

製品コード MK301

研究用

TaKaRa

TRACP & ALP Assay Kit

説明書

v201605Da

目次

製品概要	3
はじめに	3
I. キットの内容 (500 回用)	4
II. 保存	4
III. 試薬の調製	4
IV. 操作法の概略	5
V. 操作法	
V-[1] 96 ウェル培養用プレートで培養した接着細胞の場合	5
V-[2] シャーレ (ディッシュ) で培養した浮遊細胞の場合	6
VI. 実験例	
VI-[1] アルカリ性ホスファターゼ (ALP) 活性の測定例	6
VI-[2] 酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (TRACP) 活性の測定例	8
VI-[3] 酸性ホスファターゼ (ACP) 標準品での測定	8
VI-[4] アルカリ性ホスファターゼ (ALP) 標準品での測定	9
VI-[5] 血液サンプル調製方法による酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (TRACP) およびアルカリ性ホスファターゼ (ALP) 活性値比較	11
VI-[6] 血清サンプルの凍結融解があたえる測定値への影響	12
VII. 参考文献	13
VIII. 関連製品	13
IX. 注意	13

製品概要

本製品は、基質 pNPP (*p*-nitro-phenyl phosphate) を用いて、酸性ホスファターゼ (ACP) およびアルカリ性ホスファターゼ (ALP) の活性をそれぞれ検出するキットです。酸性ホスファターゼ検出系に酒石酸を加えることで、破骨細胞の酵素マーカーの1つである酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (TRACP) の活性検出ができるため、骨芽細胞の酵素マーカーの1つであるアルカリ性ホスファターゼと共に、骨代謝に関わる2つの酵素を同時に活性検出することが可能です。

本製品は水溶性基質を用いており、反応液の吸光度を測定することによって、活性の簡易定量を行うことができます。本製品とは別に、不溶性基質を用いた細胞染色キット [TRACP & ALP double-stain Kit (製品コード MK300)] も販売しています。実験目的に応じて使い分けてご利用ください。

はじめに

ホスファターゼは、脂肪酸・芳香族のリン酸エステルに作用して、これを加水分解し、リン酸を遊離させる酵素です。これには、活性の至適 pH がアルカリ域であるアルカリ性ホスファターゼ (ALP) と酸性域である酸性ホスファターゼ (ACP) とが知られています。ACP は前立腺や肝臓・腎臓・脾臓・赤血球・血小板・破骨細胞など生体の多くの細胞や組織に存在します。^{1,2)} 1959年、Burstone³⁾ は、破骨細胞 (Osteoclast) には強い ACP 活性が認められ、骨芽細胞 (Osteoblast) には ALP 活性が認められることを報告しています。その後も、骨細胞に関連するホスファターゼ活性についての様々な研究報告がなされ、破骨細胞の ACP 活性は酒石酸存在下でも活性を失わないタイプ (酒石酸耐性酸性ホスファターゼ、Tartrate-resistant acid phosphatase : TRACP) であることがわかりました。現在では、TRACP 活性を持つことが破骨細胞であることの一つの条件とされています。なお、破骨細胞以外に TRACP 活性を持つものとしては、血液細胞中の hairy cell が知られています。また、酒石酸存在下で活性が失われるタイプは、酒石酸感受性酸性ホスファターゼ (Tartrate-sensitive acid phosphatase : TSACP) と呼ばれています。

ALP は、生体膜に結合して存在する糖タンパク質で小腸型、胎盤型、胎盤様型、臓器非特異型の4種類に分類されます。臓器非特異型のうち、骨に特異的なアイソザイムは骨型 ALP と呼ばれており、この酵素は骨芽細胞膜に結合して存在し、石灰化部位において結晶形成を阻害するピロリン酸を分解したり、有機リン酸エステルを分解して無機リン酸濃度を上げることにより、骨形成を促進させる働きがあります。そのため、骨型 ALP は骨代謝サイクルの中で、特に骨形成マーカーとして認知されています。

