

DMPK 試験におけるタンデム四重極取り込みモード

Robert S. Plumb

Waters Corporation

要約

タンデム四重極質量分析計は、極めて強力な柔軟な装置です。pg/mL レベルの検出限界を容易に達成できるため、高感度定量分析に適した装置であり、ヒト初回投与試験 (FTIH) などの DMPK 試験をサポートするために広く使用されています。タンデム四重極装置の構成および最新の高速度データ取り込みにより、ニュートラルロス、プリカーサーイオンスキャン、プロダクトイオンスキャン、極性切り替えなど、他の複数のデータ取り込みモードを容易に使用できるため、DMPK の研究者は、サンプルを容易かつ迅速に解析できて、創薬や規制申請プロセスに役立てることができます。

アプリケーションのメリット

Waters Xevo TQ-XS タンデム四重極質量分析計は、複数の取り込みモードを備えた強力な柔軟な装置です。これにより、DMPK の研究者は、フルスキャン、プリカーサーイオンスキャン、コンスタントニュートラルロスなどのさまざまな取り込みモードを活用して、高感度定量や代謝物スクリーニングを迅速に開発することができます。

はじめに

タンデム四重極質量分析計は、その選択性、特異性、感度により、定量 LC-MS/MS 分析の主力装置として使用されています。これらの特性は、生体液、廃水、製剤、食品などの複雑な混合物中の微量レベルのターゲット分析種を分析するのに最適です¹。タンデム四重極装置は、製薬業界では、製造における原薬および製剤中の微量レベルの不純物の測

定に使用されています。また、探索試験、前臨床開発試験、臨床開発試験をサポートする目的で、体液中の薬物およびその代謝物の定量にも広く使用されています^{2,3}。マルチプルリアクションモニタリングモード（MRM）の優れた感度により、pg/mLさらにはfg/mLの範囲の4～5桁の広いダイナミックレンジで、対象分析種をルーチンに測定することができます⁴。最新のタンデム四重極装置では、高速データ取り込みが実現できるため、1～2秒のピーク幅が存在するキャピラリーGCやUHPLCなどの高分離能クロマトグラフィー分析法と組み合わせるのに非常に適しています。これらの特性により、マルチプルリアクションモニタリングモード（MRM）で動作する液体クロマトグラフィーとタンデム四重極MSの組み合わせが、薬物試験や開発DMPK試験をサポートするテクノロジーとして選ばれるようになりました。

尿、血漿、血清、組織、胆汁、脳脊髄液（CSF）などの生体液中の薬物およびその代謝物の定量とともに、これらのサンプル中における薬物関連の代謝物の存在を調査することで、毒物学的な対象範囲をカバーし、新規代謝物を検出し、グルタチオンなどの薬物関連の毒性の指標となる可能性のある生体内反応をモニターするというニーズもあります^{5,6}。タンデム四重極MSの独自の構成およびイオン光学系により、ニュートラルロス、プリカーサーイオンスキャン、プロダクトイオンスキャン、極性切り替えなどの複数の異なる取り込みモードの使用、およびこれらの取り込みモードを2つ以上組み合わせた他のデータ依存取り込みが容易に行えます。これらのノミナル質量取り込みモードは、ACSガイドラインに準拠した確定的な構造レポート作成には使用できませんが、タンデム四重極MS装置に、高感度定量に加えて、分析法開発、トラブルシューティング、スクリーニングなどの汎用性を追加する有用なデータ収集モードです。

これらの取り込みモードを使用して、診断フラグメントイオンによる薬物類縁物質のモニタリング、硫酸塩やグルクロニドなどの薬物代謝物のクラスのスクリーニング、診断フラグメントイオンによる薬物関連不純物のスクリーニングを行うことができます。また、これらの取り込みモードを使用して、プロダクトイオンスキャンを使用するデータ依存取り込み（DDA）モードによって、毒性のある生体内反応の有無（グルタチオンなど）を確認し、極性切り替えあり/なしでのMS/MS取り込みをトリガーすることもできます。今回、薬物代謝試験におけるこれらのさまざまな取り込みモードの適用について説明し、Waters™ タンデム四重極装置全体にわたるシンプルさと汎用性について紹介します。

実験方法

サンプルの説明

オスのウィスター系ラットに5日間の繰り返し静脈内投与を行い、ラット尿中のメタピリレンおよびその代謝物を測定しました。メタピリレン150 mg/Kgを静脈内投与しました。サンプル採取時には、ラットを専用のメタボウルに1匹ずつ入れました。尿サンプルは氷上に採取し、分析まで-20℃で凍結保存しました。50 µLの尿と200 µLの氷冷したアセトニトリルを混合してサンプルを調製し、ボルテックスミキサーで混合した後、-20℃で1時間保存しました。次に、得られたサンプルを9,000 gで5分間遠心分離し、上清をトータルリカバリーバイアルに移してLC/MS/MSで分析しました。2、4、6日目の投与の24時間後、大静脈からMinivette POCT HeLi コーティングキャピラリーチューブ

