

Atlantis Premier BEH Z-HILIC カラムを装着した ACQUITY Premier システムを用いた、ペントースリン酸経路と解糖系の代謝物、およびエネルギー代謝物の分離

Kerri M. Smith, Fadi L. Alkhateeb, Kathryn Brennan, Paul D. Rainville, Thomas H. Walter

Waters Corporation

研究目的のみに使用してください。診断用には使用できません。

要約

従来の LC システムおよびカラムでは、リン酸化代謝物の分析は、金属表面との相互作用により困難になります。ここでは、血漿および組織抽出物中の 27 種のペントースリン酸経路と解糖系の代謝物、およびエネルギー代謝物のターゲット UPLC-MS/MS 分析法について説明します。この分析法では、ACQUITY Premier システムおよび Atlantis Premier BEH Z-HILIC カラムで採用されている MaxPeak High Performance Surfaces テクノロジーの利点を活かして、代謝物の金属表面との相互作用を低減しています。また、移動相に pH 9 の重炭酸アンモニウムバッファーを使用した場合にピーク幅、ピーク対称性、および感度が最良になったことから、高 pH 移動相に対するカラムの安定性も重要です。得られた結果からは、高効率の UPLC の圧力に耐えられる 1.7 μm Atlantis Premier BEH Z-HILIC カラムにより、このような困難な分析種について優れた分離が得られることが実証されています。

アプリケーションのメリット

- ターゲット UPLC-MS/MS 分析法で、27 種類の困難な代謝物についてシャープで対称的なピークを実現
- 塩基性条件で安定性の高い Atlantis Premier BEH Z-HILIC カラムで、最適な pH 9 のバッファーが使用できるよう

に

- MaxPeak High Performance Surfaces テクノロジーを採用した UPLC システムおよびカラムにより、優れたピーク幅とピーク対称性、および感度を実現

はじめに

中枢炭素代謝は、複数の酵素に媒介される経路で構成され、これらが協調的に働いて、細胞の増殖および恒常性に必要なエネルギー、前駆体、および補因子の還元が行われています。中枢炭素代謝の中でも、解糖系とペントースリン酸経路の2つが重要です。解糖系は、酸素が多い条件下でグルコースをピルビン酸に変換し、酸素が少ない条件下で更に乳酸に変換する一連の反応で構成されています。これらの代謝物は、トリカルボン酸 (TCA) 回路に入ります。このような反応により ATP が生じ、NADH が NAD⁺ に酸化されます。ペントースリン酸経路は、解糖系の代わりに、グルコースを最終的にリボース 5-リン酸および NADPH に変換します。リボース 5-リン酸は、更に反応して DNA や RNA の構成要素であるリボース糖になります¹。疾患による中枢炭素代謝物の相対濃度の攪乱について、その根底にあるメカニズムを理解するための研究が行われています²。

ペントースリン酸経路および解糖系の成分の分析では、ほとんどの成分がリン酸基を含むため極性が高いという特性を持ち、多くの異性体が存在するという課題に直面しています。代謝物にリン酸基が存在すると、分析システム中でこれらの分析種が金属表面に吸着する原因になります。そのため、金属への吸着によってピーク形状が悪くなり、ばらつきが大きくなり、感度が低下するため、測定の信頼性が下がります。

双性イオン HILIC カラムである Atlantis Premier BEH Z-HILIC カラムを使用して、ペントースリン酸経路と解糖系の代謝物、およびエネルギー代謝物を分析する分析法を紹介します。このカラムには、エチレン架橋型ハイブリッド (BEH) 粒子上のスルホベタイン固定相が含まれています³。この材質が MaxPeak High Performance Surfaces (HPS) カラムハードウェアに充填されており、金属に吸着しやすい化合物の金属表面との相互作用が低減します⁴。このカラムを、MaxPeak HPS テクノロジーを採用した ACQUITY Premier システムおよび Xevo TQ-S micro タンデム四重極質量分析計で使用しました。

実験方法

移動相の調製

調製の再現性を確保するため、最適化した移動相を 3 日ごとに重量測定法で調製しました。上皿天びんで重炭酸アンモ

ニウム (Sigma 09830) 2.96 g を秤量し、水を加えて 240 g にして 150 mM 重炭酸アンモニウム pH 9.00 のストック溶液を調製しました。次にこの溶液に、28% 水酸化アンモニウム水 (Sigma 338818) を加えて pH 9.00 (+/- 0.02) に調整し、天びんに戻して 250 g になるように正確に計量しました。このバッファー濃縮液 100 g を 2 本の LDPE 移動相のボトルに加えました。900 g の水を秤量して 1 本のボトルに加えて移動相 A を作製し、707.6 g (900 mL) のアセトニトリル (ACN) を計量して 2 本目のボトルに加えて移動相 B を作製しました。これらの移動相にしっかりとキャップし、20 分間超音波処理してから使用しました。

