時間）存在下でインキュベーションした。MultiTox-Fluor Reagentを添加してデータを収集した。Caspase-Glo® 3/7 Reagentを添加して発光を測定した。パネルA：パクリタキセルはアポトーシス（カスパーゼ誘導）により細胞毒性を引き起こす。パネルB：イオノマイシンは細胞毒性を引き起こすが、カスパーゼは誘導しない（一次ネクローシスである可能性が高い）。

<プロトコル>

1. 96ウェルプレート（黒または白）で細胞を培養（培地100μl）し、薬剤で処理。
2. MultiTox-Fluor Substrates (GF-AFC、bis-AAF-R110) を10X濃度に再溶解し、10μl/well添加。
3. 軽く振盪して37°Cで0.5~3時間インキュベーション。Technical Bulletin #TB348に従い蛍光を測定（Live-cell：400Ex/505Em、Dead-cell：485Ex/520Em）し、細胞毒性・細胞生存性を測定。
4. 等量のCaspase-Glo® 3/7 Reagentを各ウェルに添加。
5. ルシフェラーゼが定常状態に達するまで室温で30分インキュベーション。Technical Bulletin #TB323に従い発光を測定。

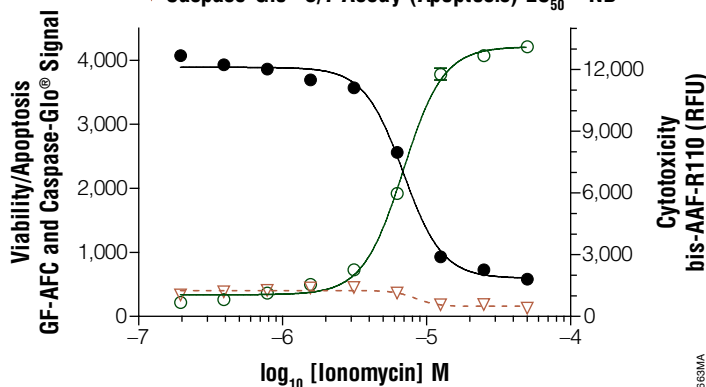
A.

- MultiTox-Fluor: GF-AFC (Viability) $EC_{50} = 1.9nM$
- MultiTox-Fluor: bis-AAF-R110 (Cytotoxicity) $EC_{50} = 1.9nM$
- ▽ Caspase-Glo® 3/7 Assay (Apoptosis) $EC_{50} = 1.7nM$



B.

- MultiTox-Fluor: GF-AFC (Viability) $EC_{50} = 6.89\mu M$
- MultiTox-Fluor: bis-AAF-R110 (Cytotoxicity) $EC_{50} = 6.87\mu M$
- ▽ Caspase-Glo® 3/7 Assay (Apoptosis) $EC_{50} = ND$