に採血しました。ラット血漿サンプル（50 μ L）は、ボルテックス混合後、200 μ L のアセトニトリル：メタノール（90:10）を用いて除タンパクし、25000 g で 5 分間遠心分離して前処理しました。UPLC-MS/MS による分析では、抽出物 1 μ L をクロマトグラフィーシステムに注入しました。

試験に使用したラットは、Evotec France SAS 動物施設で飼育されたものです。この施設は、フランス農業省および国際実験動物管理公認協会（AAALAC）の認定を受けています。この試験は、対応するプロジェクト APAFIS #32640-2021101419119467 v5 に準拠しています。このプロジェクトは、Evotec France の倫理委員会によって審査され（以下 CEPAL: CE 029）、フランスの教育・高等研究省の承認を受けています。

分析条件

尿サンプルについては、2 μ L アリコート を 2.1 \times 100 mm の Cortecs™ C₈ 2.7 μ m カラムに注入してスクリーニングしました。カラムは 40 °C に維持し、0.1% ギ酸水溶液を移動相溶媒 A として、0.1% ギ酸含有 95:5 (v/v) アセトニトリル：水を移動相 B として使用する逆相リニアグラジエントで、600 μ L/分で 10 分間かけて溶出しました（表 1）。カラム溶出液はポジティブイオン ESI 質量分析計でモニターし、i) フルスキャン、ii) ニュートラルロス、iii) プリカーサーイオンスキャン、iv) プロダクトイオンスキャンモードのいずれかで動作を行いました。血漿サンプルについては、2 μ L アリコート を 2.1 \times 50 mm の Cortecs C₈ 2.7 μ m カラムに注入して分析しました。カラムは 40 °C に維持し、0.1% ギ酸水溶液を移動相溶媒 A として、0.1% ギ酸含有 95:5 (v/v) アセトニトリル：水を移動相 B として使用する逆相リニアグラジエントで、600 μ L/分で 2.5 分間かけて溶出しました（表 2）。カラム溶出液は、MRM モードで動作するポジティブイオン ESI 質量分析計で、トランジション $m/z = 262 \sim 119$ 、コーン電圧 30 V、コリジョンエネルギー 25 eV を使用してモニターしました。

グラジエントテーブル 1（尿の分析）

時間（分）	流速（mL/分）	%A	%B	曲線
0	0.6	95	5	初期条件
1	0.6	95	5	6
10	0.6	60	40	6
10.1	0.6	5	5	6
12	0.6	5	5	6
12.1	0.6	95	5	6

グラジエントテーブル 1 (血漿の分析)

時間 (分)	流速 (mL/分)	%A	%B	曲線
0	0.6	95	5	初期条件
0.5	0.6	95	5	6
2.5	0.6	60	40	6
2.51	0.6	5	5	6
3.0	0.6	5	5	6
3.1	0.6	95	5	6

グラジエントテーブル 2 (尿の分析)

時間 (分)	流速 (mL/分)	%A	%B	曲線
0	0.6	95	5	初期条件
1	0.6	95	5	6
10	0.6	60	40	6
10.1	0.6	5	5	6
11	0.6	5	5	6
11.1	0.6	95	5	6

LC 条件

LC システム:

ACQUITY™ I Class UPLC™

検出:

Xevo™ TQ-XS

バイアル:

Waters トータルリカバリーバイアル (製品番号 : 186004631)

カラム:

CORTECS Premier T3 カラム、2.7 µm、2.1 × 50 mm (製品番号: 186010472) または CORTECS Premier T3 カラム、2.7 µm、2.1 × 100 mm (製品

番号: 186010473)

カラム温度:	40 °C
サンプル温度:	8 °C
注入量:	2 µL (尿)、1 µL (血漿)
流速:	600 µL/分
移動相 A:	0.1% (v/v) ギ酸水溶液
移動相 B:	95% アセトニトリル、5% 水、0.1% (v/v) ギ酸
グラジエント:	グラジエントテーブル参照

MS 条件

MS システム:	Xevo TQ-XS
イオン化モード:	ポジティブイオン
取り込み範囲:	ESi
キャピラリー電圧:	2.0 Kv
コリジョンエネルギー:	30 eV
コーン電圧:	30 V
データ取り込み:	MRM、フルスキャン、プロダクトイオンスキャン、 コンスタントニュートラルロス、プリカーサーイオン スキャン

データ管理

クロマトグラフィーソフトウェア:	MassLynx™ バージョン 4.2
MS ソフトウェア:	MassLynxバージョン 4.2
インフォマティクス:	MassLynx バージョン 4.2

