

研究用試薬

YK131 Mouse/Rat CRF-HS ELISA

取 扱 説 明 書

FOR RESEARCH LABORATORY USE ONLY

株式会社 矢内原研究所

〒418-0011 静岡県富士宮市栗倉 2480-1

FAX: 0544-22-2770 TEL: 0544-22-2771

Website: www.yanaihara.co.jp E-mail: ask@yanaihara.co.jp

目 次

I. はじめに	2~3
II. 特 徴	3
III. キットの構成	4
IV. 操作法	5~7
V. 操作上の注意	7~8
VI. 基本性能	8~13
VII. 貯蔵法および有効期間	13
VIII. 文献	14~15

YK131 Mouse / Rat CRF-HS ELISA キット

I. はじめに

Corticotropin Releasing Factor (副腎皮質刺激ホルモン放出因子、CRF) は 1981 年 Vale らによりヒツジの視床下部から単離、構造決定された神経ペプチドであり¹⁾、Corticotropin Releasing Hormone (CRH) とも呼ばれています。ヒト CRF²⁾とラット CRF³⁾は同一アミノ酸配列で、いずれも 41 アミノ酸残基 (MW. 4758) からなり、C 末端はアミド構造になっています。また、マウス CRF⁴⁾もヒト CRF、ラット CRF と同一アミノ酸配列であることが認められています。CRF ファミリーに属するマウス/ラット Urocortin 1 とはアミノ酸配列で 45% の類似性が認められ⁵⁾また、ヒト Urocortin 1 のアミノ酸配列とは 42.5% の類似性が認められています⁶⁾。CRF は脳下垂体前葉において ACTH 合成および分泌を促進する視床下部-下垂体-副腎系(HPA) の主要な因子の一つです。CRF はまた、中枢神経系および下垂体を介し、ストレスに対する反応に関与しているとも考えられています⁷⁾。

CRF のヒトでの主な産生部位は視床下部のほかには脊髄、胃、膵、十二指腸、副腎髄質、胎盤などであり、ラットでは視床下部以外に小脳、嗅覚球など脳内各部位および視網膜、聴覚系に分布することが知られています。マウスでは最も濃度の高い視床下部、正中隆起以外、扁桃核、前頭葉、脳橋、小脳での免疫活性も報告されています⁸⁾。いずれも脳以外に広く分布しているため、血中 CRF がそのまま視床下部-下垂体-副腎系(HPA)の機能を反映するかどうかの議論はいまだ結論に至っていません。矢内原らは血中 CRF を腫瘍のマーカーとして利用することができる可能性を指摘しました⁹⁾。近年、CRF とストレスおよびアルツハイマー病 (AD) の関連が注目され、うつ病¹⁰⁾、不安神経症¹¹⁾、¹²⁾などで脳脊髄液 (CSF) 中 CRF の濃度が変化することが指摘されています。急性あるいは慢性ストレス負荷により作製したモデルラットの脳各部位の CRF を測定し、CRF にはストレスに対する調節作用のあることが示されました⁷⁾。AD との関連についても、AD 患者の CSF 中の CRF 免疫活性は健常人より著しく低いという報告があり¹³⁾、Davis らは重度老年性の痴呆患者 (Dementia) の CSF 中 CRF の低下を指摘し、CRF は神経化学物質マーカーとして早期の Dementia および AD 患者の診断に有用であることを示唆しました¹⁴⁾。また、血中や組織中では CRF は通常 binding protein (BP) と結合した形で存在するが、Behan らは AD 患者の脳組織中の CRF が著しく低下することを明らかにし、ヒト脳中の CRF が BP との結合により CRF 受容体結合能を失うこととし、人の脳中遊離 CRF 量は、CRF-BP 結合によって決定されることを示しました¹⁵⁾。こうした結果から脳内遊離 CRF を増加させることにより AD の治療に繋がる可能性があるかと指摘しました¹⁶⁾。一方、培養神経細胞では CRF の添加によりアミロイド-β ペプチドによる細胞死が抑制されたことから、CRF は脳内ニューロンに対し保護作用があると報告されています¹⁷⁾。

こうした研究成果より、矢内原研究所では脳組織の CRF 測定は、その中枢作用の解析、ストレス応答反応、および AD の研究に必須のものであると考え、CRF 測定法について検討を重ねた結果、マウス、ラットの血漿および脳組織の抽出液を直接測定できる CRF-HS ELISA キットを新しく開発いたしました。

YK131 Mouse / Rat CRF-HS ELISA キット

- ▼ マウスおよびラット CRF 測定用です。
- ▼ 0.078~2.5 ng/mL の範囲で測定できます。
- ▼ 41 検体を duplicate で測定できます。
- ▼ 測定は約 7.5 時間で終了します。
- ▼ 血漿および脳組織抽出物の測定ができます。
- ▼ 検体量は 50 μ L です。
- ▼ プレートは 1 列 (8 ウェル) 毎に取り外しできますのでキットの分割使用が可能です。