添加する化合物の違いによるアポトーシスを伴う細胞死、伴わない細胞死が確認された。

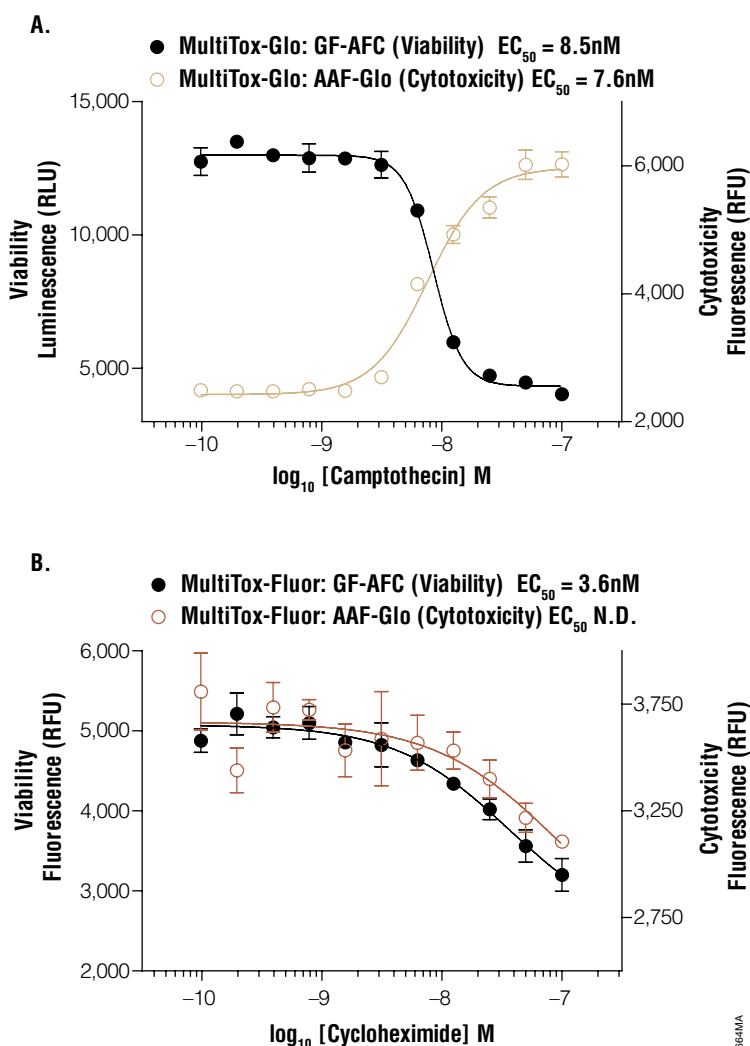
例A-3) 生存性試験と毒性試験とのマルチアッセイ

使用キット：MultiTox-GloまたはMultiTox-Fluor

シグナルの分離：蛍光-発光または蛍光波長

分注タイプ：AまたはBタイプ

Jurkat細胞に、所定の濃度のカンプトテシンまたはシクロヘキシミドを添加して37℃で24時間インキュベーションした。 **パネルA**：MultiTox-Glo Reagentを添加し、発生したシグナルを測定した。生細胞数の減少はGF-AFC基質で測定し、細胞毒性の増大はAAF-Glo™基質で測定した。最高濃度のカンプトテシン添加時のデータは、カンプトテシンが細胞毒性を引き起こすことを示している。 **パネルB**：MultiTox-Fluor Reagentを添加し、蛍光反応を測定した。AFC蛍光の減少に応じたR110蛍光の増加は認められなかった。細胞を形態学的に観察したところ、最高濃度のシクロヘキシミド添加時には細胞周期の停止が生じていたものの細胞毒性は生じていないことが確認された。したがって、最高濃度のシクロヘキシミドによる生細胞数マーカーの“低下”は、細胞分裂を停止した細胞が未処理のコントロールよりも多いことを反映していると考えられる。



生存性と毒性の両方を調べることで、生存性低下を伴う細胞毒性と細胞周期の休止状態を識別することができた。

<プロトコル>

製品添付の標準プロトコル参照

MultiTox-Glo Technical Bulletin:

www.promega.com/tbs/tb358/tb358.pdf

MultiTox-Fluor Technical Bulletin:

www.promega.com/tbs/tb348/tb348.pdf

<新しいマルチアッセイ構築のヒント>

このガイドブックで紹介している例は、プロメガで確認したマルチアッセイの一部です。このガイドに載っていない組合せ、またこれから発売される製品のマルチアッセイを構築することはもちろん可能です。次のポイントに気をつけて、新しくマルチアッセイを構築してみましょう。

① 原則として発光アッセイ同士は組み合わせない
悪い組合せ：Caspase-Glo® 3/7(発光)とホタルレポーターアッセイ →1stアッセイと2ndアッセイのシグナルを分けることができない。

例外) 基質が異なる場合 (Dual-Luciferase®アッセイ、11ページ、例B-3)、細胞と上清に分ける場合 (ホタルレポーターアッセイとP450-Glo™ Nonlyticアッセイ、13ページ、例C-3)。

② 蛍光アッセイ同士の組合せはフィルターでそれぞれのシグナルが分けられる組合せを選ぶ

悪い組合せ：Apo-ONE® (Ex498/Em521) と CytoTox-Fluor™ (Ex485/Em520) をAタイプでアッセイ →励起、検出波長が重なる。

良い組合せ：例A-3, B →励起、検出波長が異なる。

③ 細胞を壊さないアッセイが先、細胞を溶解するアッセイは後

悪い組合せ：ホタルレポーターアッセイ (細胞溶解) 後に細胞生存性アッセイ (細胞を壊さない) →先にレポーターアッセイをすると細胞が死ぬので、細胞生存性アッセイができない。

良い組合せ：10ページ、例B-1 →先に細胞生存性アッセイを行っている。

④ 蛍光アッセイが発光アッセイに影響しない

悪い組合せ：CellTiter-Blue® (蛍光) とCaspase-Glo® 8、9アッセイ →CellTiter-Blue®の蛍光物質がルシフェラーゼ発光を阻害し、感度が低くなる。

例外) 発光アッセイのシグナルが十分高く、蛍光物質の発光阻害を受けてもシグナルの直線性が保たれる場合 (CellTiter-Blue® [蛍光]) とCaspase-Glo® 3/7 [発光] など)。

良い組合せ：10ページ、例B-1 →CellTiter-Fluor™の蛍光物質はルシフェラーゼ発光を阻害しない。

できるかな?と思ったら...