骨代謝は骨形成と骨吸収の相互バランスで成り立っており、2つの酵素マーカーで同時評価することが有用であると考えられます。

I. キットの内容 (500 回用)

基質 pNPP は最大 25 ml の基質溶液分を用意しています。96 ウェルプレートで 50 μ l/well での 500 アッセイが可能です。

- | | |
|--|-----------|
| (1) pNPP (<i>p</i> -nitro-phenyl phosphate) substrate 【pNPP substrate】 | 24 mg×5 本 |
| (2) 細胞抽出用溶液【Extraction solution】
1% NP-40 含有生理食塩水
浮遊および接着細胞を可溶化する。 | 11 ml×2 本 |
| (3) 酒石酸溶液【Sodium tartrate solution】
0.5 M 酒石酸ナトリウム含有酢酸緩衝液 (pH5.2)
酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (TRACP)：破骨細胞マーカー
検出用に、基質溶液に添加して使用する。 | 4 ml |
| (4) 酸性ホスファターゼ用緩衝液【Buffer for ACP】
0.5 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.2) | 30 ml |
| (5) アルカリ性ホスファターゼ用緩衝液【Buffer for ALP】
1 mM MgCl ₂ 含有 0.2 M Tris-HCl 緩衝液 (pH9.5) | 30 ml |
| (6) 96 ウェルプレート (測定補助器具)【Microplate】
サンプル希釈用や反応容器として使用する。
1% 次亜塩素酸ナトリウム水溶液で一晩浸せき洗浄することで再利用できる。 | 1 枚 |

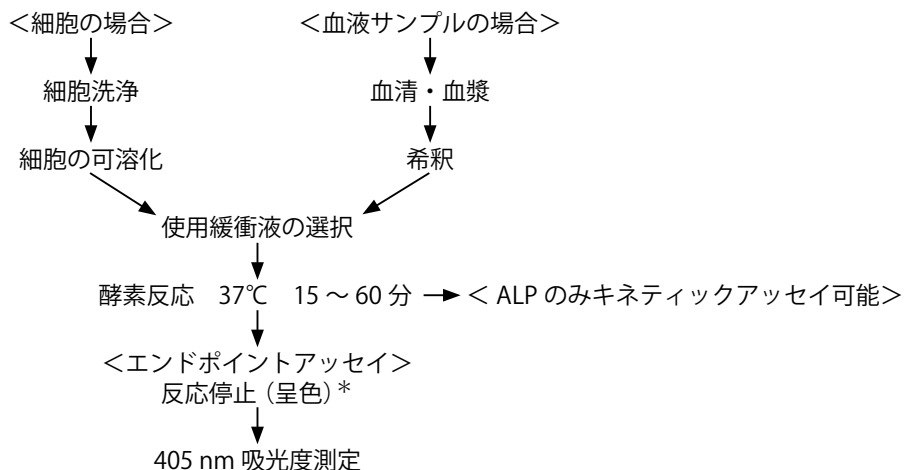
II. 保存

4℃

III. 試薬の調製

- ・使用前に各試薬を室温にもどしてください。
- ・反応基質液の調製
I.(1)pNPP (*p*-nitro-phenyl phosphate) substrate 1 本分 (24 mg) を、測定したい酵素用緩衝液 (I. (4) または I. (5)) 5 ml で十分に溶解し、これを反応基質液として使用する (基質調製濃度 12.5 mM)。
酒石酸耐性ホスファターゼ (TRACP) の測定に用いる場合は、I.(3) 酒石酸溶液を、反応基質液量の 10 分の 1 量添加すること。いずれも調製後の基質液は - 20℃ で保存し、1 週間以内に使用する。
- ・キット以外に必要な試薬
反応停止液【Stop Solution】
0.5 N NaOH 水溶液を、約 30 ml 調製する。
<ご注意> NaOH には腐食性があり、皮膚に接触するとただれ等を起こすことがあります。手や粘膜についた場合は、ただちに大量の水で洗い流し、医師の指示に従ってください。