内容

- 1) 測定プレート
- 2) 標準品
- 3) 標識特異抗体液
- 4) SA-HRP 溶液
- 5) 酵素基質液
- 6) 酵素反応停止液
- 7) 緩衝液
- 8) 濃縮洗浄液
- 9) プレート密閉用シール

保存と安定性 2~8°C で保存してください。
製造日より 24 ヶ月間は安定です。

II. 特 徴

本キットはマウス並びにラットの血漿および脳組織抽出物中に含まれる CRF 濃度を前処理なしに直接、定量的に測定するためのものです。本キットによる CRF の測定は簡便でしかも特異性、定量性に優れ、共存する他の生理活性物質や体液成分の影響を受けにくいなど多くの利点を備えています。なお、添付の標準品 CRF(1-41) は矢内原研究所において作製した高純度の合成品 (純度 98%以上) であり、表示の重量は絶対量を示しております。

<特異性>

本キットは CRF に特異的であり、ウロコルチン 1 (マウス、ラット) およびウロコルチン 1 (ヒト) に対する交差反応性をほとんど認めません。なお、他の交差反応性の詳細については 13 ページに記載しています。

<測定原理>

本キットによる CRF の測定はサンドイッチ法に基づいて行います。測定プレート (96 ウェル) の各ウェルにはウサギ抗マウス/ラット CRF 抗体が固定化されています。この各ウェルに標準液または検体を入れ、抗原抗体複合体を形成させ、さらにビオチン化ウサギ抗マウス/ラット CRF 抗体と反応させ、サンドイッチ複合体を形成させます。その複合体に HRP 結合ストレプトアビジンを反応させます。最後にこの複合体中の HRP 活性を測定することにより、検体中の CRF 濃度を求めることができます。

Ⅲ. キットの構成

試薬・器具	形状	規格		内容物
1.測定プレート		96 ウェル1 枚 プレート		ウサギ抗マウス/ラット CRF 抗体固定化プレート
2.標準品	凍結乾燥品	2.5 ng	1 本	マウス/ラット CRF(1-41)
3.標識特異抗体液	液状	12 mL	1 本	ビオチン化ウサギ抗マウス/ラット CRF 抗体
4.SA-HRP 溶液	液状	12 mL	1 本	安定剤を含むトリス塩酸緩衝液に溶解した HRP 結合 streptavidin
5.酵素基質液	液状	12 mL	1 本	3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(TMB)
6.酵素反応停止液	液状	12 mL	1 本	1M 硫酸溶液
7.緩衝液	液状	20 mL	1 本	反応促進試薬を含む緩衝液
8.濃縮洗浄液	液状	50 mL	1 本	1% Tween 20 を含む濃縮生理食塩液
9.プレート密閉用シール			4 枚	

IV. 操作法

測定を始める前に必ずお読みください。(注意：キットに含まれるすべての試薬は室温に戻してから測定を始めてください。)

<使用器具および装置>

1. マイクロピペットおよびチップ (25 μ L~1mL) ; 8 連または 12 連のマルチチャンネルピペットの使用を薦めます
2. マイクロプレート用吸光度計 (測定波長 450nm で吸光度 2.5 まで測定できる装置)
3. マイクロプレート用振とう機またはシェーカー
4. 標準液の調製に使用するガラス試験管
5. マイクロプレート洗浄装置、用手法の場合は連続分注器、ニードルディスペンサー、アスピレーターまたは真空ポンプの使用を薦めます
6. メスシリンダー (1000 mL)
7. 蒸留水または脱イオン水

<マウス、ラット脳組織の抽出>

材料：マウス脳組織、ラット脳組織

抽出液：0.2% Nonidet P-40 含有 PBS (10mM、pH7.2)

1. 摘出したマウスあるいはラット脳組織をプラスチック製の試験管に入れ、秤量する。
2. 30 倍量の抽出液を加え、ホモジナイズした後、冷却遠心機で遠心 (18360 x g、4 $^{\circ}$ C、20 分) する。
3. 遠心後、上清を採取し直ちに測定する。直ちに測定できない場合は-30 $^{\circ}$ C以下で保存し、測定時に融解し、室温に戻してから測定する。不溶物が生じた場合は冷却遠心機で遠心 (1750 x g、4 $^{\circ}$ C、15 分) し除去する。

※VI. 基本性能<希釈試験>で示したように、希釈試験を行い直線性が得られる範囲の測定値を採用してください。

<マウス、ラット血漿の採取>

血漿の採取のための採血には EDTA-2Na (1 mg/mL) 添加採血管を用いる。血漿採取後、直ちに測定できない場合は小分けして-30 $^{\circ}$ C以下で凍結保存する。