テクニカルサービスにご相談下さい。

● www.promega.co.jp/multiassay.html

● Tel. 03-3669-7980 / Fax. 03-3669-7982

● E-Mail : prometec@jp.promega.com

マルチアッセイの実例 (2)

B. レポーターアッセイの補正

細胞外来性のマーカーであるレポーターは、その元となるレポーター遺伝子を細胞内に導入するステップを伴うため、トランスフェクション効率などの変動により、レポーターの発現規模に対して予想外の影響が現れる可能性があります（トランジェントトランスフェクション）。これは、細胞への刺激に応答する実験レポーターとともに恒常的に発現する内部標準用のレポーターを導入することで補正をかけて回避することができます。また、安定に導入された（ステイブルトランスフェクション）レポーター遺伝子を有する細胞も細胞数による補正を行うことにより変動を抑えた、正確なデータが得られます。

細胞数（生存性）による補正

（ルシフェラーゼと生存性マーカー） [例B-1, B-2参照]

トランスフェクション効率の補正

（ホタルおよびウミシイタケルシフェラーゼ） [例B-3参照]

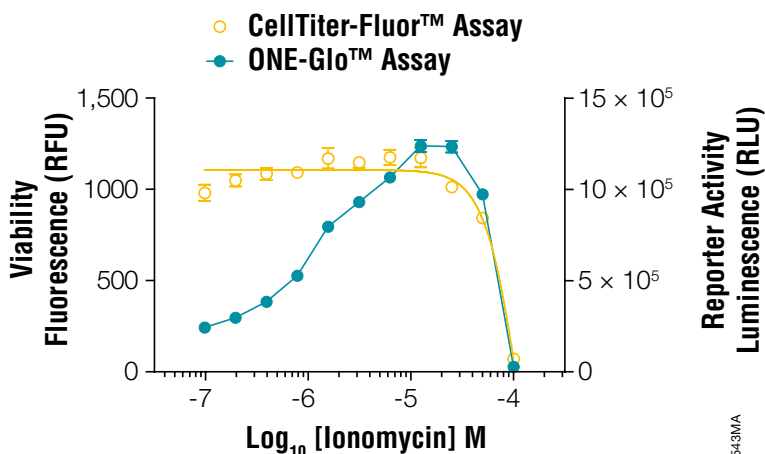
例B-1) 生存性試験とシングルルシフェラーゼアッセイのマルチアッセイ

使用キット：CellTiter-Fluor™ + ONE-Glo™

シグナルの分離：蛍光 - 発光

分注タイプ：Aタイプ

GloResponse™ NFAT-RE-*luc2P* HEK293 (10,000 cells/well, 100μl/well)を、DMEM/10%FBS（ハイグロマイシンBと、NFAT転写因子を活性化するPMAを含む）培地で希釈したイオノマイシンで処理をした。37℃で6時間処理後、5×で調製したCellTiter-Fluor™ Reagentを各wellに20μl加えた。37℃で30分後、AFC蛍光ユニット（405nmEx/495-505 nmEm）を装着したGloMax®-Multi Detection Systemで検出した。その後、ONE-Glo™ Reagentを加え、GloMax®-Multi Detection Systemで発光検出を行った。



高濃度イオノマイシン添加によるNFAT転写活性の低下が細胞毒性によるものであることが分かった。

<プロトコル>

- 96ウェルプレート（黒または白）で細胞を培養（培地100μl）し、薬剤で処理（6時間）。
- 5X濃度に溶解したCellTiter-Fluor™ Reagent（Assaybuffer 2mlに対して、GF-AFCsubstrate 10μlを混合）、20μl/well添加。
- 軽く振盪して37℃で30分間インキュベーション。Technical Bulletin #TB371に従い蛍光を測定し、細胞生存性を測定。
- 等量のONE-Glo™ Reagentを各ウェルに添加し、Technical Bulletin #TM292に従い発光を測定。

<マルチアッセイのヒント>

CytoTox-Glo™ とGloタイプのLuciferase Assayの組み合わせも原理的に可能です（未試験）。

- 培地上澄を別プレートに分注し、CytoTox-Glo™ Reagent を添加。
- 発光を測定。
- 細胞の残るマスタープレートにGlo Luciferase Assay Reagent を添加。
- 発光を測定。

詳細については弊社テクニカルサービスにお問い合わせください。

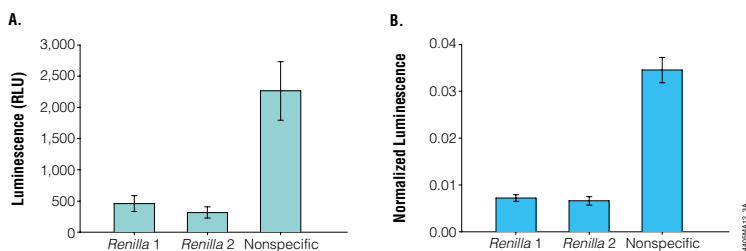
例B-2) ウミシイタケルシフェラーゼレポーターアッセイと細胞生存性試験のマルチアッセイ

使用キット：EnduRen™ + CellTiter-Glo®

シグナルの分離：基質の違いおよび消光作用

分注タイプ：Aタイプ

EnduRen™ Substrate は、生きた細胞でのレポーター活性（発光）を検出することができるため、測定後のサンプルは、他の二次アッセイに利用することが可能である。有用な例として、レポーター活性を細胞数で補正する事例がある。ウミシイタケルシフェラーゼが恒常的に発現したHeLa細胞を使ってRNAiの実験の効果を調べた。調製元となるDNAが異なる、同じ配列のshRNA (*Renilla*1, *Renilla* 2) の効果を調べた。下図 (Panel A) では、二つのshRNAが確かにウミシイタケの発光を抑制することが示されているがその効果は異なるように観察された。下図 (Panel B) では、得られた発光値を細胞数で補正しており、二つのshRNAの効果はほぼ同一であることが示されている。shRNAの配列が同じであることから、抑制効果も同じことが期待され、そのような結果が得られた。また、標準偏差も2倍以上小さくなり、細胞数で補正することで、より精度の高い実験結果が得られることが示された。