IV. 操作法の概略



*：酸性ホスファターゼの場合は、反応停止液を添加してはじめて基質が発色します。アルカリ性ホスファターゼの場合は、反応停止液を添加しなくても基質が発色し、反応がすすむにつれて吸光度が増加しますので、キネティックアッセイが可能です。反応停止液を加えると、反応が停止し、吸光度の増加が停止します。

V. 操作法

[1] 96 ウェル培養用プレートで培養した接着細胞の場合

1. 培養上清をアスピレーター等で除く。
2. 生理食塩水を各ウェルに 200 μ l ずつ加えて、1 回洗浄し、最終的に液を除去する。
 - 注 1) 細胞が剥離する場合はこの工程を省き、ブランク (培地のみの培養ウェル) を設定して、測定値を補正してください。
 - 注 2) リン酸系の緩衝液は酵素反応を阻害する恐れがありますので、洗浄には使用しないでください。
3. I. (2) 細胞抽出用溶液を各ウェルに 5 ~ 50 μ l ずつ加え、軽くピペティングする。
 - 注 1) 加える抽出用溶液の液量は、細胞数により変更可能です。細胞数 10^4 個の場合で 50 μ l を目安としてください。
 - 注 2) サンプル濃度が高い場合は細胞抽出用液で希釈してください。(細胞抽出溶液が不足する場合は、生理食塩水でも代用可能です。) 以後の反応には希釈液の一部 (5 ~ 50 μ l) を使用してください。
 - 注 3) 顕微鏡観察により細胞の可溶化の状況を確認してください。
4. 測定したい反応基質溶液 (III. 試薬の調製 参照) を各ウェルに 50 μ l ずつ加え、37°C で 15 ~ 60 分反応する。
 - 注 1) 反応時間を適宜設定してください。
 - 注 2) 可溶化した細胞液 A と加える基質液 B との体積比は、最大 A : B = 1 : 1 としてください。細胞液 A が基質液より少なくなるように設定してください。
 - 注 3) 高い酵素活性を持つと予想される場合は、添付の 96 ウェルプレートで細胞液希釈物を作製し、測定することをお勧めします。
5. 0.5 N NaOH を各ウェルに基質と等量の 50 μ l ずつ加え、呈色後 405 nm の吸光度を測定する。

注) 酸性ホスファターゼの場合、0.5 N NaOH を加えてはじめて呈色します。(参考) 添付の I. (2) 細胞抽出用溶液を用いて得た細胞液は、本ターゲット酵素活性の測定以外に、他の測定 (蛋白定量や他のキナーゼ活性測定) などにも利用できます。

[2] シャーレ (ディッシュ) で培養した浮遊細胞の場合

1. 浮遊細胞の培養液をチューブに集め、遠心して細胞を回収する。細胞を生理食塩水で1回洗浄した後、再び遠心して沈殿させる。
2. I. (2) 細胞抽出用溶液を 50 ~ 500 μl * ずつ加え、ピペティングして細胞を可溶化する。
* : 加える抽出溶液の液量は、細胞数により変更可能です。
細胞数 10^5 個の場合で 50 μl 、 10^7 個の場合で 500 μl を目安としてください。 10^7 個の場合で 500 μl である。
3. 可溶化した細胞液を生理食塩水で段階希釈し、その所定量 (5 ~ 50 μl の範囲) を添付の 96 ウェルプレートの各ウェルに加える。

このステップ以降は、V. 操作法 [1] の 4 ~ 5 と同様。

[3] 血液サンプルの場合

1. 血漿サンプル (血清、血漿など) を、I. (2) 細胞抽出用溶液で希釈した溶液 5 ~ 50 μl を各ウェルに加える。

このステップ以降は、V. 操作法 [1] の 4 ~ 5 と同様

VI. 実験例

[1] アルカリ性ホスファターゼ (ALP) 活性の測定例

ヒト小腸由来の培養細胞中の ALP 活性を本キットを用いて測定した。また、同時に、TRACP & ALP double-stain Kit (製品コード MK300) に含まれる細胞固定液、不溶性基質 BCIP/NBT を用いた ALP 染色もあわせて行った。