※血漿の凍結融解の繰り返しは行わないようにしてください。

<試薬の調製>

1. 標準液の調製法:標準品の容器に緩衝液 1 mL を加え内容物を溶解させ、2.5 ng/mL の標準液を調製する。この標準液 0.2 mL をとり、これを緩衝液 0.2 mL で希釈し 1.25 ng/mL の標準液を調製する。以下同様の希釈操作を繰り返し、0.625、0.313、0.156、0.078 ng/mL の各標準液を調製する。0 ng/mL の標準液は緩衝液をそのまま使用する。
※<測定範囲>有効測定範囲 0.078 ng/mL～2.5 ng/mL
0.078 ng/mL を下回るような低値の検体が予想される場合、検出限度としてさらに 0.078 ng/mL の標準液を 2 倍希釈し、0.039 ng/mL の標準液を設けることができます。この場合、0.039 ng/mL～0.078 ng/mL の範囲の測定値の精度は上記有効測定範囲ほど高くはありませんので、概算値として使用してください。
2. 洗浄液の調製法:濃縮洗浄液 50 mL (全量) を蒸留水 950 mL にて希釈し使用する。
3. その他の試薬はそのまま<測定操作>に従って使用する。

<測定操作>

1. キット内容を室温 (20～30℃) に戻す。
標準液および洗浄液を上記の試薬調製法に従って調製する。
2. 各ウエルに、洗浄液 350 μ L を満たした後、アスピレーターにより吸引するか、あるいはプレートを反転し液を捨てたあと、紙タオルなどに軽くたたきつけるようにして液を除く。この操作をさらに 2 回繰り返し、合計 3 回の洗浄操作を行う。
3. 各ウエルに緩衝液 50 μ L を入れ、ついで標準液または検体 50 μ L を加える。
4. 測定プレートをプレート密閉用シールでシールし、室温で 4 時間振とうする (約 100 rpm)。
5. 各ウエル中の液を除き、2. と同様の洗浄操作を合計 4 回行う。
6. 各ウエルに標識特異抗体液 100 μ L を加える。
7. 測定プレートをプレート密閉用シールでシールし、室温で 2 時間振とうする (約 100 rpm)。
8. 各ウエル中の液を除き、2. と同様の洗浄操作を合計 4 回行う。
9. 各ウエルに SA-HRP 溶液 100 μ L を加える。
10. 測定プレートをプレート密閉用シールでシールし、室温で 1 時間振とうする (約 100 rpm)。
11. 必要量の酵素基質液を使用する約 1 時間前に分取し、遮光しながら室温に戻す。
12. 各ウエル中の液を除き、2. と同様の洗浄操作を合計 4 回行う。
13. 各ウエルに酵素基質液 100 μ L を加え、遮光の状態で室温で静置し 30 分間反応させる。
14. 各ウエルに酵素反応停止液 100 μ L を加える。

15. マイクロプレート用吸光度計にて 450 nm の吸光度を測定する。
16. 市販のソフトウェアを用いて、4 (or 5) -Parameter、もしくは Log-Logit の回帰式を使用し、CRF 標準液の各濃度の測定値から標準曲線を作成し、検体の CRF 濃度を求める。片対数方眼紙を用いる場合は、横軸 (Log 側) に標準液の濃度を、縦軸 (Linear 側) に標準液各濃度の吸光度をプロットし、標準曲線を作成し、検体の吸光度を標準曲線に当てはめ、CRF の濃度を読み取る。

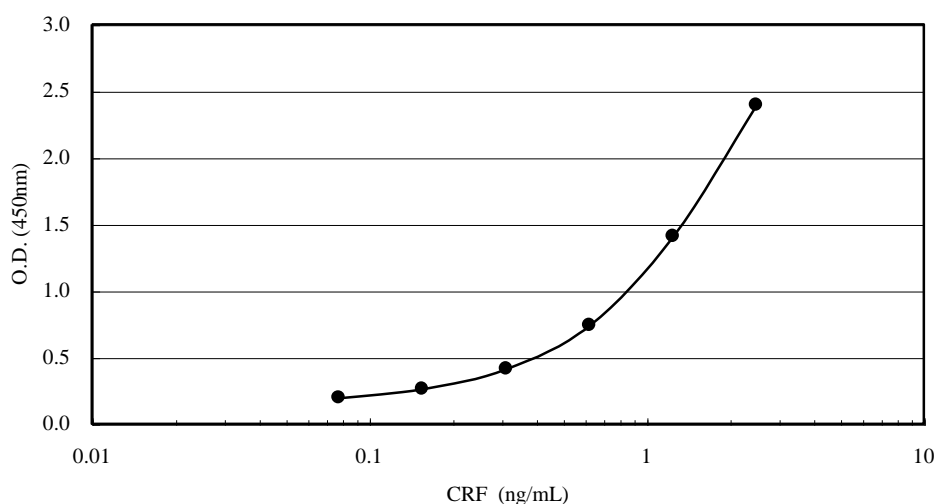
V. 操作上の注意

1. 組織抽出液は適宜小分けして -30°C 以下で凍結保存してください。検体の凍結融解を繰り返さないようにしてください。測定時、室温に戻してから測定してください。不溶物のある場合、冷却遠心機で遠心 ($1750 \times g$, 4°C , 15 分) し除去してください。
2. 血液検体は採取後、血漿を分離し、直ちに測定してください。直ちに測定できない場合は血漿を適宜小分けして、 -30°C 以下で凍結保存してください。検体の凍結融解を繰り返さないようにしてください。血液は EDTA-2Na (1mg/mL) 添加採血管で採取してください。
3. 試薬は用時調製を原則としてください。特に、標準品は調製後、直ちに使用してください。なお、キットを分割使用する場合、調製後の標準品は適宜小分けして、 -30°C 以下で凍結保存してください (約 1 ヶ月は安定です)。
4. 濃縮洗浄液は保存中に沈殿を生じることがありますが、この沈殿は希釈調製時に溶解します。
5. 各ウェルへの分注操作は測定精度に影響を与えますので正確に行ってください。また検体をウェルに注入する場合は、検体ごとに新しいチップを用い、検体相互間の汚染がないように注意してください。標準液を希釈するときは、希釈段階ごとに必ず新しいチップを使ってください。
6. 2.5 ng/mL を超える高値検体の場合は、検体を本キット添付の緩衝液にて希釈して測定してください。
7. 室温での反応には必ずマイクロプレート用振とう機を用い、測定プレートを振とうしてください (呈色反応の場合を除く)。なお振とうはプレート密閉用シールに反応液がはねないようにゆっくりと行ってください (約 100 rpm)。
8. 測定はすべて 2 重測定で行ってください。
9. 酵素-基質反応停止後は、すみやかに吸光度の測定を行ってください。
10. 酵素基質の発色レベルは反応温度、時間、測定プレートの振とうの程度などでわずかですが影響を受けることがありますので、標準曲線は必ず測定ごとに作成してください。
11. 各試薬の保存中もしくは使用中には、これらに強い光が当たらないように注意してください。

12. 本法による測定には、異なるロットのキットを組み合わせて使用しないでください。
13. 酵素基質液は遮光しながら室温に戻し、使用してください。
14. 一部の試薬には、ヒトの血清を使用していますので取り扱いに注意してください
(HBsAG, HIV 1/2, HCV, HIV-1 AG または HIV-1 NAT, ALT および Syphilis は陰性です)。

VI. 基本性能

<標準曲線の一例>



<添加回収試験>

<マウス血漿 A>

Added CRF (ng/ml)	Observed (ng/ml)	Expected (ng/ml)	Recovery (%)
0.0	0.06		
0.1	0.15	0.16	93.75
0.3	0.26	0.36	72.22
1.0	0.70	1.06	66.04

<マウス血漿 B>

Added CRF (ng/ml)	Observed (ng/ml)	Expected (ng/ml)	Recovery (%)
0.0	0.02		
0.1	0.11	0.12	91.67
0.3	0.26	0.32	81.25
1.0	0.64	1.02	62.75

<マウス血漿C>

Added CRF (ng/ml)	Observed (ng/ml)	Expected (ng/ml)	Recovery (%)
0.0	0.04		
0.1	0.17	0.14	121.43
0.3	0.31	0.34	91.18
1.0	0.66	1.04	63.46

<マウス血漿D>

Added CRF (ng/ml)	Observed (ng/ml)	Expected (ng/ml)	Recovery (%)
0.0	0.06		
0.1	0.17	0.16	106.25
0.3	0.30	0.36	83.33
1.0	0.71	1.06	66.98

<ラット血漿A>

Added CRF (ng/ml)	Observed (ng/ml)	Expected (ng/ml)	Recovery (%)
0.0	0.07		
0.1	0.16	0.17	94.12
0.3	0.30	0.37	81.08
1.0	0.84	1.07	78.50

<ラット血漿B>

Added CRF (ng/ml)	Observed (ng/ml)	Expected (ng/ml)	Recovery (%)
0.0	0.03		
0.1	0.14	0.13	107.69
0.3	0.35	0.33	106.06
1.0	0.85	1.03	82.52

<ラット血漿C>

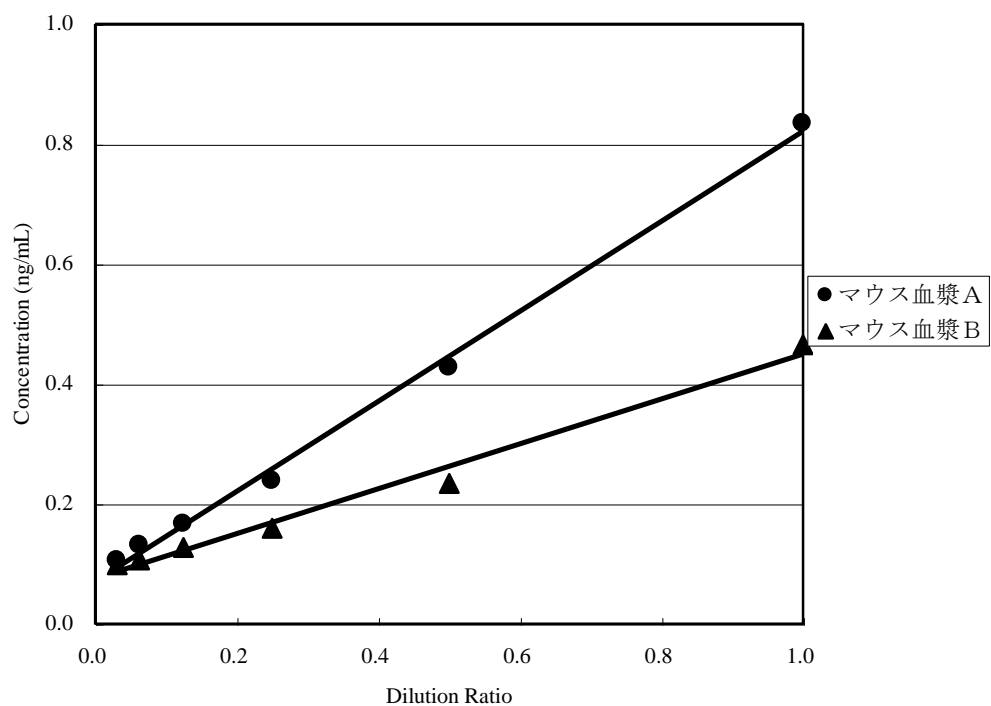
Added CRF (ng/ml)	Observed (ng/ml)	Expected (ng/ml)	Recovery (%)
0.0	0.00		
0.1	0.11	0.10	110.00
0.3	0.23	0.30	76.67
1.0	0.68	1.00	68.00

<ラット血漿D>

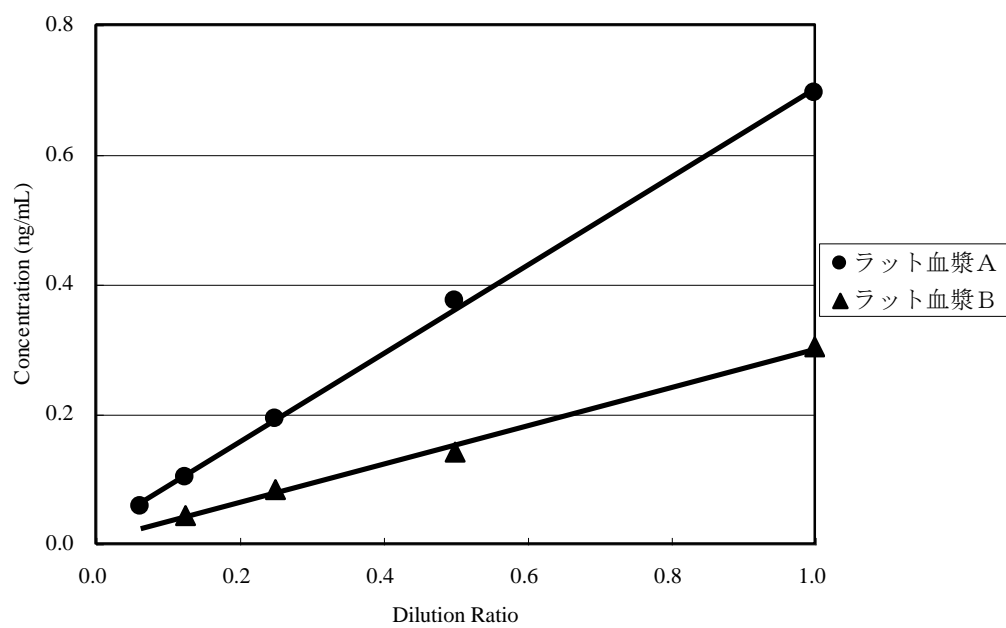
Added CRF (ng/ml)	Observed (ng/ml)	Expected (ng/ml)	Recovery (%)
0.0	0.00		
0.1	0.09	0.10	90.00
0.3	0.21	0.30	70.00
1.0	0.68	1.00	68.00

<希釈試験>

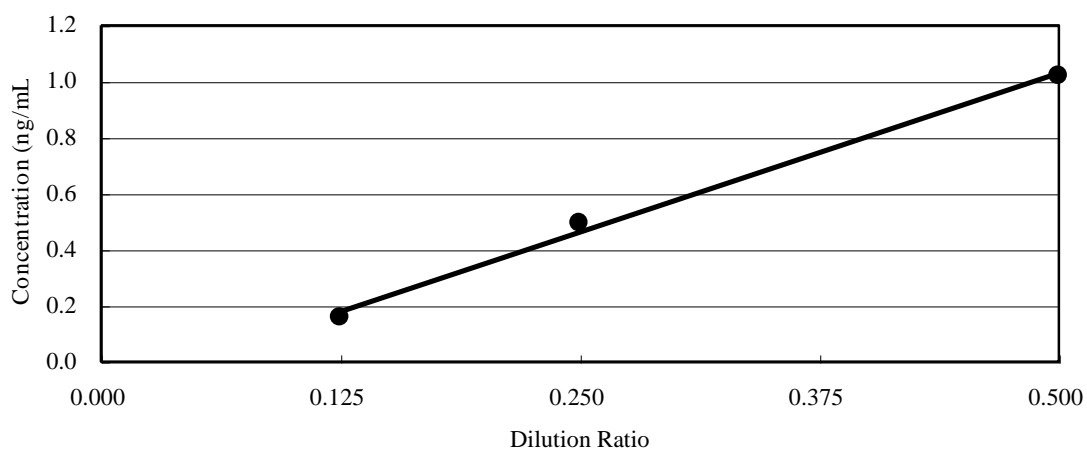
<マウス血漿>



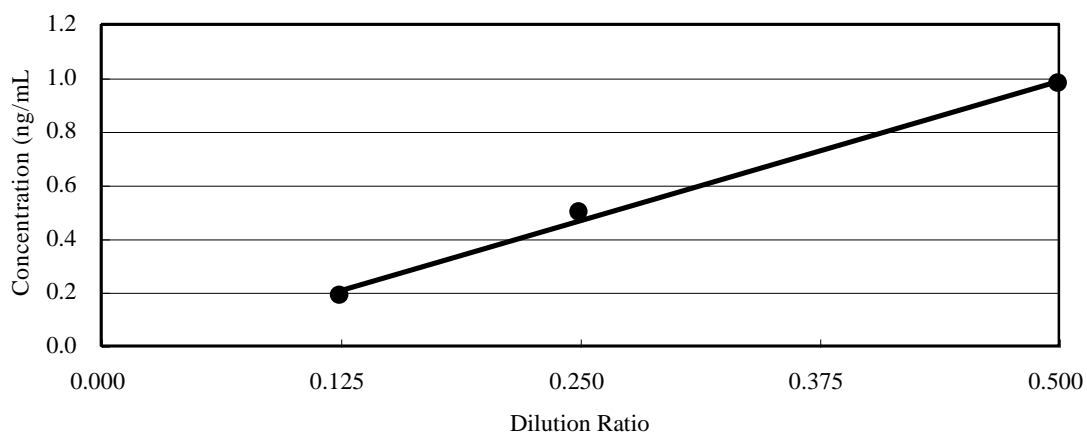
<ラット血漿>



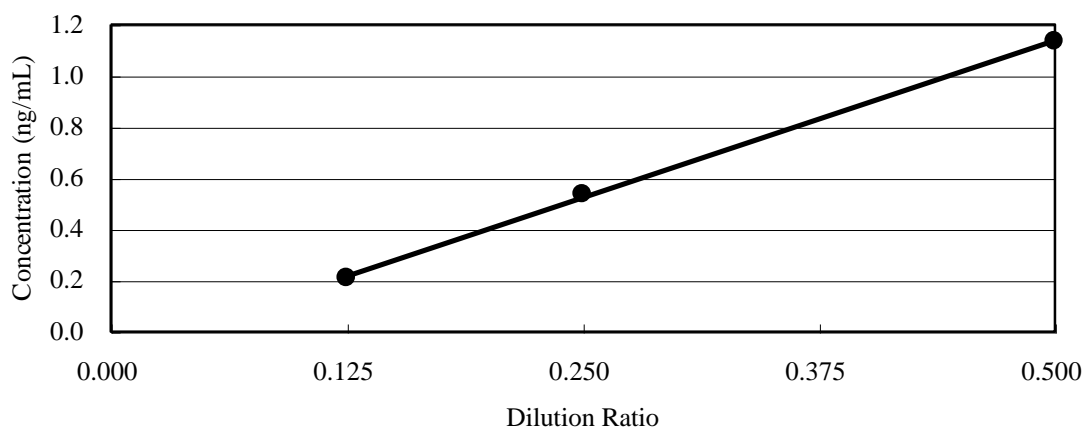
<マウス脳抽出物 A (0.2%NP40 含有 PBS 30 倍量で抽出した場合)>



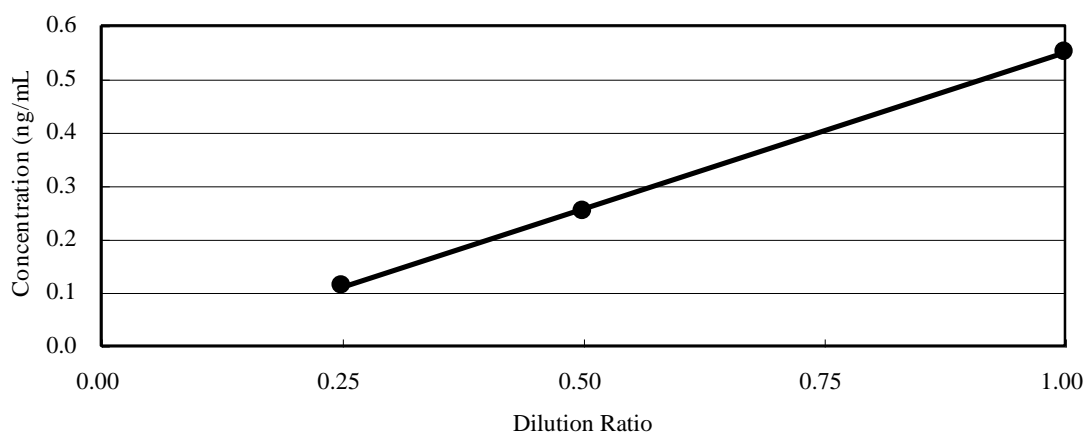
<マウス脳抽出物 B (0.2%NP40 含有 PBS 30 倍量で抽出した場合)>



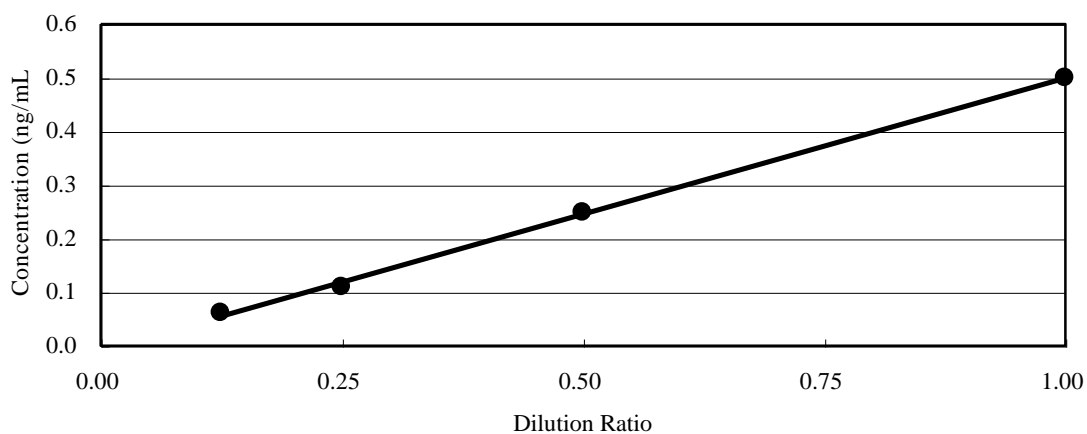
<マウス脳抽出物 C (0.2%NP40 含有 PBS 30 倍量で抽出した場合)>



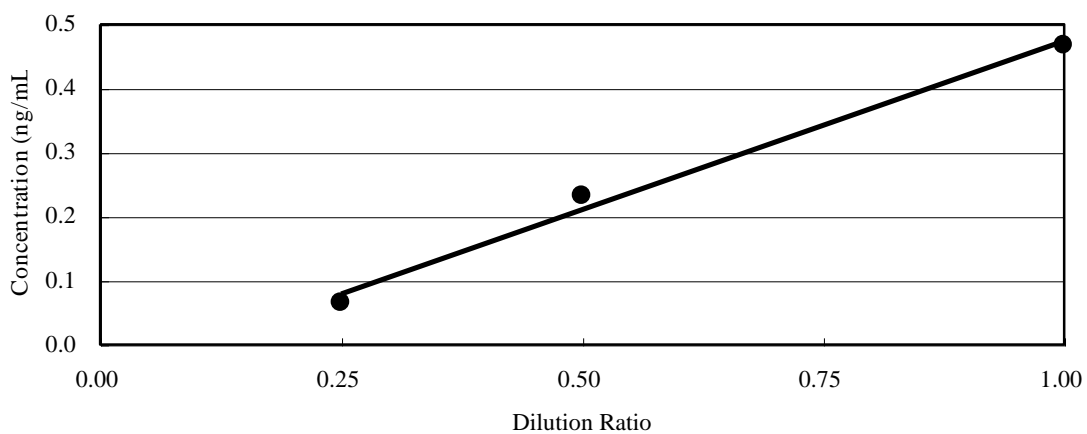
<ラット脳抽出物 A (0.2%NP40 含有 PBS 30 倍量で抽出した場合)>



<ラット脳抽出物 B (0.2%NP40 含有 PBS 30 倍量で抽出した場合)>



<ラット脳抽出物 C (0.2%NP40 含有 PBS 30 倍量で抽出した場合)>



<交差反応性>

関連ペプチド	交差反応性 (%)
CRF(1-41) (Mouse, Rat, Human)	100
CRF(17-41) (Mouse, Rat, Human)	0.1
ACTH (Human)	0.01
ACTH (Mouse, Rat)	0.01
Urocortin 1(Human)	0.01
Urocortin 1(Mouse, Rat)	0.01
Urocortin 2 (Mouse)	0
Urocortin 3 (Mouse, Rat)	0
PACAP27	0
PACAP38	0
VIP (Human, Porcine)	0

<再現性試験>

同時再現性：マウス血漿	CV(%) 2.37~8.96	ラット血漿	CV(%) 3.47~10.53
日差再現性：マウス血漿	CV(%) 3.51~12.70	ラット血漿	CV(%) 2.01~5.19

VII. 貯蔵法および有効期間

<貯法>

遮光し、2~8℃にて保存してください。

<有効期間>

製造日より 24 ヶ月間（使用期限は外箱に表示）

<包装>

1 キット 96 テスト分（標準曲線作成用を含む）

VIII. 文 献

1. Vale W, Spiess J, Rivier C, Rivier J: (1981) Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science*, **213**, 1394-1397.
2. Shibahara S, Morimoto Y, Furutani Y, Notake M, Takahashi H, Shimizu S, Horikawa S, Numa S: (1983) Isolation and sequence analysis of the human corticotropin-releasing factor precursor gene. *EMBO J*, **2**, 775-779.
3. Rivier J, Spiess J, Vale W: (1983) Characterization of rat hypothalamic corticotropin-releasing factor. *Proc Natl Acad Sci USA*, **80**, 4851-4855.
4. Seasholtz AF, Bourbonnais FJ, Harnden CE, and Camper SA: (1991) Nucleotide Sequence and Expression of the Mouse Corticotropin-Releasing Hormone Gene. *Mol. Cell. Neurosci*, **2**, 266-273
5. Vaughan J, Donaldson C, Bittencourt J, Perrin MH, Lewis K, Sutton S, Chan R, Turnbull AV, Lovejoy D, Rivier C, et al: (1995) Urocortin, a mammalian neuropeptide related to fish urotensin I and to corticotropin-releasing factor. *Nature*, **378**, 287-292.
6. Donaldson CJ, Sutton SW, Perrin MH, Corrigan AZ, Lewis KA, Rivier JE, Vaughan JM, Vale WW: (1996) Cloning and characterization of human urocortin. *Endocrinology* **137**:2167-2170
7. Chappell PB, Smith MA, Kilts CD, Bissette G, Ritchie J, Anderson C, Nemeroff CB: (1986) Alterations in corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in discrete rat brain regions after acute and chronic stress. *J Neurosc*, **6**, 2908-2914.
8. Nakane T, Audhya T, Hollander CS, Schlesinger DH, Kardos P, Brown C, Passarelli J: (1986) Corticotrophin-releasing factor in extra-hypothalamic brain of the mouse: demonstration by immunoassay and immunoneutralizaion of bioassayable activity. *J Endocrino*, **111**, 143-149
9. Tsuchihashi T, Yamaguchi K, Abe K, Yanaihara N, Saito S: (1992) Production of immunoreactive corticotropin-releasing hormone in various neuroendocrine tumors. *Jpn J Clin Oncol*, **22**, 232-237.
10. Nemeroff CB, Widerlov E, Bissette G, Walleus H, Karlsson I, Eklund K, Kilts CD, Loosen PT, Vale W: (1984) Elevated concentrations of CSF corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in depressed patients. *Science*, **226**, 1342-1344.
11. Ur E, Grossman A: (1992) Corticotropin-releasing hormone in health and disease: an update. *Acta Endocrinol (Copenh)*, **127**, 193-199. Review.
12. Geraciotti TD Jr, Orth DN, Ekhtator NN, Blumenkopf B, Loosen PT: (1992) Serial cerebrospinal fluid corticotropin-releasing hormone concentrations in healthy and depressed humans. *J Clin Endocrinol Metab*, **74**, 1325-1330.
13. May C, Rapoport SI, Tomai TP, Chrousos GP, Gold PW: (1987) Cerebrospinal fluid concentrations of corticotropin-releasing hormone (CRH) and corticotropin (ACTH) are reduced in patients with Alzheimer's disease. *Neurology*, **37**, 535-538.

14. Davis KL, Mohs RC, Marin DB, Purohit DP, Perl DP, Lantz M, Austin G, Haroutunian V: (1999) Neuropeptide abnormalities in patients with early Alzheimer disease. *Arch Gen Psychiatry*, **56**, 981-987.
15. Behan DP, Khongsaly O, Owens MJ, Chung HD, Nemeroff CB, De Souza EB: (1997) Corticotropin-releasing factor (CRF), CRF-binding protein (CRF-BP), and CRF/CRF-BP complex in Alzheimer's disease and control postmortem human brain. *J Neurochem*, **68**, 2053-2060.
16. Behan DP, Heinrichs SC, Troncoso JC, Liu XJ, Kawas CH, Ling N, De Souza EB: (1995) Displacement of corticotropin releasing factor from its binding protein as a possible treatment for Alzheimer's disease. *Nature*, **378**, 284-287.
17. Pedersen WA, McCullers D, Culmsee C, Haughey NJ, Herman JP, Mattson MP: (2001) Corticotropin-releasing hormone protects neurons against insults relevant to the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurobiol D*, **8**, 492-503.
18. Delawary M, Tezuka T, Kiyama Y, Yokoyama K, Inoue T, Hattori S, Hashimoto R, Umemori H, Manabe T, Yamamoto T, Nakazawa T: (2010) NMDAR2B tyrosine phosphorylation regulates anxiety-like behavior and CRF expression in the amygdala. *Mol Brain*, **3**:37.
19. Ullrich M, Bundschu K, Benz PM, Abesser M, Freudinger R, Fischer T, Ullrich J, Renne T, Walter U, Schuh K: (2011) Identification of SPRED2 (sprouty-related protein with EVH1 domain 2) as a negative regulator of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J Biol Chem*, **286**, 9477-9488.
20. Nemoto T, Sugihara H, Mano A, Kano T, Shibasaki T: (2011) The effects of ghrelin/GHSs on AVP mRNA expression and release in cultured hypothalamic cells in rats. *Peptides*, **32**, 1281-1288.

<お問合せ先>

株式会社 矢内原研究所

〒418-0011 静岡県富士宮市粟倉 2480-1

FAX:0544-22-2770 TEL:0544-22-2771

www.yanaihara.co.jp ask@yanaihara.co.jp

2015年5月14日改訂