細胞生存性で補正することにより、shRNA配列のsiRNA 効果に関するデータのバラツキが低減された。

例B-3) ホタルとウミシイタケルシフェラーゼのマルチアッセイ

使用キット：Dual-Luciferase® Reporter Assay

シグナルの分離：基質の違い

分注タイプ：Aタイプ

27-水酸化酵素遺伝子のプロモーター領域を同定するため、遺伝子の上流領域の配列からそれぞれの長さの断片をpGL3-Basicベクターにクローニングし、pXP1Rsal (700bp)、pXB1 (413bp)、pXP1EcoRI (257bp)を作成した。これらのホタルルシフェラーゼベクターとともに、内部標準コントロールとしてTKプロモーター制御下でウミシイタケルシフェラーゼを発現するpRL-TKベクターを哺乳動物細胞にコトランスフェクションした。同じようにトランスフェクションしたものを2プレート用意し、異なる日にアッセイを行った。アッセイはマニュアル (#TM040) に従って行った。パネルAはホタルルシフェラーゼのみのデータを示し、パネルBは同じホタルルシフェラーゼのデータをウミシイタケルシフェラーゼの値で標準化したものを示す。それぞれのデータは2サンプルの平均を示し (n=2)、異なる日に実施したアッセイの結果と比較した (Day1, Day2)。

部分欠失によるプロモーター活性の変化について内部コントロールで補正することにより、異なる日に実施した実験でも再現性の高いデータが得られた。

<プロトコル>

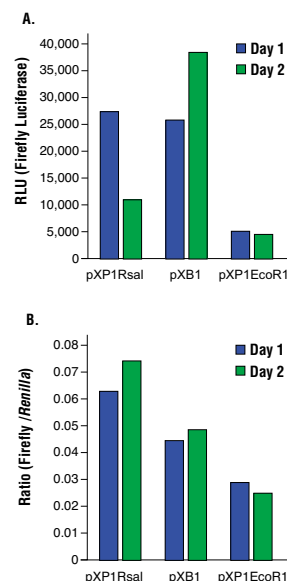
- ウミシイタケルシフェラーゼを発現した細胞を96ウェルプレート (白色) で培養
- shRNAを細胞に導入
- EnduRen™ Live Cell Substrateを培養液に添加 (最終60μM)。
- ウミシイタケルシフェラーゼによる発光を検出 (1.5~24時間)
- CellTiter+Glo® Reagentを添加し、発光を測定

※どちらのアッセイも発光を検出するが、ウミシイタケルシフェラーゼの発光は、CellTiter-Glo®を加えると消光するため、2つのシグナルは干渉しない。

<プロトコル>

製品添付の標準プロトコル TM 040参照

www.promega.com/tbs/tm040/tm040.pdf



マルチアッセイの実例 (3)

C. その他のマルチアッセイの可能性

細胞現象の指標となる複数マーカーを測定する上で、個々のアッセイケミストリーの適応性やシグナルの分離などの項目がクリアーされれば、様々な発光、蛍光測定法のマルチアッセイが可能です。マルチアッセイ機能と高感度な発光アッセイ法を組み合わせることにより、ADME/Tox 試験に用いられる初代培養細胞や幹細胞の数を抑えることができます。有用なマルチアッセイの例として、CYP450活性とレポーター活性、グルタチオン (GSH) レベルと細胞生存性などが考えられます。

プロメガでは発光法を中心とした多くの酵素アッセイシステムを開発しており、マルチアッセイに関する情報も蓄積されています。ご希望のアッセイの組合せなど、マルチアッセイに関するご意見、ご質問は弊社テクニカルサービスまでお寄せください。

グルタチオンレベルの細胞生存性による補正

(グルタチオンと生存性マーカー) [例C-1参照]

プロテアソーム活性とアポトーシスの関連性

(プロテアソームとカスパーゼ3/7) [例C-2参照]

P450のタンパク質レベルと転写レベルの同時測定

(P450活性と3A4プロモーターを用いたレポーター試験) [例C-3参照]