<方法>

10% FCS/RPMI1640 培地で継代培養したヒト小腸細胞 (Intestine 407) の懸濁液を 96 ウェル培養用プレートの 1 列目に加え、プレート上で 11 列目まで 2 段階希釈系列を作製した後 (細胞数: 1 列目 1×10^4 個、2 列目 5×10^3 個、以下同様に 1/2 ずつ減少、12 列目はブランク)、培養をさらに 2 日間継続した。(液量 100 μl /well) 培養後、プレートの A、B 行については不溶性基質 BCIP/NBT による ALP 染色を行い、C ~ F 行については本キットを用いて ALP 活性の測定を V. 操作法 [1] に従って行った。なお、C ~ F 行では、可溶化のための細胞抽出用溶液の添加量を 5 ~ 50 μl の間で変化させた (C 行 5 μl 、D 行 10 μl 、E 行 20 μl 、F 行 50 μl)。

酵素反応は 37°C で 60 分間行った。

<結果>

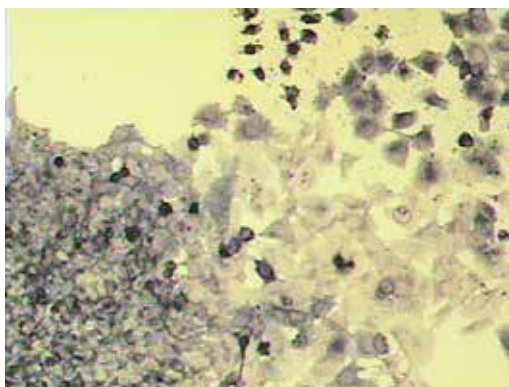
小腸由来の細胞は、アルカリ性ホスファターゼ (ALP) 活性が非常に強く、その活性と細胞数の相関が本キットによる測定で確認された。上記活性測定条件でのヒト小腸細胞 (Intestine 407) の検出感度は、10 細胞/アッセイであった。また、細胞抽出用溶液の添加量を 5 ~ 50 μl /well の範囲で変えても、酵素反応への影響が少ないことが確認された。細胞の可溶化が十分に行える量であれば、細胞抽出用溶液の添加量を一定の範囲内で変えても問題ないといえる。

< 405 nm での吸光度測定値 >

プレートの列		1	2	3	4	5	6	
	細胞数 (個/ウェル)	1×10^4	5×10^3	2.5×10^3	1.25×10^3	6.25×10^2	3.13×10^2	
プレートの 行	C	5 μ l *	2.275	2.271	1.732	0.920	0.581	0.329
	D	10 μ l *	2.298	2.263	1.957	1.082	0.719	0.373
	E	20 μ l *	2.289	2.273	1.901	1.101	0.617	0.369
	F	50 μ l *	2.236	2.214	1.964	1.287	0.744	0.341

* : 細胞抽出用溶液の添加量

7	8	9	10	11	12
1.56×10^2	7.8×10^1	3.9×10^2	20	10	0
0.239	0.180	0.160	0.158	0.154	0.145
0.252	0.200	0.176	0.154	0.158	0.148
0.228	0.192	0.168	0.162	0.152	0.145
0.234	0.175	0.161	0.152	0.157	0.145



1 \times 10⁴ 細胞/ウェルの場合

図1. TRACP & ALP double-stain Kit (製品コード MK300) による染色

[2] 酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (TRACP) 活性の測定例

<方法>

16 週齢のウサギ (雄) の大腿骨由来骨髓細胞を 10% FCS/RPMI1640 培地に懸濁した。この細胞懸濁液を 96 穴培養プレートの 1 列目に加え、同じ培地を用いてプレート上で 11 列目まで 2 倍段階希釈系列 (細胞数: 1 列目 7×10^5 個、2 列目 3.5×10^5 個、以下同様に 1/2 ずつ減少、12 列目はブランク) を作製し、100 μ l/well の液量で培養を開始した。3 日目より接着細胞が目立って出現したため、培地をさらに 100 μ l 添加して培養を続けた。播種後 8 日目に、本キットを用いて TRACP 活性を V. 操作法 [1] に従って測定した。

抽出操作なしで基質溶液を直接細胞に加えた場合と、細胞抽出用溶液 25 μ l で可溶化した場合での基質発色の程度を比較した。なお、TRACP 用基質溶液は 50 μ l、酵素反応は 37°C で 60 分間行った。

<結果>

骨髓細胞の培養により、自然分化した破骨細胞様 TRACP 陽性細胞が多数現れ、本キットによりその TRACP 活性を測定することができた。以下の表では培養開始時の細胞数と、TRACP の活性を 405 nm の吸光度値で示している。抽出せずに直接基質を加えた生細胞 (基質終濃度 12.5 mM) と抽出操作を行った細胞 (基質終濃度 4.1 mM) でほぼ同程度の活性が検出され、細胞数と相関する結果を得た。

< 405 nm での吸光度測定値 >

細胞数 (個/ウェル)	7×10^5	3.5×10^5	1.75×10^5	8.76×10^4	4.38×10^4	2.19×10^4
直接基質を添加	1.701	1.471	0.747	0.295	0.156	0.120
抽出操作あり	1.754	1.880	0.781	0.246	0.150	0.125

1.1×10^3	5.5×10^2	2.25×10^2	112	56	0
0.105	0.100	0.104	0.102	0.100	0.100
0.112	0.111	0.112	0.107	0.105	0.108

[3] 酸性ホスファターゼ (ACP) 標準品での測定

ロシュ・ダイアグノスティック社製 ACP (code.108227 Lot. 93207721) を用いて標準曲線の作成を試みた。

標準品に純水を加えて 100 μ g/ml 酵素溶液を調製し、それぞれの酵素用緩衝液を用いて、2 倍希釈系列を作製した。

1 反応には 96 ウェルプレートの 1 ウェルを使用して、酵素 50 μ l および対応する基質溶液* 50 μ l を混合し、37°C で 30 分間反応させた。0.5 N NaOH を 50 μ l 加え、ただちにマイクロプレートリーダーにより 405 nm で吸光度を測定した。

注) 酸性ホスファターゼの場合、0.5 N NaOH を入れてはじめて呈色する。

*: 酸性ホスファターゼ基質には、酒石酸を加えていない。

<結果>

今回実施した反応スケールにおいては、測定可能な濃度は 1.5 μ g/ml 以下からであり、実際に直線性が得られるのは、0.5 μ g/ml 以下であった。

酸性ホスファターゼ 調製液 100 $\mu\text{g/ml}$
 $2^1 \sim 2^{15}$ の段階希釈

$\mu\text{g/ml}$	405 nm
50	4.014
25	3.993
12.5	3.995
6.26	4.066
3.125	4.011
1.5625	4.032
0.78125	3.411
0.390625	2.043
0.195313	1.147
0.097656	0.599
0.048828	0.356
0.024414	0.215
0.012207	0.157
0.006104	0.120
0.003052	0.108
0	0.084

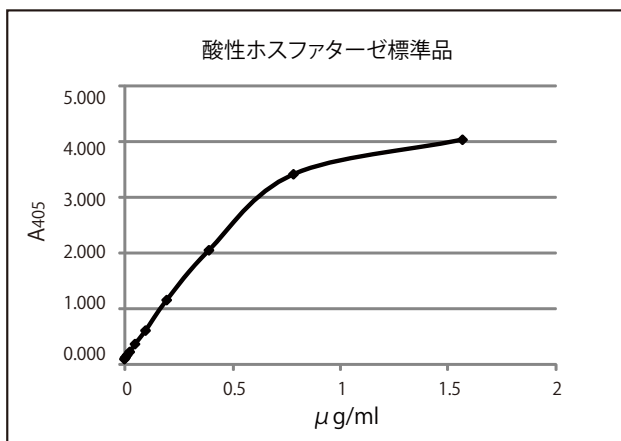


図 2. ACP 標準品を用いた標準曲線

[4] アルカリ性ホスファターゼ (ALP) 標準品での測定

弊社の 3 種類のアルカリ性ホスファターゼ (ALP)、BAP (製品コード 2120A Lot. K2601EA ; 0.4 U/ μl)、CIAP (製品コード 2250A Lot. E2301AB ; 17 U/ μl)、SAP (製品コード 2660A Lot. N301CB ; 1 U/ μl) を用いて標準曲線の作成を試みた。各酵素に細胞抽出用溶液を加えて酵素溶液を調製し、アルカリ性ホスファターゼ用緩衝液を用いて 2 倍希釈系列を作製した。1 反応には 96 ウェルプレートの 1 ウェルを使用して、酵素 50 μl およびアルカリ性ホスファターゼ用緩衝液で溶解した基質溶液 50 μl を混合し、37°C で 30 分間反応させた。

0.5 N NaOH を 50 μl 加え、ただちにマイクロプレートリーダーにより 405 nm で吸光度を測定した。

<結果>

BAP、CIAP、SAP は、いずれも陽性コントロールとして使用することができた。

BAP		CIAP		SAP	
濃度 ($\mu\text{U}/\mu\text{l}$)	405 nm	濃度 ($\mu\text{U}/\mu\text{l}$)	405 nm	濃度 ($\mu\text{U}/\mu\text{l}$)	405 nm
2000	4.000	8500	4.000	10000	4.000
1000	4.000	4250	4.000	5000	4.000
500	4.000	2125	4.000	2500	4.000
250	4.000	1062.5	4.000	1250	4.000
125	4.000	531.25	4.000	625	4.000
62.5	4.000	265.63	4.000	312.5	4.000
31.25	2.351	132.81	4.000	156.25	3.020
15.63	1.333	66.41	3.657	78.13	1.777
7.81	0.749	33.2	2.168	39.06	1.025
3.92	0.422	16.6	1.207	19.53	0.583
1.95	0.252	8.3	0.650	9.77	0.337
0.98	0.165	4.15	0.376	4.88	0.216
0.49	0.123	2.08	0.231	2.44	0.151
0.24	0.104	1.04	0.162	1.22	0.120
0.12	0.098	0.52	0.126	0.61	0.101
0	0.087	0	0.087	0	0.084