pH スクリーニング用の移動相も同様の方法で作製しましたが、移動相 A と B の最終的な比率は容積で測定しました。簡単に説明すると、0.976 g の酢酸アンモニウム (Sigma 431311) を秤量し、水を加えて約 100 g にしました。酢酸 (Sigma 338826) または 28% 水酸化アンモニウムのいずれかを添加して pH を調整した後、溶液を天びんに戻して重量 125 g を正確に計量し、100 mM 溶液にしました。この溶液 50 mL を 2 本の移動相ボトルに加えました。1 本のボトルに 450 mL の水を加えて移動相 A を作製し、もう 1 本のボトルに 450 mL のアセトニトリルを加えて移動相 B を作製しました。しっかりとキャップをして 20 分間超音波処理しました。

ストック溶液の調製

高純度の分析種の標準品は Sigma Aldrich から入手しました。グリセルアルデヒド 3-リン酸は 10.7 mg/mL 水溶液、その他はすべて固体として購入しました。ストック溶液は、20 mM 遊離酸の 50% ACN/50% H₂O 溶液を個別に作製しました。次に、これらを合わせて 3 つの等濃度 (1 mM) 混合物の 50% ACN/50% H₂O 溶液にし、作業用ストック溶液としました。安定同位体標識内部標準溶液 (Cambridge Isotope Laboratories、Sigma Aldrich) はそれぞれ、50% ACN/50% H₂O 中に遊離酸濃度 1 mM で作製しました。100 μM の乳酸¹³C と、それぞれ 10 μM のグルコース 6-リン酸-¹³C、AMP-¹³C¹⁵N、ADP-¹⁵N、ATP-¹³C、GMP-¹³C¹⁵N、および GTP-¹³C を含む 5 倍濃度の作業用内部混合標準液は、50% ACN/50% H₂O 中に作製しました。すべてのストック溶液を -20 °C で保管しました。

検量線用の標準液は、50% ACN/50% H₂O 中に、作業用ストック溶液からの連続希釈により調製し、250、125、50、25、12.5、5、2.5、1.25、0.50、0.250、0.125、0.050 μM の標準ストック溶液を作製しました。各標準 5 μL および内部混合標準液 5 μL を、シラン処理済みバイアル中の 50% ACN/50% H₂O 15 μL に加えました。これは 25 μL 中でそれぞれ 50、25、10、5、2.5、1、0.5、0.25、0.1、0.05、0.025、0.01 μM のキャリブレーション溶液になります。次に、50% ACN/50% H₂O 75 μL を加えて、最終容量を 100 μL にしました。したがって、検量線の最終濃度は 12.5、6.25、2.5、1.25、0.625、0.25、0.125、0.0625、0.025、0.0125、0.00625、0.0025 μM になります。

肝臓および脳からの抽出

サンプル前処理は、以前説明した方法⁵に基づき、変更を加えて行いました。メスの Sprague Dawley ラットの肝臓およびオスの Sprague Dawley ラットの脳は BioIVT (米国ニューヨーク州ウエストバリー) から入手しました。25 mL の肝臓/脳を 2 mL の Precellys 組織均質化チューブ (製品番号 10409) に加え、続いて 750 μL の 80% MeOH/20% H₂O (氷冷) を加えました。サンプルは、5,800 rpm で 3 × 15 秒間、サイクル間に 30 秒の休止があるプログラムを使用

して Precellys Evolution で均質化しました。ホモジネートを新しい 1.5 mL 微量遠心チューブにピペティングし、これを 20 °C で 60 分間放置しました。サンプルを 18,407 x g、4 °C で 10 分間遠心分離しました。上清を 1.5 mL の微量遠心チューブに移し、TurboVap を使用して室温で、1 L/分で 100 分間、2.5 L/分で 30 分間乾燥させました。サンプルを 50 µL の 50% ACN/50% H₂O に再溶解し、簡単にボルテックス混合して 4 °C で 10 分間放置した後、18,407 x g、4 °C で 10 分間遠心分離しました。サンプルは、トータルリカバリーシラン処理済みバイアルにピペティングし、すぐに分析しました。

血漿の抽出

プールした性別別の Sprague Dawley K2EDTA 血漿は、BioIVT（米国ニューヨーク州ウエストバリー）から購入しました。25 µL の血漿を 1.5 mL の微量遠心チューブに加えました。次に、125 µL の 80% MeOH/20% H₂O（氷冷）を加えました。1 分間ボルテックス混合し、カバーをかけて、室温で 20 分間、シェイカーで 250 rpm で振とうしました。次に、このサンプルを -20 °C のフリーザーに 60 分間放置しました。サンプルを 18,407 × g、4 °C で 10 分間遠心分離しました。上清は、1.5 mL の微量遠心チューブに移し、TurboVap を使用して室温で、1 L/分で 100 分間、2.5 L/分で 30 分間乾燥させました。サンプルを 50 µL の 50% ACN/50% H₂O に再溶解し、簡単にボルテックス混合して 4 °C で 10 分間放置した後、18,407 x g、4 °C で 10 分間遠心分離しました。サンプルは、トータルリカバリーシラン処理済みバイアルにピペティングし、すぐに分析しました。