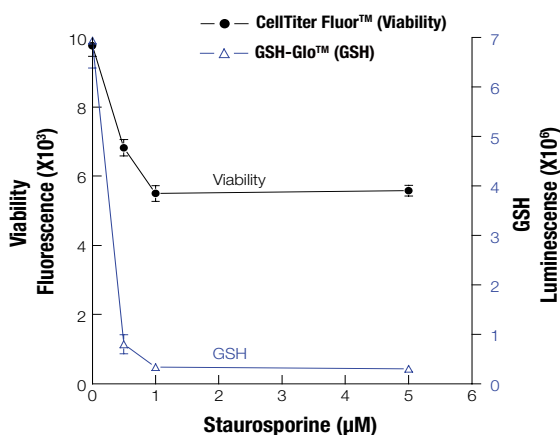
例C-1) グルタチオン アッセイと細胞生存性試験のマルチアッセイ

使用キット : CellTiter-Fluor™ + GSH-Glo™

シグナルの分離 : 蛍光 - 発光

分注タイプ : Aタイプ

グルタチオン (GSH) は主要な非タンパク質チオールとして真核細胞に多く存在し、様々な代謝経路で重要な役割を果たしています。生体異物や活性酸素種 (ROS) の解毒機構や細胞内の酸化還元調節に深く関与しており、活性酸素種や不測の薬物間相互作用はGSHレベルを低下させる場合があることが知られています。そのため、酸化ストレスの促進やアポトーシス、細胞死をひき起こす毒性反応を評価する上でGSHレベルの測定は非常に重要です。



GSHレベルの変化と細胞数を測定することで、酸化ストレスと生存性に関する細胞の状態を知ることができた。

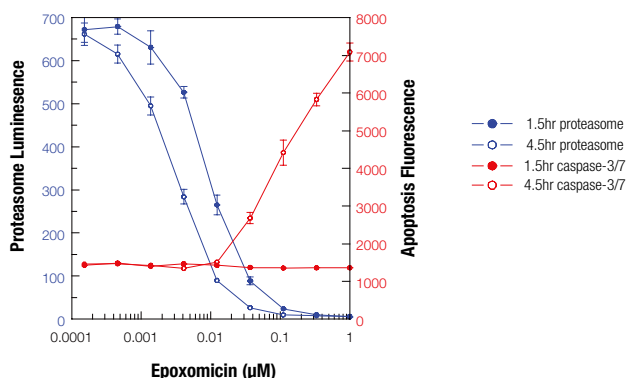
<プロトコル例>

1. CellTiter-Fluor™ を添加した後、37°Cでインキュベーションし、蛍光を測定。
2. 培地を除き、GSH-Glo™ Reagent を添加した後、30分間インキュベーション。
3. Luciferin Detection Reagentを添加し、15分間インキュベーション。
4. 発光を測定。

例C-2) プロテアソームとカスパーゼのマルチアッセイ

使用キット : Proteasome-Glo™ Cell Based+ Apo-ONE®
 シグナルの分離 : 発光 - 蛍光
 分注タイプ : Aタイプ

プロテアソームは、近年 抗がん治療を目的とした特異性の高いプロテアソーム阻害剤の開発などが行われ、注目を集めています。弊社では細胞ベースのプロテアソームアッセイシステムを開発しており、カスパーゼ3/7アッセイシステムとのマルチアッセイにも適応します。以下の例では、細胞内のプロテアソーム活性を測定するためにProteasome-Glo™ Cell Based Reagentを細胞に添加、発光測定し、同じウェルでアポトーシスの指標であるカスパーゼ-3/7活性を測定するためにApo-ONE® Reagent を加え、蛍光を測定しました。エポキシマイシンは1時間ではカスパーゼ活性を誘導せずにプロテアソームを阻害しましたが、4.5時間後では0.04μM以上の濃度でアポトーシスを誘導しました。



プロテアソーム活性はエポキシマイシン濃度上昇に従い低下する一方、アポトーシスは一定濃度以上のエポキシマイシンで誘導されることが分かった。

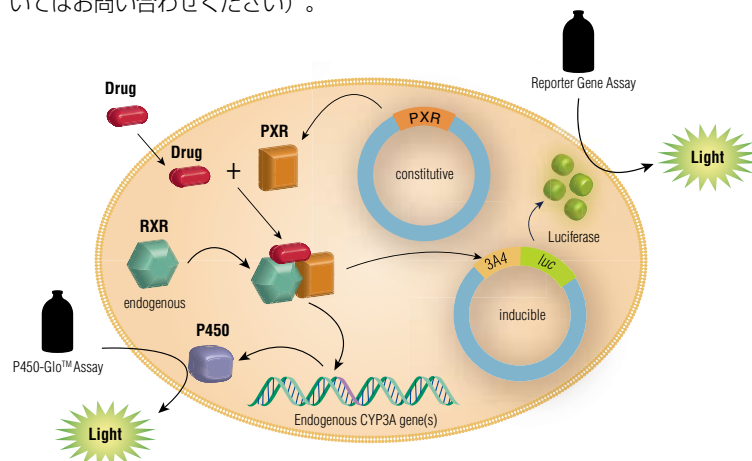
<プロトコル例>

1. Proteasome-Glo™ Cell Based Reagentを添加し、インキュベーション。
2. 発光を測定。
3. Apo-ONE® Reagentを添加し、インキュベーション。
4. 蛍光を測定。

例C-3) P450 とルシフェラーゼレポーターのマルチアッセイ

使用キット : P450-Glo™ + Glo - Luciferase Asssay
 シグナルの分離 : 発光 - 発光
 分注タイプ : Cタイプ

P450は薬物の代謝/排泄に深く関与しており、薬剤によるP450の発現誘導（転写活性の増加）および酵素阻害（代謝活性の低下）を調べることは薬剤の開発を行う上で非常に重要です。3A4プロモーターを導入したルシフェラーゼベクターおよびPXRを恒常的に発現するベクターをトランスフェクションすることにより、3A4の転写活性と代謝活性を測定することも可能です（詳細についてはお問い合わせください）。