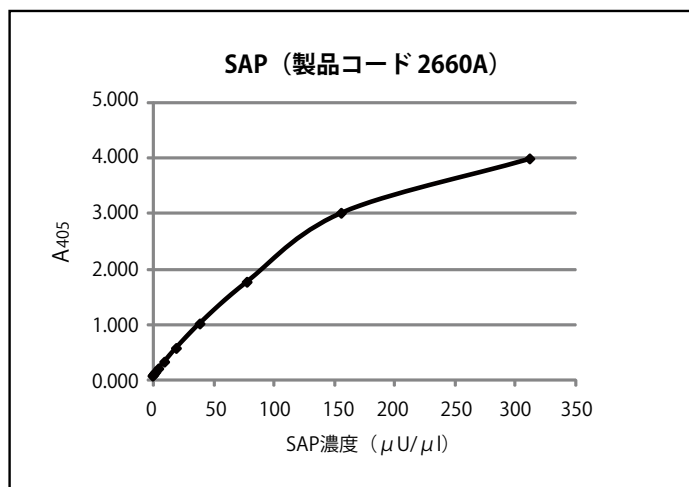
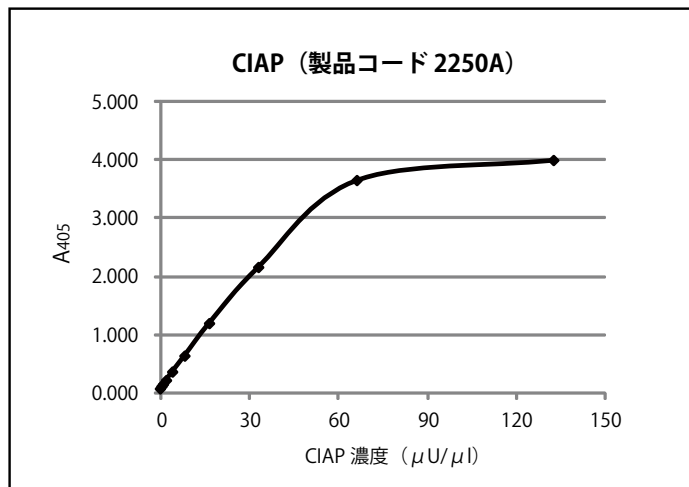
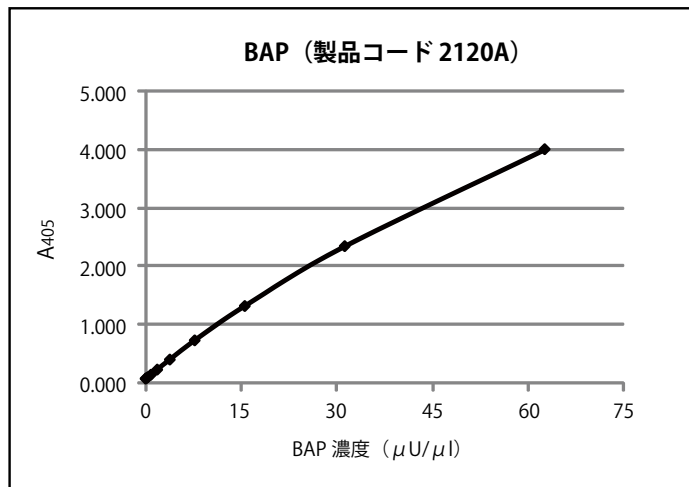


図 3. ALP 標準品を用いた標準曲線

[5] 血液サンプル調製方法による酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (TRACP) およびアルカリ性ホスファターゼ (ALP) 活性値比較

＜方法＞

ウサギ 3 個体から、同時に血液を採取し、採血血液を 3 種類の処理方法（クエン酸血漿、血清、溶血血清）で調製した。

それぞれのサンプルを希釈した溶液 50 μ l に、対応する基質溶液 50 μ l を混合し、37°C で 30 分間反応させた。0.5 N NaOH を 50 μ l 加え、マイクロプレートリーダーにより 405 nm で吸光度を測定した。どのサンプルも血液調製当日に同時測定を行った。

＜結果＞

＜酒石酸耐性酸性ホスファターゼ活性測定＞

A405 nm 測定値

TRACP ID No.	クエン酸血漿 (PPP)			血清			溶血血清		
	× 20	× 40	× 80	× 20	× 40	× 80	× 20	× 40	× 80
Rb No. 1	0.821	0.420	0.247	0.834	0.487	0.309	0.834	0.487	0.300
Rb No. 2	1.045	0.520	0.311	0.704	0.422	0.268	1.066	0.582	0.360
Rb No. 3	0.702	0.370	0.237	1.000	0.579	0.353	0.768	0.360	0.275

＜アルカリ性ホスファターゼ活性測定＞

A405 nm 測定値

ALP ID No.	クエン酸血漿 (PPP)			血清			溶血血清		
	× 2	× 4	× 8	× 2	× 4	× 8	× 2	× 4	× 8
Rb No. 1	0.514	0.321	0.217	0.801	0.469	0.295	1.074	0.599	0.374
Rb No. 2	0.481	0.299	0.206	0.528	0.327	0.217	0.801	0.483	0.304
Rb No. 3	0.348	0.231	0.165	0.718	0.431	0.275	0.650	0.398	0.252

同一個体でもサンプル調製方法の違いで、酵素活性値が変わるため、採取条件を統一する必要があることがわかる。

[6] 血清サンプルの凍結融解があたえる測定値への影響

<方法>

採取サンプルの保管上、凍結融解回数の許容を調査した。

ウサギ3個体から血清を採取し、それぞれ4分割し、回数を変えて凍結融解（-80℃⇔25℃）処理を同日に行った。酒石酸耐性酸性ホスファターゼ測定用に20、40、80倍希釈で、アルカリ性ホスファターゼ測定には、2、4、8倍希釈でサンプルを調製した。血清の希釈液50μlに、対応する基質溶液50μlを混合し、37℃で30分間反応させた。0.5N NaOHを50μl加え、マイクロプレートリーダーにより405nmで吸光度を測定した。どのサンプルも血清調製当日に凍結融解処理を繰り返し、同時測定を行った。

<結果>

<酒石酸耐性酸性ホスファターゼ活性測定>

A405 nm 測定値

TRACP	凍結融解なし			凍結融解1回			凍結融解2回			凍結融解3回		
	×20	×40	×80	×20	×40	×80	×20	×40	×80	×20	×40	×80
Rb No. 1	0.826	0.477	0.295	0.832	0.438	0.284	0.778	0.452	0.292	0.736	0.432	0.277
Rb No. 2	1.087	0.577	0.342	1.078	0.573	0.343	1.021	0.580	0.353	0.980	0.565	0.344
Rb No. 3	0.743	0.409	0.252	0.754	0.429	0.269	0.749	0.434	0.279	0.710	0.424	0.275

<アルカリ性ホスファターゼ活性測定>

A405 nm 測定値

ALP	凍結融解なし			凍結融解1回			凍結融解2回			凍結融解3回		
	×2	×4	×8	×2	×4	×8	×2	×4	×8	×2	×4	×8
Rb No. 1	0.616	0.338	0.281	0.602	0.328	0.212	0.592	0.335	0.214	0.588	0.330	0.221
Rb No. 2	0.577	0.327	0.206	0.600	0.338	0.214	0.562	0.324	0.209	0.577	0.334	0.213
Rb No. 3	0.400	0.243	0.164	0.423	0.255	0.170	0.440	0.261	0.175	0.415	0.248	0.173

酒石酸耐性酸性ホスファターゼ、アルカリ性ホスファターゼともに凍結融解の影響は、比較的受けにくいと見受けられたが、測定サンプルの凍結融解は同一条件で2回までにとどめるほうが望ましいと判断した。

VII. 参考文献

- 1) Burstone, M.S. *et al.* (1958) *J Natl Cancer Inst.* **20**, 601-615.
- 2) Burstone, M.S. *et al.* (1958) *J Natl Cancer Inst.* **21**, 523-539.
- 3) Burstone, M.S. (1959) *J Histomorph Chem Cytochem.* **7**, 39-41.
- 4) Harlow and Lane (1988) *Antibodies, A LABORATORY MANUAL*, 406-407.

VIII. 関連製品

TRACP & ALP double-stain Kit (製品コード MK300)
Alkaline Phosphatase (*E. coli* C75) (BAP) (製品コード 2120A)
Alkaline Phosphatase (Calf intestine) (CIAP) (製品コード 2250A)
Alkaline Phosphatase (Shrimp) (SAP) (製品コード 2660A)

IX. 注意

- ・本製品は、研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- ・タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ・ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- ・本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先

TakaRa テクニカルサポートライン

Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995

ホームページアドレス <http://www.takara-bio.co.jp/>

タカラバイオ株式会社