LC 条件

LC システム:	ACQUITY Premier BSM システム
バイアル:	ウォーターズトータルリカバリーバイアル、不活性型 (製品番号: 186000385DV)
移動相容器:	Waters 品質保証 LDPE 容器、1 L (製品番号 : 186009110)
カラム:	Atlantis Premier BEH Z-HILIC、1.7 µm、2.1 × 100 mm (製品番号: 186009979)
カラム温度:	30 °C
サンプル温度:	8 °C
注入量:	3 µL

流速: 0.5 mL/分

移動相 A: 15 mM 重炭酸アンモニウム水溶液 (pH 9.00)

移動相 B: 15 mM 重炭酸アンモニウム 90% ACN/10% H₂O (v/v) 溶液 (pH 9.00)

グラジエントテーブル

時間 (分)	流速 (mL/分)	%A	%B	曲線
初期条件	0.5	10	90	
5.00	0.5	35	65	6
6.00	0.5	35	65	6
6.50	1.0	10	90	6
9.50	1.0	10	90	6
9.51	0.5	10	90	6

MS 条件

MS システム: Xevo TQ-S micro タンデム四重極型質量分析計

イオン化モード: ポジティブ/ネガティブ

キャピラリー電圧: 1 kV/1 kV

酸アンモニウム (pH 9.0) を使用すると、リボース 5-リン酸 (5P) の同重体であるリブロース 5P/キシロース 5Pからの分離が改善し、3PG のピークが大幅にシャープになることが分かりました。最後に、ピーク形状と保持に対するバッファー濃度の影響を調べました。移動相 A と B の両方に pH 9.0 (5、10、15、20 mM) の重炭酸アンモニウムバッファーを用いて分離を行いました。図 3 に、この試験の結果の例として 2PG と 3PG の分離を示します。バッファー濃度を上げると、分析種の保持時間が長くなることが分かります。実際、この現象はこの試験で用いたすべての分析種で見られました。15 mM 重炭酸アンモニウム (pH 9.0) バッファーにより、3PG および他の分析種に最適なピーク形状が得られたので、これを最終的な分析法に用いました。

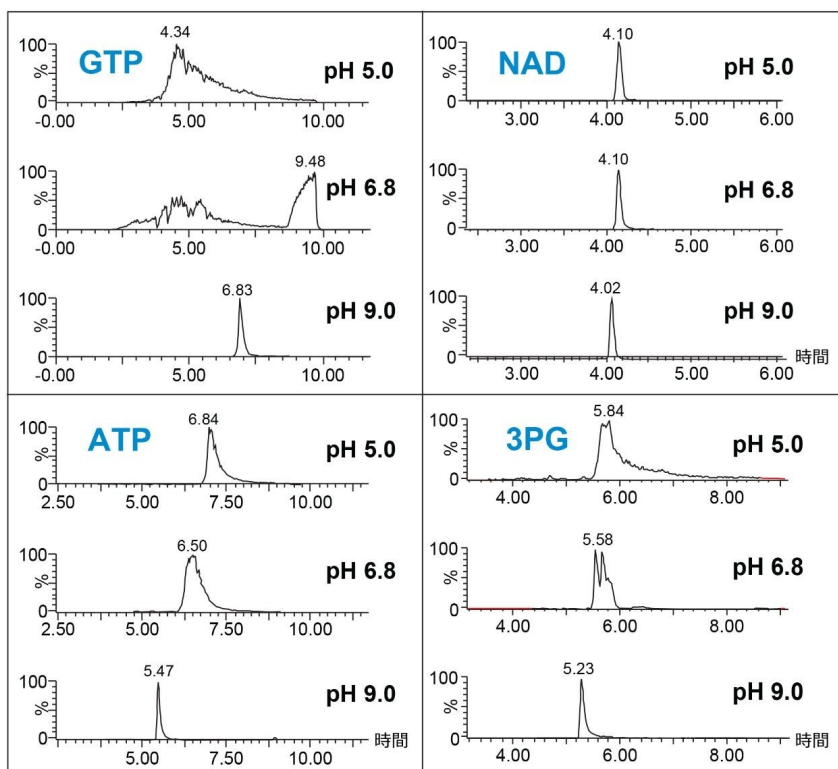


図 1. 移動相 pH がリン酸化分析種のピーク形状に及ぼす影響

10 mM 重炭酸アンモニウム、pH 9.0

10 mM 酢酸アンモニウム、pH 9.0

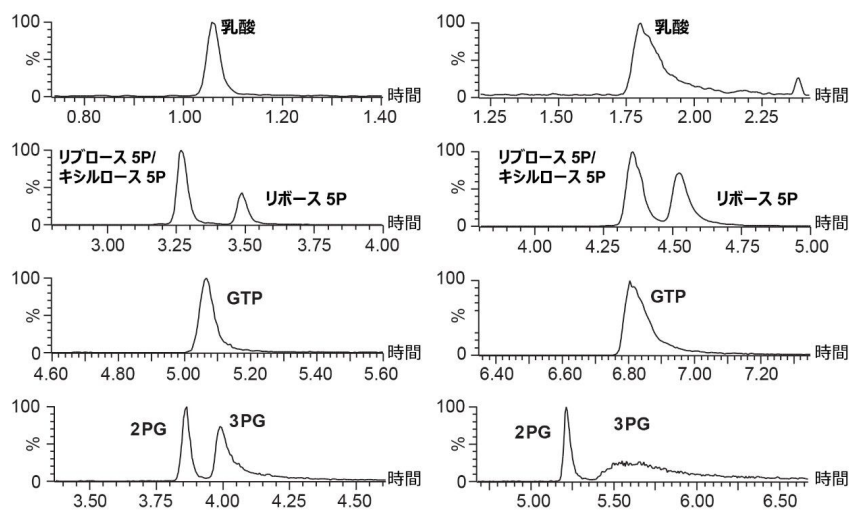
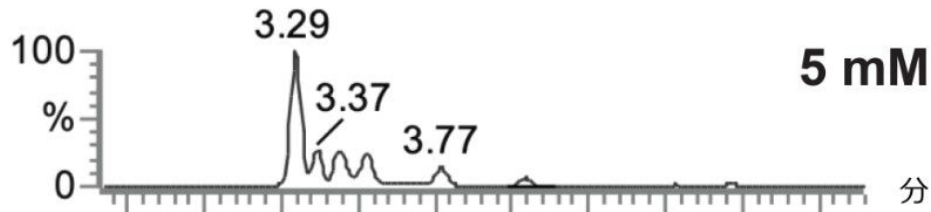


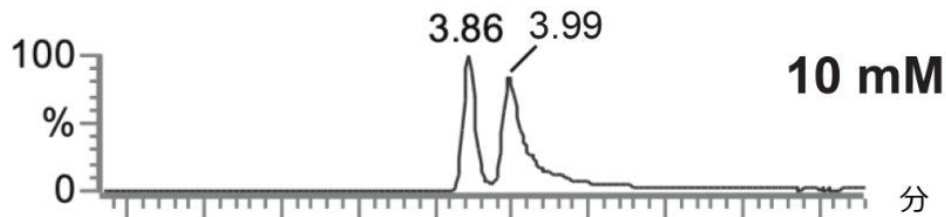
図 2. 移動相のバッファーが分析種のピーク形状と分離度に及ぼす影響

重炭酸アンモニウム、pH 9.0

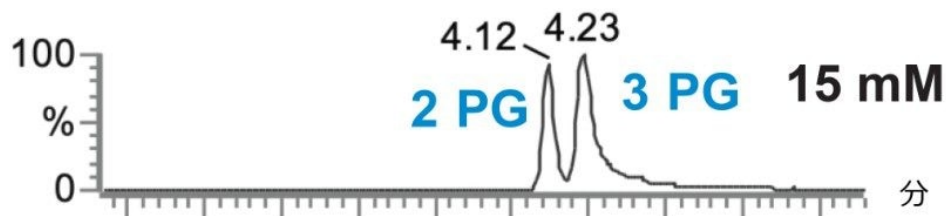
27G21_026



27G21_054



28G21_016



28G21_048

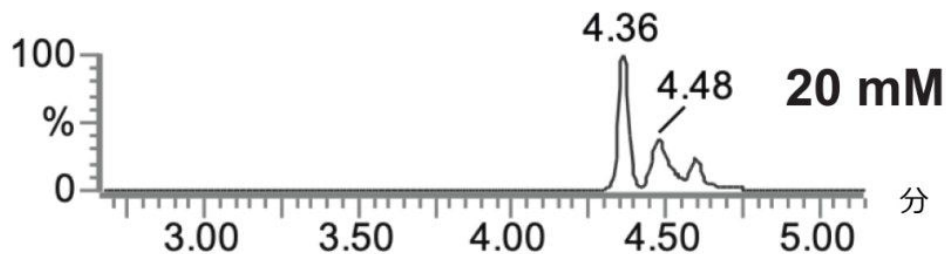


図3. 移動相のバッファー濃度が2PGと3PGの分離に及ぼす影響

各分析種を質量分析計に注入することで MS 条件を最適化しました。最適なパラメーターを表 1 に示します。50: 50 アセトニトリル/水に溶解した 27 種の分析種の代表的な分離を図 4 に示します。2.1 × 100 mm、1.7 μm Atlantis Premier BEH Z-HILIC カラムを流速 0.5 mL/分で使用しました。ポジティブおよびネガティブのイオンエレクトロスプレー (ES) イオン化を使用して検出されたクロマトグラムを別々に示します。ほぼすべての分析種について、シャープで対称性のあるピークが見られました。同重体ペアである 5P/リボース-5P および 2PG/3PG が十分に分離されました。安定同位体標識内部標準に対するピーク面積の比を使用して、27 種類の分析種すべてについて検量線を作成しました。相関係数は、グリセルアルデヒド-3-リン酸の 0.9904 から、リブロース 5P/キシルロース 5P および ADP の 0.9996 までの範囲でした (表 2 参照)。定量下限 (LLOQ) は 0.0063 ~ 1.25 μM の範囲でした。

#	名前	モード	プリカーサー イオン (m/z)	プロダクト イオン (m/z)	コーン電圧 (V)	コリジョン エネルギー (V)
1	ビルビン酸	ES-	87	43	15	7
2	乳酸	ES-	89	43	20	12
3	デオキシリボース 5-リン酸	ES-	213	97	15	10
4	ジヒドロキシアセトンリン酸	ES-	169	97	20	10
5	リブローズ 5-リン酸/ キシロース 5-リン酸	ES-	229	97	10	14
6	リボース 5-リン酸	ES-	229	97	10	14
7	グリセルアルデヒド 3-リン酸	ES-	169	97	20	10
8	セドヘプチュロース 7-リン酸	ES-	289	97	20	17
9	フルクトース 6-リン酸	ES-	259	97	25	14
10	2-ホスホグリセリン酸	ES-	185	97	25	15
11	3-ホスホグリセリン酸	ES-	185	97	25	15
12	ホスホエノールビルビン酸	ES-	17	79	20	10
13	グルコース 6-リン酸	ES-	259	97	25	14
14	フルクトース 1,6-二リン酸	ES-	339	97	15	20
15	6-ホスホグルコン酸	ES-	275	97	20	12
16	FAD	ES+	786	348	25	25
17	アセチル CoA	ES+	810	303	25	32
18	NADH	ES+	666	649	15	15
19	AMP	ES+	348	136	25	16
20	NAD	ES+	664	524	25	15
21	ADP	ES+	428	136	30	20
22	GMP	ES+	364	152	25	15
23	ATP	ES+	508	136	25	26
24	NADPH	ES+	746	729	25	18
25	NADP	ES+	744	604	25	18
26	GDP	ES+	444	152	25	22
27	GTP	ES+	524	152	30	24
	エリスロース 4P	ES-	199	97	25	10
	乳酸-C13	ES-	92	45	20	12
	AMP-C13N15	ES+	363	146	25	16
	AMP-C13N15 neg	ES-	361	144	25	32
	ADP-N15	ES+	433	141	30	20
	ADP-N15 neg	ES-	431	139	25	20
	GMP-C13N15	ES+	379	162	25	15
	GMP-C13N15 neg	ES-	377	79	25	45
	G6P-C13	ES-	265	97	15	9
	ATP-C13	ES+	518	141	25	26
	ATP-C13 neg	ES-	516	139	25	37
	GTP-C13	ES+	534	157	30	24
	GTP-C13 neg	ES-	532	79	25	37

表 1. MS パラメーター

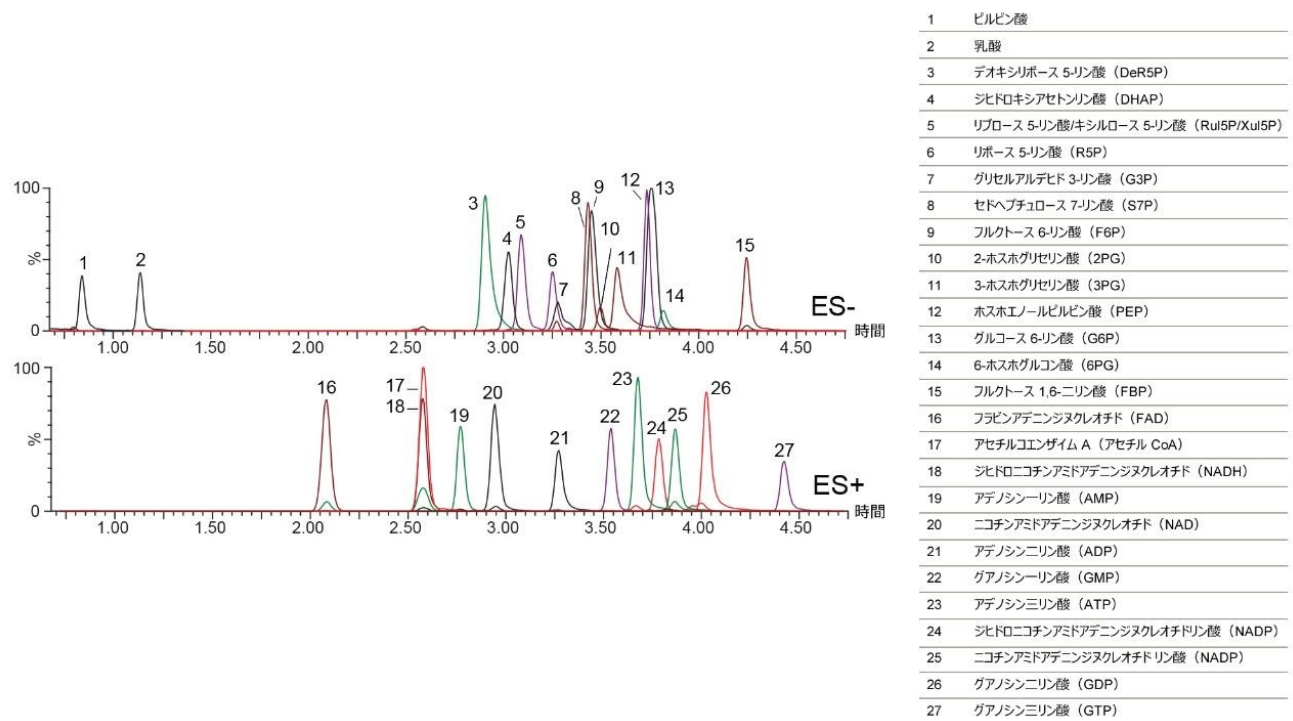


図 4. 50/50 ACN/水溶液中の分析種標準の代表的なクロマトグラム

#	名前	IS	保持時間 (分)	LLOQ, μM	ULOQ, μM	R ²
1	ピルビン酸	乳酸-C13	0.9	0.625	6.25	0.9941
2	乳酸	乳酸-C13	1.2	1.25	12.5	0.9987
3	デオキシリボース 5-リン酸	ADP-N15 neg	2.8	0.0063	6.25	0.9993
4	ジヒドロキシアセトンリン酸	ADP-N15	3.0	0.0625	6.25	0.9983
5	リブローズ 5-リン酸/ キシロース 5-リン酸	ADP-N15 neg	3.1	0.0125	12.5	0.9996
6	リボース 5-リン酸	ADP-N15 neg	3.3	0.0125	2.5	0.9978
7	グリセルアルデヒド 3-リン酸	ADP-N15 neg	3.3	1.25	12.5	0.9904
8	セドヘプチュロース 7-リン酸	ADP-N15 neg	3.4	0.0063	6.25	0.9985
9	フルクトース 6-リン酸	ADP-N15 neg	3.4	0.0625	6.25	0.9974
10	2-ホスホグリセリン酸	GMP-C13N15 neg	3.5	0.125	2.5	0.9990
11	3-ホスホグリセリン酸	G6P-C13	3.6	0.125	2.5	0.9965
12	ホスホエノールピルビン酸	ATP-C13 neg	3.7	0.025	2.5	0.9980
13	グルコース 6-リン酸	G6P-C13	3.7	0.0125	6.25	0.9997
14	フルクトース 1,6-二リン酸	GTP-C13 neg	4.3	0.025	6.25	0.9980
15	6-ホスホグルコン酸	ATP-C13 neg	3.9	0.025	6.25	0.9972
16	FAD	AMP-C13N15	2.1	0.25	12.5	0.9969
17	アセチル CoA	AMP-C13N15	2.6	0.0063	6.25	0.9985
18	NADH	AMP-C13N15	2.6	0.0063	2.5	0.9990
19	AMP	AMP-C13N15	2.8	0.0125	6.25	0.9990
20	NAD	ADP-N15	2.9	0.0625	12.5	0.9952
21	ADP	ADP-N15	3.3	0.0125	6.25	0.9996
22	GMP	GMP-C13N15	3.5	0.125	12.5	0.9976
23	ATP	ATP-C13	3.7	0.0125	6.25	0.9995
24	NADPH	ATP-C13	3.8	0.0625	12.5	0.9993
25	NADP	ATP-C13	3.9	0.0125	2.5	0.9960
26	GDP	ATP-C13	4.0	0.0125	12.5	0.9982
27	GTP	GTP-C13	4.4	0.025	2.5	0.9987

表 2. 検量線の結果

この分析法を、ラット血漿、ラット肝臓、ラット脳の抽出物中の 27 種の分析種のターゲット分析に使用しました。代表的なクロマトグラムを図 5 に示しました。これらの組織抽出物中には、溶媒中に調製した標準で見られたようなシャープで対称性のあるピークも見られました。血漿サンプル中に、高濃度のホスホエノールピルビン酸 (PEP) が、3

PG、ADP、GMP、フルクトース-6-リン酸 (F6P) 、グルコース-6-リン酸 (G6P) とともに検出されました。後者の3種類の代謝物は、肝臓と脳の組織サンプルでも見られました。更に、肝臓抽出物には高濃度のニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NADP) が認められ、脳抽出物には高濃度のアセチルコエンザイム A (アセチル CoA) が認められました。

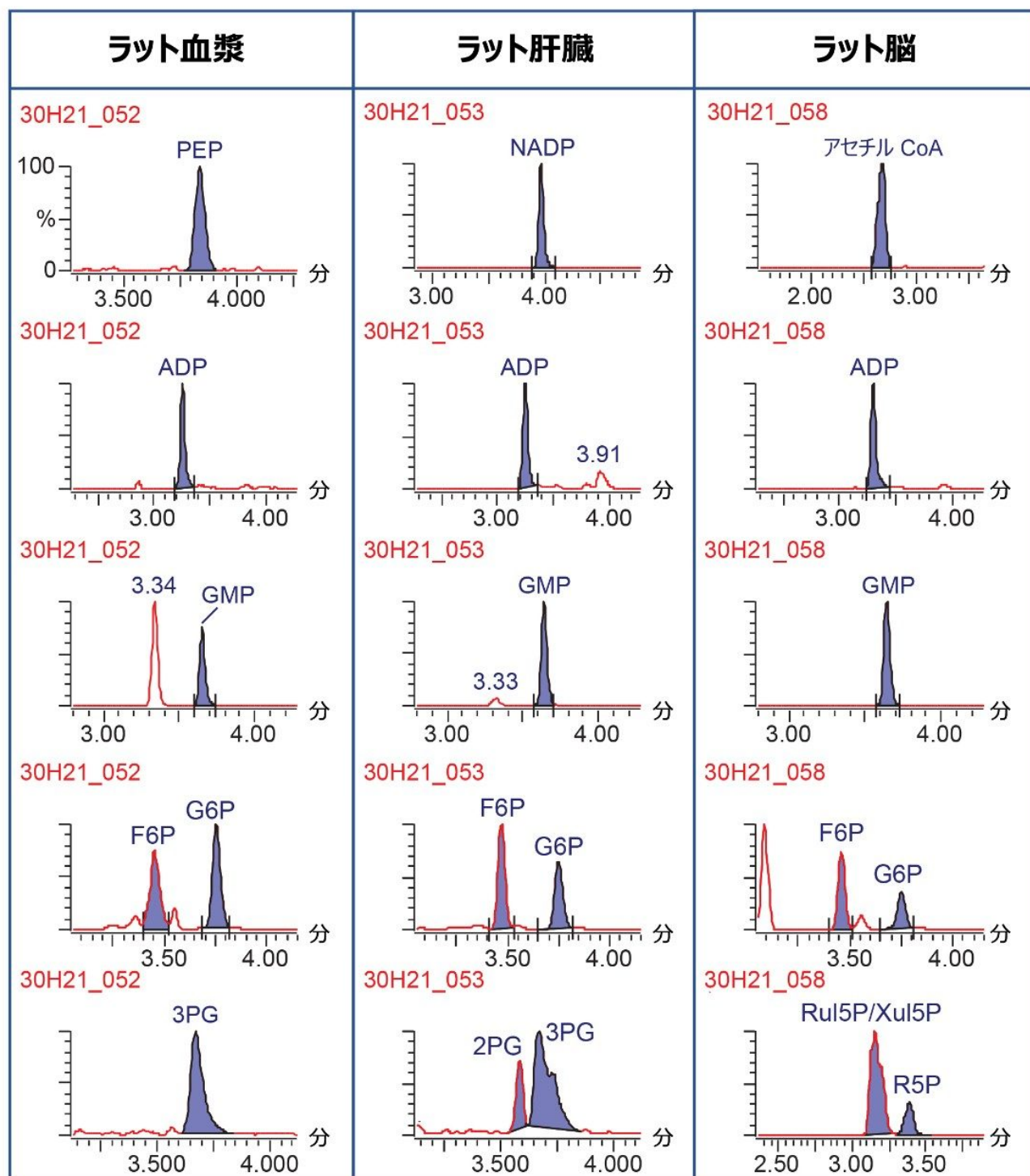


図 5. ラット血漿および組織抽出物中の分析種の代表的なクロマトグラム

結論

血漿および組織抽出物中の 27 種のペントースリン酸経路と解糖系の代謝物、およびエネルギー代謝物のターゲット分析のための高感度 UPLC-MS/MS 分析法を開発しました。ACQUITY Premier システムと Atlantis Premier BEH Z-HILIC カラムを使用することで、これらの困難な分析種について、シャープで対称性のあるピークが得られました。pH 9.0 の重炭酸アンモニウムバッファーを使用した場合、多くの代謝物について最良のピーク幅、ピークの対称性、および感度が得られたことから、この分析法には、塩基性移動相に対する BEH Z-HILIC カラムの安定性が不可欠でした。この結果からは、ACQUITY Premier システムと Atlantis Premier BEH Z-HILIC カラムが、特に金属表面と相互作用する代謝物の極性メタボロミクスアッセイに有用であることが示唆されます。

参考文献

1. Murray RK, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Rodwell VW, Weil PA. Harper's Illustrated Biochemistry, 28th ed. New York: McGraw-Hill, Chapters 16–18 and 21, Pages 131–156 and 174–183, 2009.
2. Ge T, Yang J, Zhou S, Wang Y, Li Y, Tong X. The Role of the Pentose Phosphate Pathway in Diabetes and Cancer. *Front in Endocrinol*, 11:365, 2020.
3. Walter TH, Berthelette KD, Patel A, Alden BA, McGlaughlin J, Field J, Lawrence N, Shiner S. Introducing Atlantis BEH Z-HILIC: A Zwitterionic Stationary Phase Based on Hybrid Organic/Inorganic Particles, Waters Application Note [720007311EN](#), July 2021.
4. Lauber M, Walter TH, Gilar M, DeLano M, Boissel C, Smith K, Birdsall R, Rainville P, Belanger J, Wyndham K. Low Adsorption HPLC Columns Based on MaxPeak High Performance Surfaces, Waters White Paper [720006930EN <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720006930en.pdf>](https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720006930en.pdf), Oct 2020.
5. Want EJ, Masson P, Michopoulos F, Wilson ID, Theodoridis G, Plumb RS, Shockcor J, Loftus N, Holmes E, Nicholson JK. Global Metabolomic Profiling of Animal and Human Tissues via UPLC-MS. *J. Proteome Res.*, 12:17–32, 2013.
6. Bajad SU, Lu W, Kimball EH, Yuan J, Peterson C, Rabinowitz JD. Separation and Quantitation of Water Soluble Cellular Metabolites by Hydrophilic Interaction Chromatography–Tandem Mass Spectrometry, *J. Chromatogr. A.*; 1125:76–88, 2010.
7. Teleki A, Sánchez-Kopper A, Takors R. Alkaline Conditions in Hydrophilic Interaction Chromatography for Intracellular Metabolite Quantification Using Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Biochem.*; 475:4–13, 2015.

8. Zhang T, Creek DJ, Barrett MP, Blackburn G, Watson DG. Evaluation of Coupling Reversed Phase, Aqueous Normal Phase, and Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography With Orbitrap Mass Spectrometry for Metabolomic Studies of Human Urine. *Anal. Chem.*; 84:1994–2001, 2012.
9. Zhang R, Watson DG, Wang L, Westrop GD, Coombs GH, Zhang T. Evaluation of Mobile Phase Characteristics on Three Zwitterionic Columns in Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography Mode for Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry Based Untargeted Metabolite Profiling of Leishmania Parasites. *J. Chromatogr. A.*; 1362:168–179, 2014.
10. DeLano M, Walter TH, Lauber MA, Gilar M, Jung MC, Nguyen JM, Boissel C, Patel AV, Bates-Harrison A, Wyndham KD. Using Hybrid Organic-Inorganic Surface Technology to Mitigate Analyte Interactions With Metal Surfaces in UHPLC. *Anal. Chem.*; 93(14): 5773–5781, 2021.
11. Walter TH, Trudeau M, Simeone J, Rainville P, Patel AV, Lauber MA, Kellett J, DeLano M, Brennan K, Boissel C, Birdsall R, Berthelette K. Low Adsorption UPLC Systems and Columns Based on MaxPeak High Performance Surfaces: The ACQUITY Premier Solution. Waters White Paper [720007128EN](#) <<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720007128en.pdf>> , Feb 2021.

ソリューション提供製品

ACQUITY Premier システム <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077739>>

Xevo TQ-S micro タンデム四重極質量分析計 <<https://www.waters.com/134798856>>

MassLynx MS ソフトウェア <<https://www.waters.com/513662>>

Atlantis Premier BEH Z-HILIC カラム <https://www.waters.com/nextgen/us/en/products/columns/atlantis-premier-columns.html?alias=Alias_AtlantisPremier&xcid=o-o_22753>

720007411JA、2021年11月改訂

© 2022 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[利用規約](#)
[環境設定](#)

[プライバシー](#)

[商標](#)

[サイトマップ](#)

[キャリア](#)

[クッキー](#)

[クッキー](#)