<プロトコル例>

1. P450-Glo™ Substrate を添加し、インキュベーション。
2. 培地を別プレートに分注し、Luciferin Detection Reagent を添加。
3. 発光測定。
4. 細胞の残るマスタープレートにGlo Luciferase Detection Reagent を添加。
5. 発光を測定。

アッセイ試薬の特長

製品名	測定パラメーター	検出*	測定時の細胞状態	インキュベーション時間	シグナル安定性	感度 (細胞)
細胞生存性試験						
MultiTox-Fluor	生細胞由来および死細胞由来のプロテアーゼ	蛍光(Ex400/Em505)/(Ex485/Em520) [F, A, B]	生細胞	0.5-3時間	—	死細胞10個/生細胞40個
MultiTox-Glo	生細胞由来および死細胞由来のプロテアーゼ	蛍光(Ex400/Em505)/発光 [F, A, L]	生細胞	0.5-3時間	5時間以上(発光)	死細胞10個/生細胞40個
CytoTox-Glo™	死細胞由来プロテアーゼ	発光 [L]	生細胞(細胞溶解#)	15分間	5時間以上(発光)	死細胞10個
CellTiter-Glo®	ATP (エネルギー合成能)	発光 [L]	細胞溶解	10分間	5時間以上	<生細胞10個
CytoTox-Fluor™	死細胞由来プロテアーゼ	蛍光 (Ex485/Em520) [F, B]	生細胞	0.5-3時間	—	死細胞10個
CellTiter-Fluor™	生細胞由来プロテアーゼ	蛍光 (Ex400/Em505) [F, A]	生細胞	0.5-3時間	—	40個
CellTiter-Blue®	NADH	蛍光 (Ex560/Em590) [F, G]	生細胞	1-4時間	24時間以内*	50個
CytoTox-ONE™	LDH	蛍光 (Ex560/Em590) [F, G]	生細胞	10分間	2日** (約1~2時間)	200個
*Stop Solutionを添加した場合。 **Stop Solutionを添加し、培地に血清が含まれる場合(血清が含まれていない場合は1~2時間) #全溶解プロトコルによる全細胞数測定を行う場合は細胞溶解剤を別途添加(オプション)						
アポトーシスアッセイ						
Apo-ONE®	Caspase-3/7	蛍光(Ex498/Em521) [F, B]	細胞溶解	0.5-18時間	—	200個
Caspase-Glo® 3/7	Caspase-3/7	発光 [L]	細胞溶解	0.5-3時間	4時間以上	20個
Caspase-Glo® 8	Caspase-8	発光 [L]	細胞溶解	0.5-3時間	2時間以上	1000個
Caspase-Glo® 9	Caspase-9	発光 [L]	細胞溶解	0.5-3時間	2時間以上	1500個
レポーターアッセイ^{注1}						
Dual-Glo™	ホタル/ウミシイタケルシフェラーゼ	発光 [L]	細胞溶解	10+10分間	約2時間/約2時間	+++
Dual-Luciferase® Assay	ホタル/ウミシイタケルシフェラーゼ	発光 [L]	細胞溶解(別途溶解操作が伴う)	15分間	約15分間/約2分間	++++
EnduRen™	ウミシイタケルシフェラーゼ	発光 [L]	生細胞	1.5時間以上	24時間以上	+
ViviRen™	ウミシイタケルシフェラーゼ	発光 [L]	生細胞	2分以上	数時間	+++
ONE-Glo™	ホタルルシフェラーゼ	発光 [L]	細胞溶解	3分以上	約1時間	+++
Steady-Glo®	ホタルルシフェラーゼ	発光 [L]	細胞溶解	5-10分間	約5時間	++
Bright-Glo™	ホタルルシフェラーゼ	発光 [L]	細胞溶解	5-10分間	約30分間	++++
Beta-Glo®	β-ガラクトシダーゼ	発光 [L]	細胞溶解	30分間~1時間	約4時間	—
注1 レポーターアッセイにはレポーターベクターが必要です。別途お問合せください。						
その他の細胞内在性マーカー						
GSH-Glo™	還元型グルタチオン	発光 [L]	生細胞	45分間	2時間以上	1000個
P450-Glo™	誘導 P450 (3A, 1A, 2C9)	発光 [L]	生細胞(または細胞溶解)	3-4時間	2時間以上	—
Proteasome-Glo™ (Cell Based Assay)	プロテアソーム	発光 [L]	細胞溶解	10-15分間	数時間	5000個(付着細胞)
Calpain-Glo™	カルパイン I&II	発光 [L]	生細胞	5-15分間	1時間以上	5pM(カルパインI)
cAMP-Glo™	cAMP	発光 [L]	細胞溶解	45分間	4時間以上	2500個(付着細胞)