*注 5. 各ソフトウェアのバージョンを指定します

結果および考察

Waters Xevo TQ-XS タンデム四重極質量分析計は、そのイオン経路の形状により、複数の MS 取り込みモードを使用することができます。これには、フルスキャン MS (MS)、SIR (選択イオンレコーディング) /MRM (マルチプルリアクションモニタリング)、ニュートラルロス、プロダクトイオンスキャン、プリカーサーイオンスキャン、およびこれらの取り込みモードの組み合わせが含まれます (表 3 参照)。ラット尿中の抗コリン作用を有する抗ヒスタミン薬であるメタピリレン (図 1) およびその代謝物を使用して、これらのさまざまな取り込みモードを使用して得られる LC-MS の結果について説明します⁷。

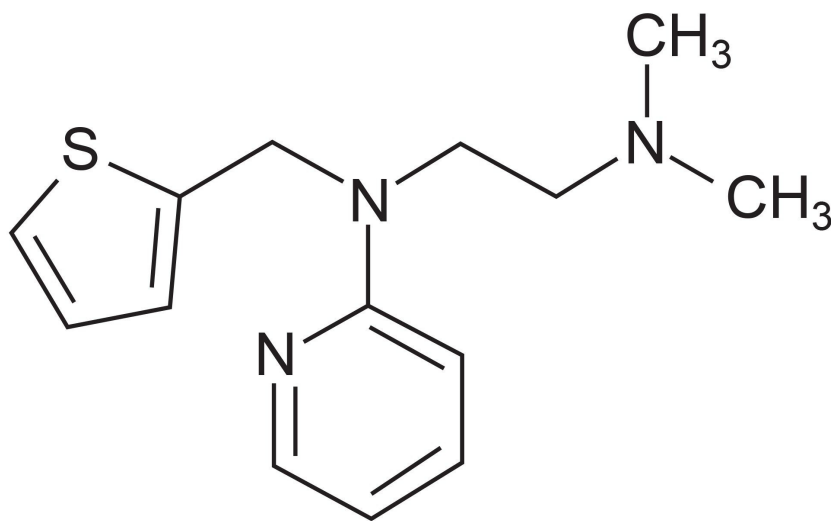


図 1. メタピリレン

表 3

取り込みモード	アプリケーション	メリット
フルスキャン	分析法開発、トラブルシューティング	偏りのないサンプルの分析、すべてのイオン化可能な分析種をモニターする
プロダクトイオンスキャン	分析法開発、構造確認	部位からの診断フラグメントイオンの決定
SIR / MRM	定量	微量レベルの定量のための高感度分析。選択性、特異性
プリカーサースキャン	類縁分析種/類縁物質の検出	診断フラグメントイオンを使用して、類縁物質、不純物/代謝物の有無についてスクリーニングする
コンスタントニュートラルロス	分析種のクラスについてのサンプルスクリーニング	特異的かつ選択的

フルスキャン MS はおそらく最もシンプルな MS データ取り込みです。この取り込みモードでは、イオン化可能なすべてのサンプルが、事前に設定した質量範囲にわたって質量分析計を通過し、MS 検出器でシグナルが検出されます（図 2）。四重極の 1 つで、（例えば m/z 50 ~ 800 などの事前設定した質量範囲にわたって）スキャンが行われることによって m/z 値が決まり、どの瞬間にも特定の m/z のイオンのみが検出器に到達するようになります。各分析種のレスポンスの大きさは、サンプルの濃度、電荷を受け入れる能力、イオン化効率、溶媒の pH、バッファー濃度、有機溶媒の組成などによって異なります。この分析モードでは、化学分子種のプリカーサーイオンとプロダクトイオンの両方を検出することができます。この取り込みモードは、同じ分析において -ve イオンモードおよび +ve イオンモードの両方で実行することができます。図 3 に示すデータは、 $t_R = 2.45$ 分で溶出する濃度 100 ng/mL のメタピリレン真正標準試料の分析から得られた LC-MS ポジティブイオンクロマトグラムおよび MS スペクトルです。ここでは、ベースピークの質量が $m/z = 262.23$ であり、 $m/z = 217.14$ 、 166.24 、 96.88 にメタピリレンのフラグメントイオンの証拠もあります。これらはおそらく、イオン化プロセスにおけるイオン源内フラグメンテーションに起因するものと思われます。

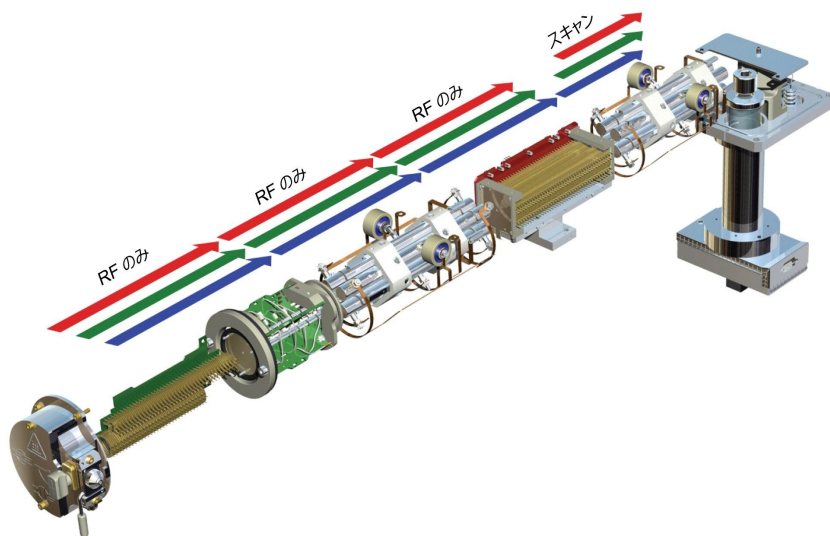


図2. フルスキャン取り込みモード

フルスキャン MS/MS

最初に分解を行う四重極では、特定のイオンまたは m/z 値の事前選択に続いて、フルスキャン MS/MS（プロダクトイオンスキャン）データも取り込むことができ、次いでこのイオンはコリジョンセルに導かれます。イオンは、電位の印加によって加速され、次いでアルゴンなどの中性ガスと衝突して（図4）、構造フラグメントが生成されます。次に、生じたフラグメントイオンは、最後に分解を行う四重極によってスキャンされ、MS 検出器によってシグナルが生成します。図5に、 $t_R = 2.45$ 分に溶出するメタピリレンピークについて得られたフラグメンテーションスペクトルの例を、MS1で選択された質量 $m/z = 262.23$ を用いて示しています。ここで、 $m/z = 262.23$ のイオンから $m/z = 217.09$ 、133.07、121.08、119 の主要なプロダクトイオンが生じたことがわかります。このデータ取り込みモードを使用することで、特定のフラグメンテーションデータが得られ、真正標準試料と比較することで特定の化合物のアイデンティティを確認することができます。

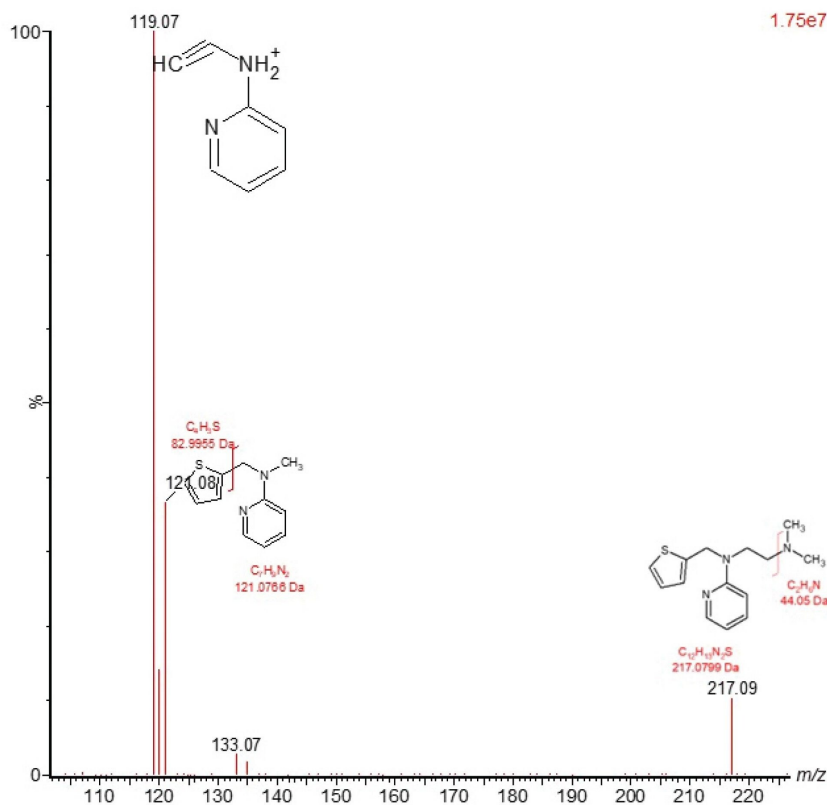


図 5. 保持時間 $t_R = 2.45$ 分で溶出する濃度 100 ng/mL のメタピリレン真正標準試料のプロダクトイオン ($m/z = 262.23$) の MS/MS 分析

SIR および MRM

タンデム（またはトリプル）四重極質量分析計は主に、SIR モードまたは MRM モードで動作させる定量分析に使用されます。これはこれらのモードの選択性および特異性によるものであり、これらによって優れた感度が得られます。これらの分析モードでは、単一のイオンまたは一部の少数のイオンのみが質量分析計を通過して検出器に到達し、分析されます。選択イオンレコーディング（SIR）モードでは、すべてのイオンが最初に分解を行う四重極およびコリジョンセルを通過し、次に単一のイオンまたは一部の少数のインタクト（つまり、フラグメント化されていない）イオンが最後に分解を行う四重極で選択され、検出器で測定されます（図 6A）。MRM モードでは、最初に分解を行う四重極で単一イオンが選択され、このイオンがコリジョンセルに導かれてフラグメンテーションされ、最後の四重極で特定のプロダクトイオンが選択されて検出器で測定されます（図 6B）。ポジティブイオンおよびネガティブイオンの MRM データまたは SIR データの収集を、同じ取り込みで行うことができます。マルチプルリアクションモニタリング（MRM）分析は、そのプリカーサーからフラグメントへの反応のモニタリングの特異性のため、食品や生体液などの複雑な混合物中の極めて低レベルのターゲット分析種を測定する必要がある環境科学や薬物代謝の試験で最も一般的に使用されて

いる分析モードです。高速 RPLC グラジエントを使用して、濃度 1 ng/mL のラット血漿中のメタピリレンを測定した MRM 分析の例を図 7 に示します。このデータにより、保持時間 $t_R = 1.69$ 分に、1 ng/mL のサンプルを容易に検出できる性能があり、ブランクの血漿サンプルでは同じ保持時間に薬物が存在しないことがわかります。

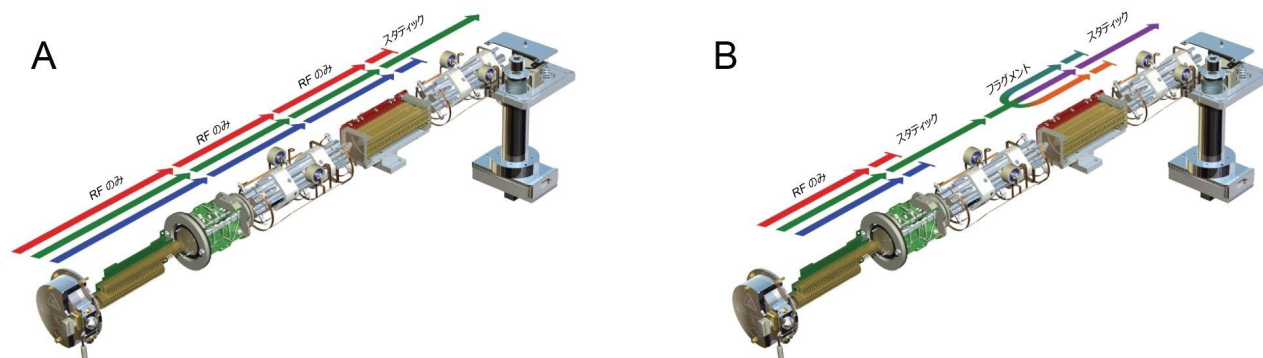


図 6. シングライオンレコーディング (SIR) (A) およびマルチプルリアクションモニタリング (MRM) (B)

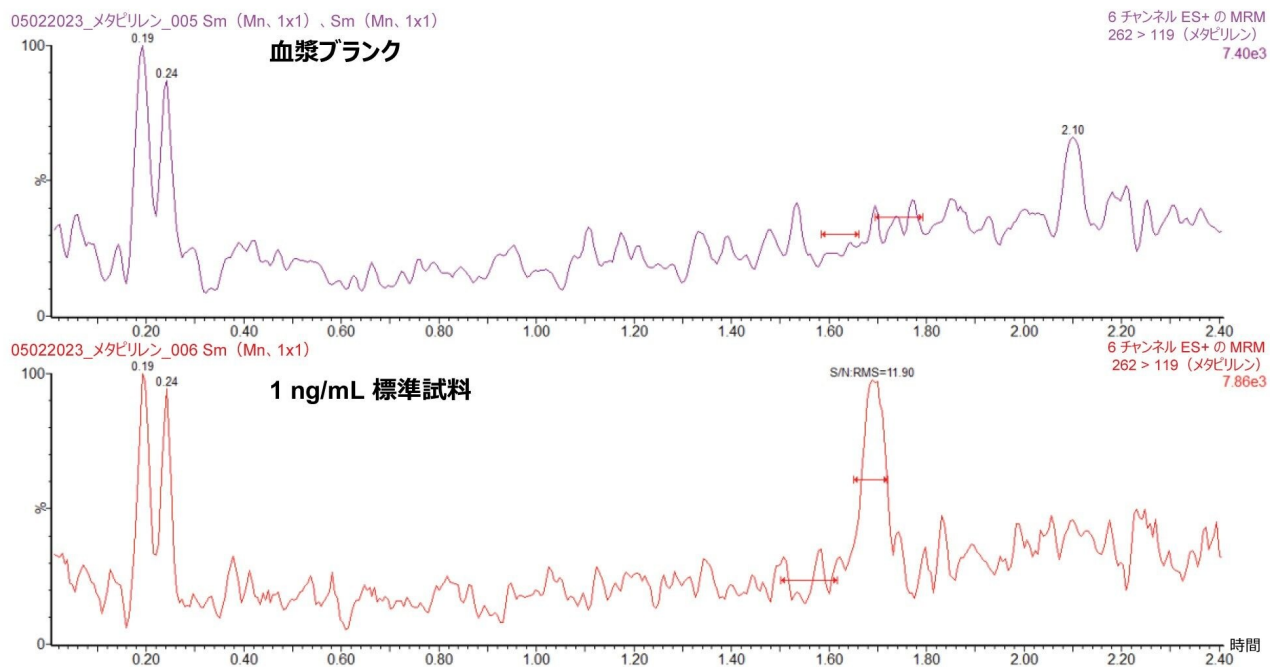


図7. ポジティブイオン化モードのUHPLC-MS/MS MRM モニタリング (262 ~ 119) を使用した、メタピレン濃度 1 ng/mL およびブランクの抽出ラット血漿から得た除タンパク済みラット血漿中のメタピレンの分析

プリカーサーイオンスキャン

プリカーサーイオンスキャンにより、共通の (事前に定義された) フラグメントイオンが生じるサンプル中の特定のプリカーサー質量をすべて同定することができます。プリカーサーイオンスキャンでは、スキャン、フラグメンテーション、および選択イオンレコーディングの組み合わせを利用します。この分析モードでは、最初に分解を行う四重極は、特定の質量範囲をスキャンするように設定されています。イオンは、Q1 を出るとコリジョンセルに導かれ、そこで単一のコリジョンエネルギーまたはコリジョンエネルギーランプを使用してフラグメント化されます。コリジョンセルを出たフラグメントイオンは、スタティックモードで動作する最後に分解を行う四重極 (Q3) によってフィルタリングされ、特定の (事前に定義された) 質量電荷比のイオンのみが通過します (図 8)。イオン固有の m/z 値のフラグメントを含む分析種のみが検出されます。得られた結果により、Q3 で選択された診断フラグメントイオンが生成したプリカーサーイオンを視覚化することができます。

プリカーサーイオンスキャンは、薬物代謝試験において、胆汁、尿、血漿、便などの複雑なマトリックス中の、薬物に関連する生体内反応を特定するために使用します。図 9 に示すデータは、メタピレン 150 mg/Kg の経口投与の 24 時

間後のラットの尿の分析です。サンプルは、ポジティブイオンモードでフラグメントイオン $m/z=96.88$ のプリカーサーイオンスキャンを使用して分析しました。得られたクロマトグラム（図9左）から、プロダクトイオン $m/z=96.88$ で生成したプリカーサーイオンのピークがすべて検出されたことがわかります。図9右のMS2スペクトルは、保持時間 $t_R=3.04$ 分に溶出するピークから抽出したものです。この分析種からは、ベースピーク $m/z=294.25$ が生じるとともに、イオン源内でフラグメントイオン $m/z=233.22$ が生じます。これはメチルピリレンから一般的に生じるフラグメントイオンであり、決定されたプリカーサーイオンの m/z 294.25は、親薬物の質量から +32 Da 質量シフトしています。このことは、このピークが薬物に関連しており、おそらくメタピリレンのジヒドロキシル代謝物であることを示しています。図3に示したMSスペクトルおよびメタピリレンの代謝経路を調べた以前の論文に基づくと、この代謝物はメタピリレンのジヒドロキシル代謝物である可能性が高いと考えられます。 $m/z=233.22$ のイオンから、ヒドロキシル化の位置の1つはピリジン-チオール環フラグメントで、他方のヒドロキシル化の位置は第3級アミン基であることが示唆されます⁸。

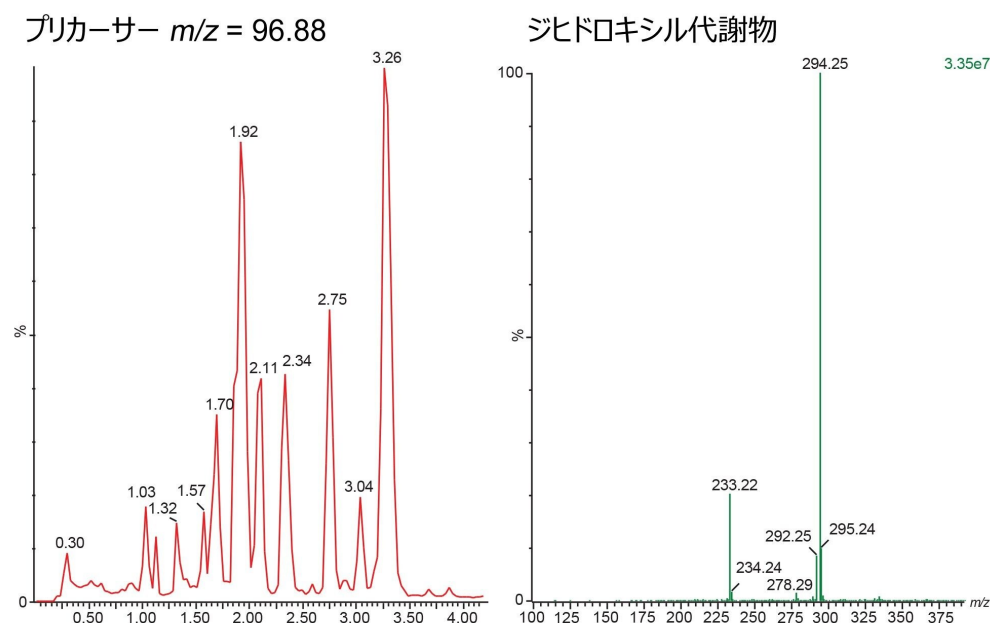


図9. 150 mg/Kg のメタピリレンを経口投与した後のラット尿（投与後 24 時間）の、 $m/z=97.88$ のプリカーサーイオンスキャンを使用したポジティブイオン LC-MS/MS 分析。右の抽出イオンクロマトグラムは、 $t_R=3.04$ 分で溶出するピークの MS スペクトルを示します。

コンスタントニュートラルロス

コンスタントニュートラルロス取り込みでは、最初に分解を行う四重極と最後に分解を行う四重極の同時スキャンを使用して、事前に設定したエネルギー、またはコリジョンエネルギーランプにより、コリジョンセル内のイオンをフラグ

メンテーションします。Q1 および Q3 の 2 つの四重極は、両者の間の固定質量差を保持しつつスキャンするように設定されています（図 10）。この取り込みモードを使用して、硫酸基やリン酸基などの共通の構造的特徴を有する分析種をスクリーニングすることができます。

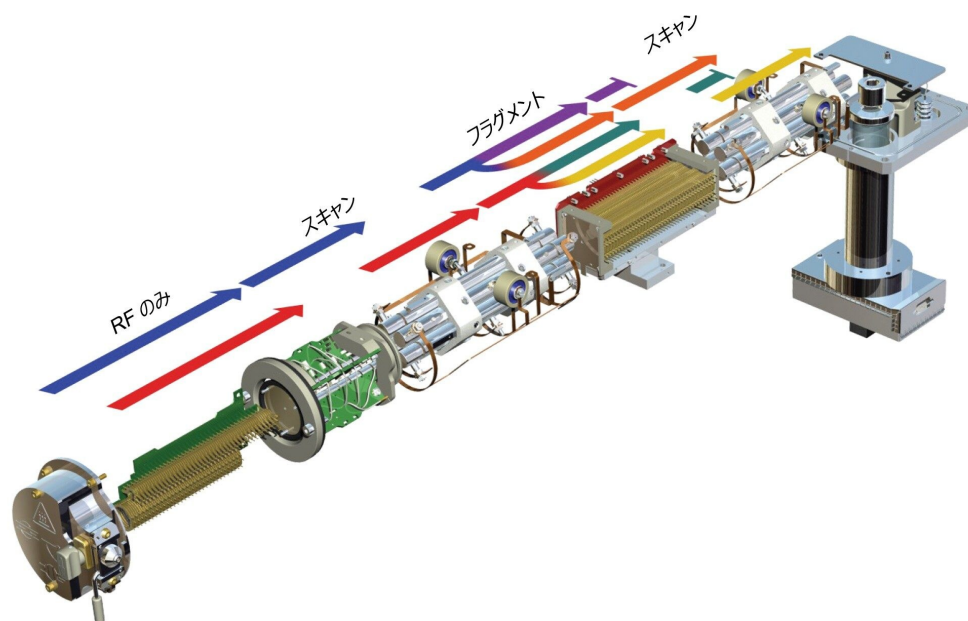


図 10. コンスタントニュートラルロス取り込みモード

コンスタントニュートラルロス取り込みモードの分析は、硫酸塩、グルクロニドなどの薬物複合体やグルタチオンなどの毒性を示す可能性がある代謝物のスクリーニングにおいて、代謝研究に幅広く用いられています。グルクロン酸化および硫酸化の 2 つは、ほ乳類の薬物代謝において最も一般的な結合経路であり、ポジティブイオン化モード MS における 176.12 Da のニュートラルロスが、グルクロン酸部分の喪失の特徴となります。メタピリレンの経口投与（150 mg/Kg、6 日目）後に、176.12 Da のコンスタントニュートラルロスのデータを使用してラット尿を分析して得られたポジティブイオン ESI LC-MS/MS クロマトグラムを図 11 に示します。このデータから分かるように、ニュートラルロス 176.12 Da を使用すると複数のピークが検出され、そのほとんどが内因性代謝物のグルクロニド抱合体です。

以前の論文で、 $m/z = 454.20$ のシグナルを使用して、O-グルクロン酸化がメタピリレンの主要な排出経路であることが報告されていました。図 12A に示す抽出イオンクロマトグラムは、プリカーサー質量が $m/z = 454.20$ で、176.12 Da のニュートラルロスを示すクロマトグラフィーピークが 3 つ存在することを示しています。図 12B に示す $t_R = 1.91$ 分で溶出したピークから得られたスペクトルは、 $m/z = 454.2$ にピークが 1 つあり、 $m/z = 409.20$ 、 313.20 、 310.20 、

245.20 にそれぞれピークがあることを示しています。

結論

DMPK では、in vitro サンプルおよび生体液中の候補医薬品の定量、並びにその代謝物の検出、特性解析、そして多くの場合定量を行います。薬物開発の探索段階において、これには迅速な分析法開発、定量的バイオアナリシス、代謝物スクリーニングが必要です。開発段階では、前臨床試験としてのヒト初回投与試験をサポートするために、バリデーション済みの高感度アッセイが必要です。Xevo TQ-XS タンデム（トリプル）四重極質量分析計は、非常に柔軟で高感度の装置であり、MRM データ取り込みを用いる定量分析用の高感度のプラットフォームになります。また、ニュートラルロス、プリカーサーイオンスキャン、プロダクトイオンスキャンなどのさまざまな取り込みモードも使用できるため、薬物関連代謝物や毒性を示す可能性のある代謝物についてサンプルをプロファイリングすることができます。今回、フルスキャン MS および MS/MS を使用することにより、メタピリレンのフラグメンテーションパターンを理解できることが実証されました。また、MRM データ取り込みを使用して血漿および尿中の薬物の高感度定量、プリカーサーイオンスキャン、コンスタントニュートラルロス取り込みが容易になり、尿中の薬物関連代謝物をモニターできることが実証されました。得られたデータにより、探索 DMPK 試験およびコアラボ業務における Waters Xevo TQ-XS の感度、柔軟性、使いやすさが実証されました。

参考文献

1. C Sack, M Smoker, N Chamkasem, R Thompson, G Satterfield, C Masse, G Mercer, B Neuhaus, I Cassias, E Chang, Y Lin, S Macmahon, J Wong, K Zhang, RE Smith. Collaborative Validation of the QuEChERS Procedure for the Determination of Pesticides in Food by LC-MS/MS. *J Agric Food Chem.* 2011 22;59(12):6383–411. doi: 10.1021/jf201618q.
2. M Jemal. High-throughput quantitative bioanalysis by LC-MS/MS. *Biomed.* 2000 14(6):422–9. doi: 10.1002/1099-0801.
3. RN Xu, L Fan, MJ Rieser, TA El-Shourbagy. Recent Advances in High-Throughput Quantitative Bioanalysis by LC-MS/MS. *J Pharm Biomed Anal.* 2007 28;44(2):342–55. doi: 10.1016.
4. S Krishnaswami, H Möllmann, H Derendorf, G Hochhaus. A Sensitive LC-MS/MS Method for the Quantification of Fluticasone Propionate in Human Plasma. *J Pharm Biomed Anal.* 2000;22(1):123-9. doi: 10.1016/s0731-7085.

5. BJ Molloy, A King, LG Mullin, LA Gethings, R Riley, RS Plumb, ID Wilson. Rapid Determination of the Pharmacokinetics and Metabolic Fate of Gefitinib in the Mouse Using a Combination of UPLC-MS/MS, UPLC-QToF/MS, and ion mobility (IM)-enabled UPLC-QToF/MS. *Xenobiotica*. 2021;51(4):434–446. doi: 10.1080/00498254.2020.
6. IA Blair. Analysis of Endogenous Glutathione-Adducts and Their Metabolites. *Biomed Chromatogr*. 2010;24(1):29–38. doi: 10.1002/bmc.1374.
7. Graichen ME, Neptun DA, Dent JG, Popp JA, and Leonard TB (1985) Effects of Methapyrilene on Rat Hepatic Xenobiotic Metabolizing Enzymes and Liver Morphology. *Fundam Appl Toxicol* 5:165–174.
8. Geenen S, Guallar-Hoyas C, Michopoulos F, Kenna JG, Kolaja KL, Westerhoff HV, Thomas P, Wilson ID. HPLC-MS/MS Methods for the Quantitative Analysis of 5-oxoproline (pyroglutamate) in Rat Plasma and Hepatic Cell Line Culture Medium. *J Pharm Biomed Anal*. 2011 1;56(3):655–663. doi: 10.1016/j.jpba.2011.06.001.

ソリューション提供製品

ACQUITY UPLC I-Class PLUS システム <<https://www.waters.com/134613317>>

Xevo TQ-XS タンデム四重極質量分析計 <<https://www.waters.com/134889751>>

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

720008016JA、2023 年 9 月



© 2024 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[利用規約](#) [プライバシー](#) [商標](#) [キャリア](#) [クッキー](#) [クッキー環境設定](#)