* []内はGloMax®-Multi で測定する際に使用する付属品：L; Luminescence Module, F; Fluorescence Module, G; Green Optical Kit, B; Blue Optical Kit, A; AFC Optical Kit, U; UV Optical kit,

マルチモードプレートリーダー：GloMax®-Multi System

GloMax®-Multi Detection Systemは、GloMax®シリーズに新たに加わった進化型の高感度マルチモードプレートリーダーで、マルチアッセイに最適です。GloMax® 96の優れたパフォーマンスを引き継ぐとともに、新たに吸光測定および蛍光測定機能をオプションで追加できる柔軟性を有しています。本システムは、モジュール方式を採用しており、購入時に必要最小限の構成でも、後から必要なモジュールを追加することができます。GloMax®-Multi Detection Systemは、機器、ソフトウェア、バイオアッセイ、プロトコル、サポートを統合したソリューションを提供し、プロメガやその他の幅広いアッセイに対応します。



柔軟性：モジュールの追加でお望みの測定構成を設定（発光、蛍光、吸光）。

高感度：ルシフェラーゼ 3×10^{21} molesの検出感度と8桁以上のダイナミックレンジ（発光測定）。

交換可能な蛍光キット：多くのアプリケーションに対応。

マルチアッセイに対応：プロメガの優れた試薬を組合せて使用可能（蛍光-蛍光/蛍光-発光）。

PC内蔵の一体型：タッチスクリーンパネル採用による使いやすい操作性。データはUSBでPCに転送可能。

製品案内

GloMax®-Multi Detection System

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
GloMax®-Multi Luminescence System			3,000,000
構成：・GloMax®-Multi Base Unit (筐体)	1台	E7031	
・GloMax®-Multi Luminescence Module (発光ユニット)	1セット	E7041	

※ GloMax®-Multi Luminescence System は、E7031 + E7041 で構成されるルミノメーターです。

オプション

検出モジュール

GloMax®-Multi Fluorescence Module (蛍光ユニット)	1セット	E7051	850,000
--	------	-------	---------

・E7051には、GloMax®-Multi Optical Kit UV, Blue, Green, Redの4種類が含まれます。

GloMax®-Multi Absorbance Module (吸光ユニット)	1セット	E7061	350,000
--	------	-------	---------

インジェクター

GloMax®-Multi Single Injector System	1セット	E7071	500,000
GloMax®-Multi Dual Injector System	1セット	E7081	850,000

アクセサリ

GloMax®-Multi Optical Kit AFC	1セット	E8917	130,000
-------------------------------	------	-------	---------

GloMax®-Multi Luminescence System

本体仕様

- 検出モード：発光、蛍光（オプション）、吸光（オプション）
- インジェクター：最大2つ（オプション）
- インジェクションボリューム：25-200 μ l（5 μ l間隔）
- インターフェイス：USB
- フォーマット：96ウェルプレート
- 電力：100-240 VAC, 50/60 Hz
- 寸法：高さ31×奥行き53×幅44cm
- 重量：16kg

■ 発光測定

- 検出感度： 3×10^{-21} moles/ルシフェラーゼ
（ 1×10^{-18} moles ATP）
- ダイナミックレンジ：8桁以上
- ウェル間干渉： $< 5 \times 10^{-6}$ （ホワイトプレート使用時）
- 検出器：フォトマルチプライヤーチューブ（PMT）
- 検出波長：350～650nm

■ 蛍光測定（オプション）

- 検出感度：0.5 fmol/200 μ l（1ppt）フルオレセイン
- ダイナミックレンジ：最大6桁
- 光源：Wavelength-matched LED
- 検出器：PIN-フォトダイオード
- 波長の変更方法：オプティカルキットの交換
- 測定波長：UV（Ex. 365nm/Em. 410-460nm）
Blue（Ex. 490nm/Em. 510-570nm）
Green（Ex. 525nm/Em. 580-640nm）
Red（Ex. 625nm/Em. 660-720nm）
AFC*（Ex. 405nm/Em. 495-505nm）
*AFCはオプション

■ 吸光測定（オプション）

- 光源：LED
- 検出器：Large-area フォトダイオード
- 測定波長：360-800nm
- フィルター：450nm, 550nm, 600nm, 750nm
（フィルター2つを追加で装着可能）
- レンジ：0-4.0 OD

製品案内 (試薬)

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
細胞生存性/毒性試験			
MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assay	10ml	G9200	27,000
	5×10ml	G9201	76,000
	2×50ml	G9202	140,000
MultiTox-Glo Multiplex Cytotoxicity Assay	10ml	G9270	29,500
	5×10ml	G9271	83,500
	2×50ml	G9272	154,000
毒性試験			
CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay	10ml	G9290	16,500
	5×10ml	G9291	67,000
	2×50ml	G9292	103,500
CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay	200ウェル分	G7890	16,000
	1000ウェル分	G7891	49,000
CytoTox-Fluor™ Cytotoxicity Assay	10ml	G9260	15,000
	5×10ml	G9261	61,000
	2×50ml	G9262	94,000
細胞生存性			
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	10ml	G7570	13,000
	10×10ml	G7571	55,000
	100ml	G7572	49,500
CellTiter-Fluor™ Cell Viability Assay	10×100ml	G7573	418,000
	10ml	G6080	15,000
	5×10ml	G6081	61,000
CellTiter-Blue® Cell Viability Assay	2×50ml	G6082	94,000
	20ml	G8080	16,000
	100ml	G8081	45,000
CellTiter-Blue® Cell Viability Assay	10×100ml	G8082	390,000
	カスパーゼアッセイ		
Caspase-Glo® 3/7 Assay	2.5ml	G8090	17,500
	10ml	G8091	66,000
	100ml	G8092	319,000
	10×10ml	G8093	385,000
Caspase-Glo® 8 Assay	2.5ml	G8200	17,500
	10ml	G8201	66,000
	100ml	G8202	319,000
Caspase-Glo® 9 Assay	2.5ml	G8210	17,500
	10ml	G8211	66,000
	100ml	G8212	319,000
Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay	10ml	G7790	58,000
	100ml	G7791	280,000
	1ml	G7792	6,000
ルシフェラーゼレポーターアッセイ (ホタル/ウミシイタケ)			
Dual-Glo™ Luciferase Assay System	10ml	E2920	33,000
	100ml	E2940	264,000
Dual-Luciferase® Reporter Assay System	100回分	E1910	27,500
	10×100回分	E1960	218,000
	1000回分	E1980	205,500

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
ルシフェラーゼレポーターアッセイ (ホタル)			
ONE-Glo™ Luciferase Assay System	10ml	E6110	18,500
	100ml	E6120	121,000
Steady-Glo® Luciferase Assay System	10ml	E2510	15,500
	100ml	E2520	87,000
Bright-Glo™ Luciferase Assay System	10ml	E2610	17,500
	100ml	E2620	98,000
ルシフェラーゼレポーターアッセイ (ウミシイタケ)			
EnduRen™ Live Cell Substrate	1プレート分	E6481	23,000
	10プレート分	E6482	143,000
ルシフェラーゼレポーターアッセイ (クリックビートル)			
Chroma-Glo™ Luciferase Assay System	10ml	E4910	27,500
	100ml	E4920	220,000
β-ガラクトシダーゼレポーターアッセイ			
Beta-Glo® Assay System	10ml	E4720	14,500
	100ml	E4740	102,500
グルタチオンアッセイ			
GSH-Glo™ Assay	10ml	V6911	60,500
	50ml	V6912	247,500
P450アッセイ			
P450-Glo™ CYP3A4 Assay (Luciferin-PFBE) Cell-Based/Biochemical Assay	10ml	V8901	18,500
	50ml	V8902	55,000
P450-Glo™ CYP3A4 Assay (Luciferin-PPXE) DMSO-Tolerant Assay	10ml	V8911	18,500
	50ml	V8912	55,000
P450-Glo™ CYP1A1 Assay	10ml	V8751	18,500
	50ml	V8752	55,000
P450-Glo™ CYP1B1 Assay	10ml	V8761	18,500
	50ml	V8762	55,000
P450-Glo™ CYP1A2 Assay	10ml	V8771	18,500
	50ml	V8772	55,000
P450-Glo™ CYP2C8 Assay	10ml	V8781	18,500
	50ml	V8782	55,000
P450-Glo™ CYP2C9 Assay	10ml	V8791	18,500
	50ml	V8792	55,000
プロテアソームアッセイ			
Proteasome-Glo™ Chymotrypsin-Like Cell-Based Assay	10ml	G8660	88,000
	5×10ml	G8661	275,000
Proteasome-Glo™ Trypsin-Like Cell-Based Assay	10ml	G8760	88,000
	5×10ml	G8761	275,000
Proteasome-Glo™ Caspase-Like-Like Cell-Based Assay	10ml	G8860	88,000
	5×10ml	G8861	275,000
カルパインアッセイ			
Calpain-Glo™ Protease Assay	10ml	G8501	60,500
	50ml	G8502	247,500
cAMPアッセイ			
cAMP-Glo™ Assay	300ウェル分	V1501	53,000
	3000ウェル分	V1502	286,000

マルチアッセイの最新情報: www.promega.co.jp/multiassay.html

テクニカルサービス • Tel. 03-3669-7980 / Fax. 03-3669-7982 • E-Mail: prometec@jp.promega.com

プロメガ株式会社

本社 〒103-0011
東京都中央区日本橋大伝馬町14-15 マツモトビル6F
Tel. 03-3669-7981 / Fax. 03-5614-6079

大阪事務所 〒532-0011
大阪市淀川区西中島6-8-8 花原第8ビル704号室
Tel. 06-6390-7051 / Fax. 06-6390-7052

※製品の仕様、価格については2009年6月現在のものであり予告なしに変更することができます。

販売店: