



Cytiva Webinar

Biacoreの測定系構築の勘所

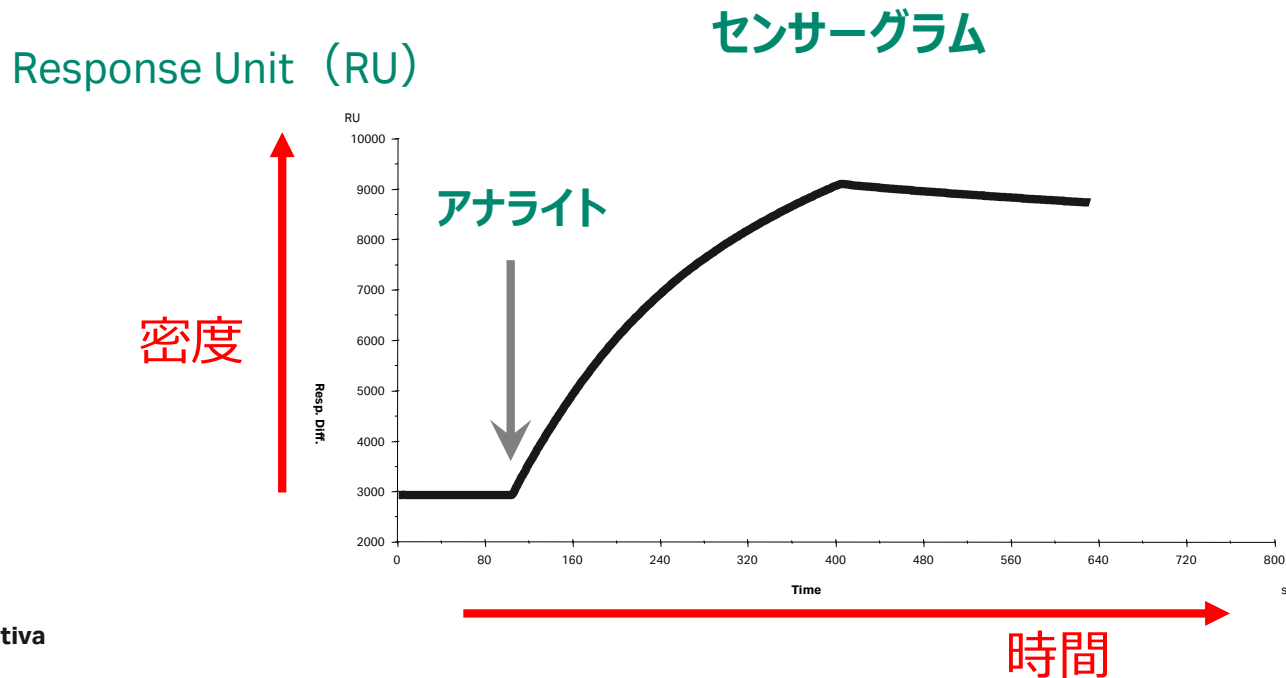
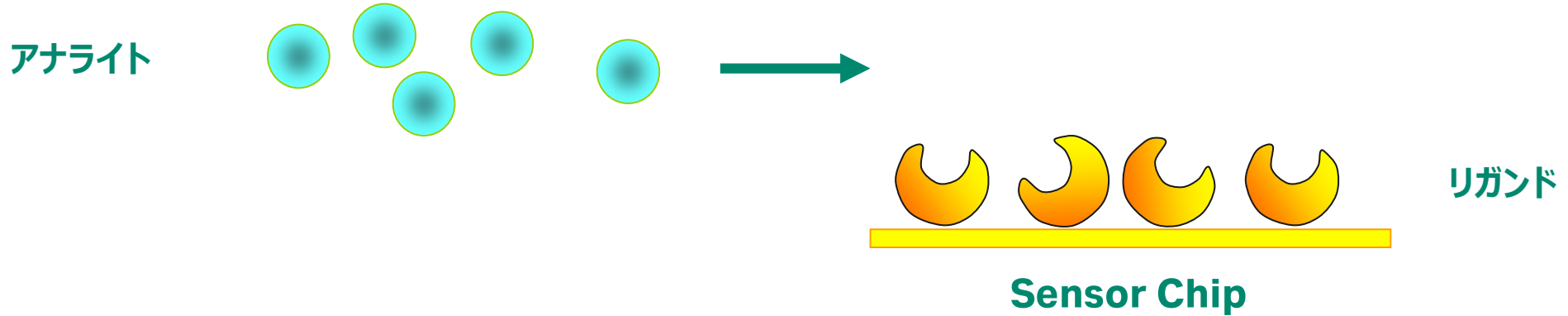
Gen Takata
June 11 2020



本日の内容

- ✓ センサーチップへの固定化
- ✓ Biacore測定ワークフロー
- ✓ センサーグラムの解析

Biacoreとは



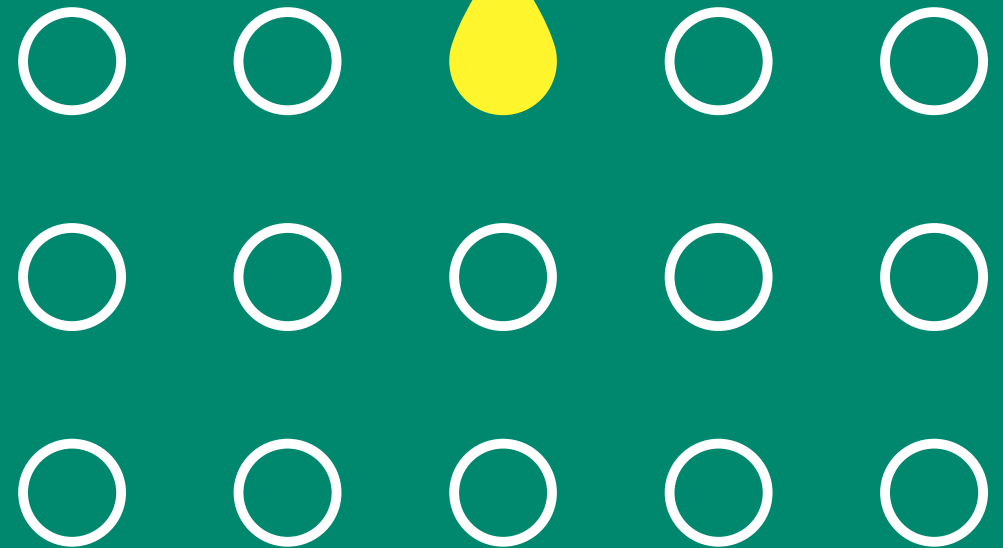
分子間相互作用を

ノンラベル

リアルタイム

で、測定するシステムです

1. センサーチップへの固定化



センサーチップとは

Sensor Chip

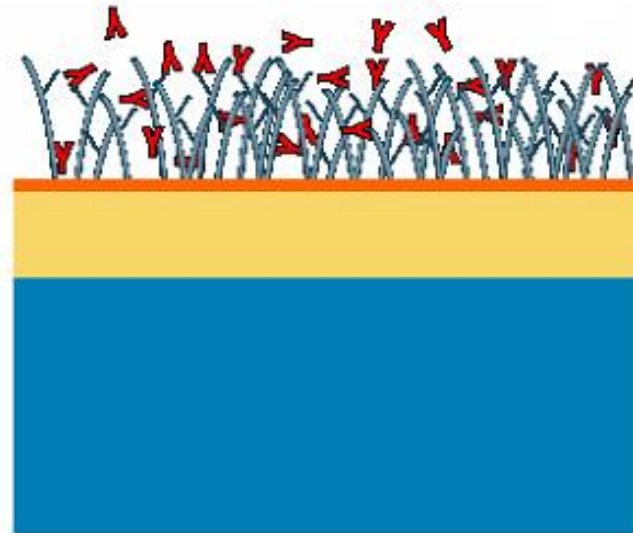


X100

Series S Sensor Chip



8K/8K+, T200, S200



修飾表面

金膜

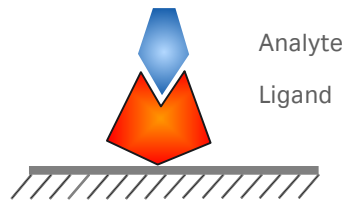
ガラス



フローセルの形成

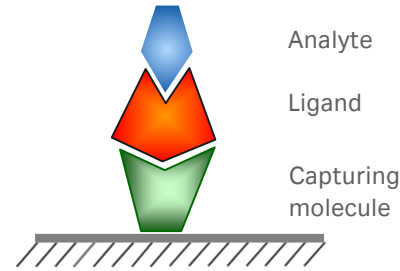
- 流路の開放部分にセットされて、フローセルを形成
- シート中央、ガラス基板の金膜上の各種修飾表面にリガンド分子を固定
- リガンドの種類に応じた固定化法およびセンサー表面（15種類程度）

固定化について：直接法とキャプチャー法



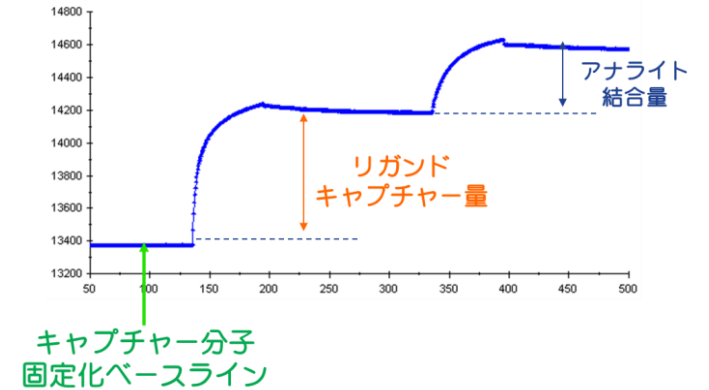
• 直接法

- リガンドをセンサーチップ上に共有結合



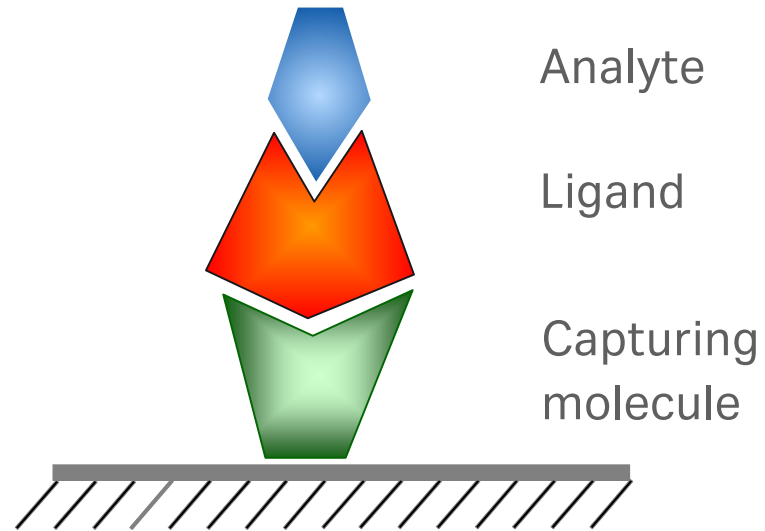
• キャプチャー法

- キャプチャー用分子をセンサーチップ上に共有結合
- リガンドはサイクル毎にキャプチャーさせる



	直接法（アミンカップリング）	キャプチャー法
Pros	古典的方法。 キャプチャー法でCapturing moleculeの固定化にもよく使われる。→アミンカップリングのページ参照。 参照論文が多い。 リガンドの消費量が少ない。	固定化によるリガンドの失活リスクがほとんどない。 再生条件の検討不要。 →実験成功の確実性。
Cons	アナライต์を剥がす再生条件の検討が必要。見つけれないケースがある。 リガンドの固定化時の酸に伴う変性。 →実験成功の不確実性。	固定化量が比較的少ない（多くの場合問題ない）。 リガンドの消費量が多い。 リガンドのタグに依存。→Biotin化は汎用性が高い。 Hisタグの場合、キャプチャー後のベースラインドリフトが問題になることがある。

キャプチャー法



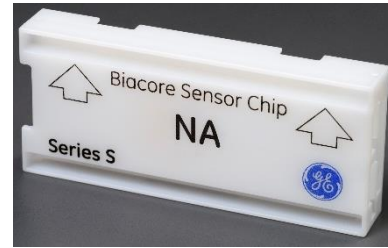
- キャプチャー法
 - キャプチャー用分子をセンサーチップ上に共有結合
 - リガンドはサイクル毎にキャプチャーさせる

代表的な固定化方法 ～ ビオチン化サンプルの固定化

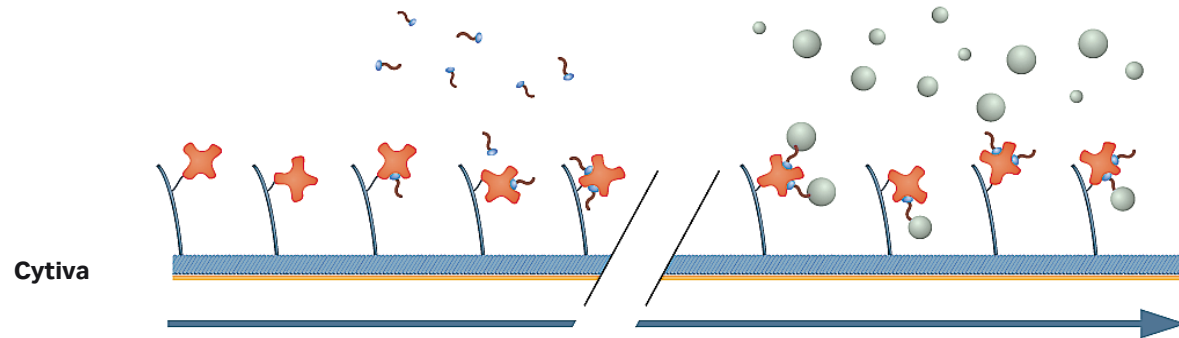
ニュートラビジン/ストレプトアビジン – ビオチンの高い親和性で安定したリガンドの固定化

センサーチップNA/SA

キャプチャー法（再生不可）



- センサーチップにニュートラビジン（NA）もしくはストレプトアビジン（SA）があらかじめアミンカップリングされている。
- 固定化は添加するのみ



Biotin CAPture Kit

キャプチャー法（再生可）



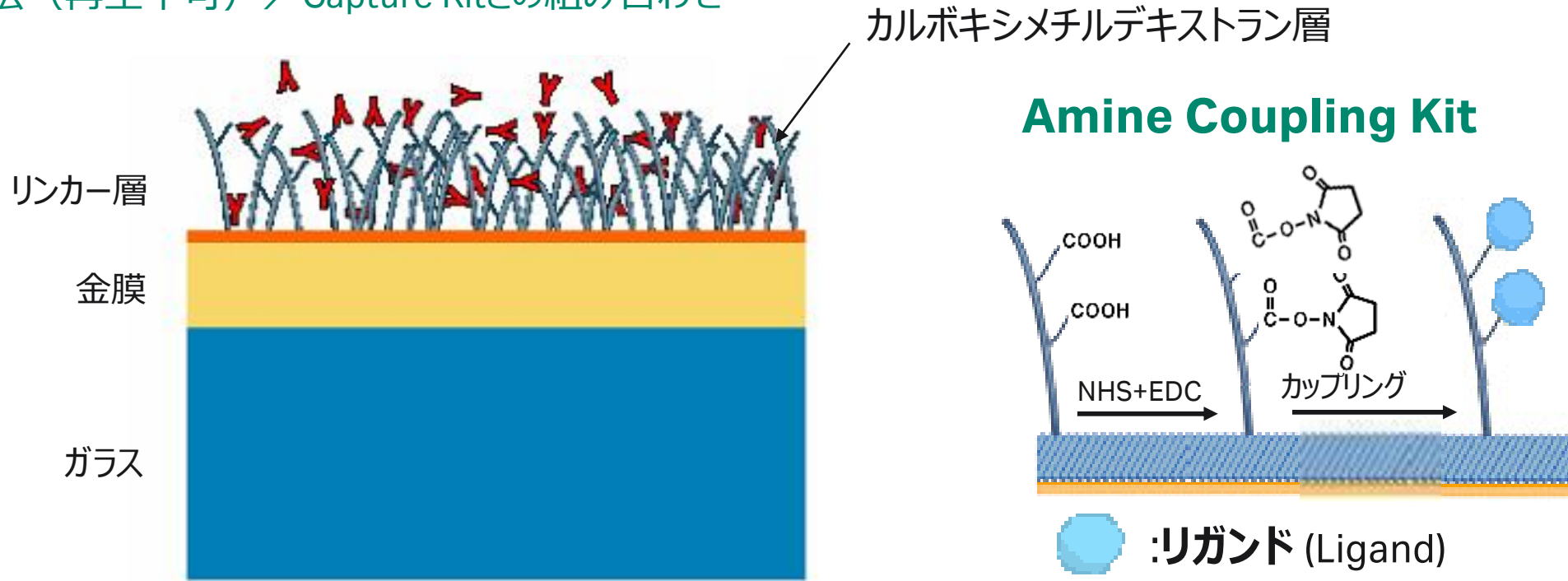
- 一本鎖オリゴDNAがプレイモビライズされたチップとストレプトアビジン(SA)修飾された相補鎖DNAを使用
- 強力なビオチン-ストレプトアビジン結合であってもリガンドの付け替えが可能



センサーチップの紹介

センサーチップCM5

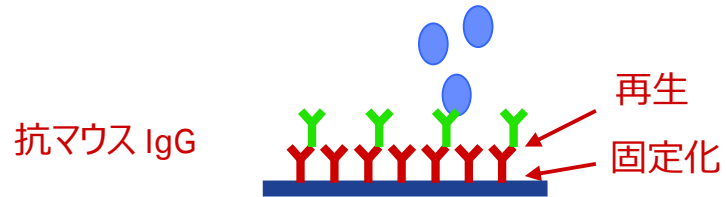
直接法（再生不可） / Capture Kitとの組み合わせ



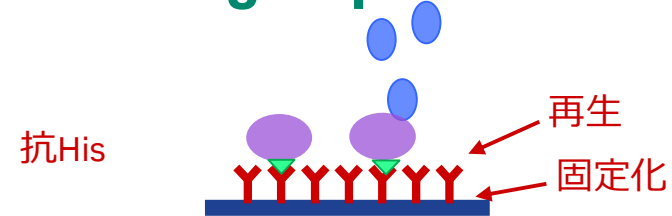
- リガンドの種類に応じた固定化法およびセンサー表面
- 直鎖デキストラン表面⇒固定化したサンプルの自由度が高い

センサーチップCM5等を使用した、キャプチャーキット

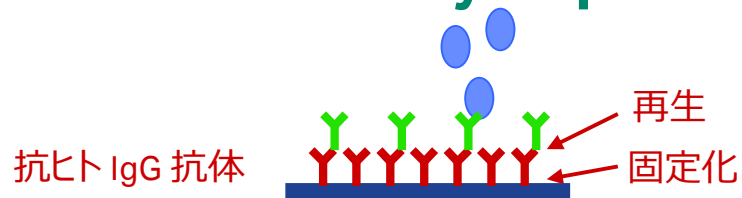
Mouse Antibody Capture Kit



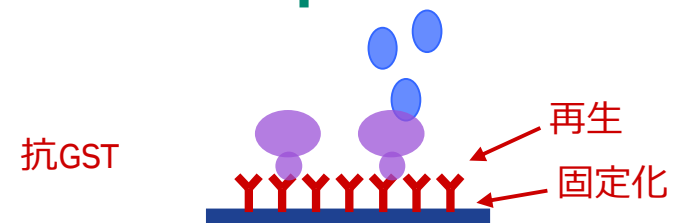
His-Tag Capture Kit



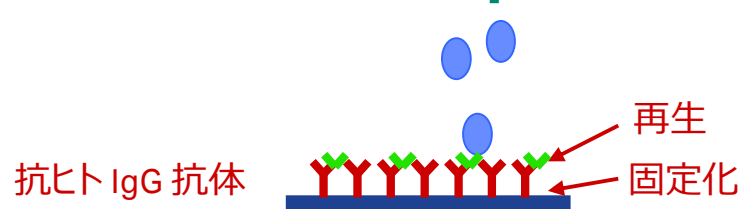
Human Antibody Capture Kit



GST Capture Kit



Human Fab Capture Kit

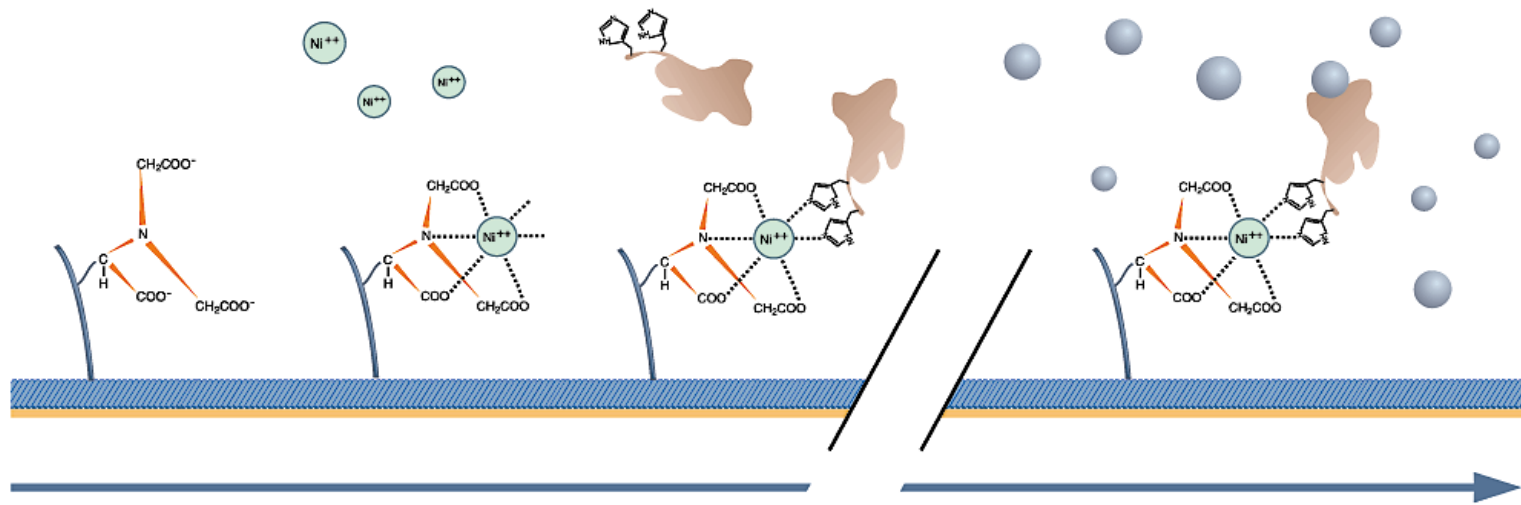


センサーチップの紹介

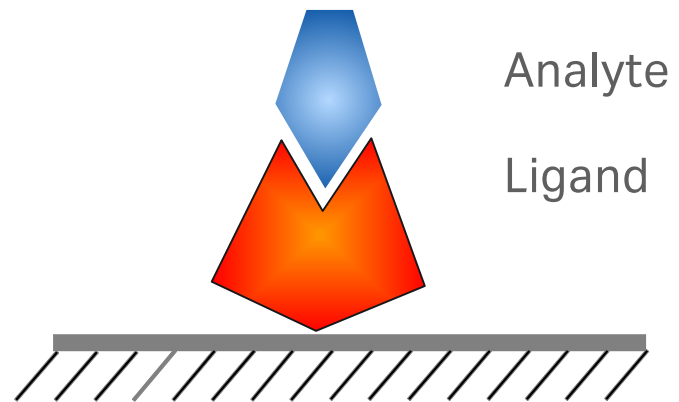
センサーチップNTA

キャプチャー法（再生可）

- CM5センサーチップにNTAがアミンカップリングされている
- リガンドはHisタグタンパク質
- NTA(キレート試薬)、ニッケル、Hisタグのキレート反応を利用した固定化



直接法 (アミンカップリング)



- 直接法
 - リガンドをセンサーチップ上に共有結合

アミンカップリングを行うのはどんな時？

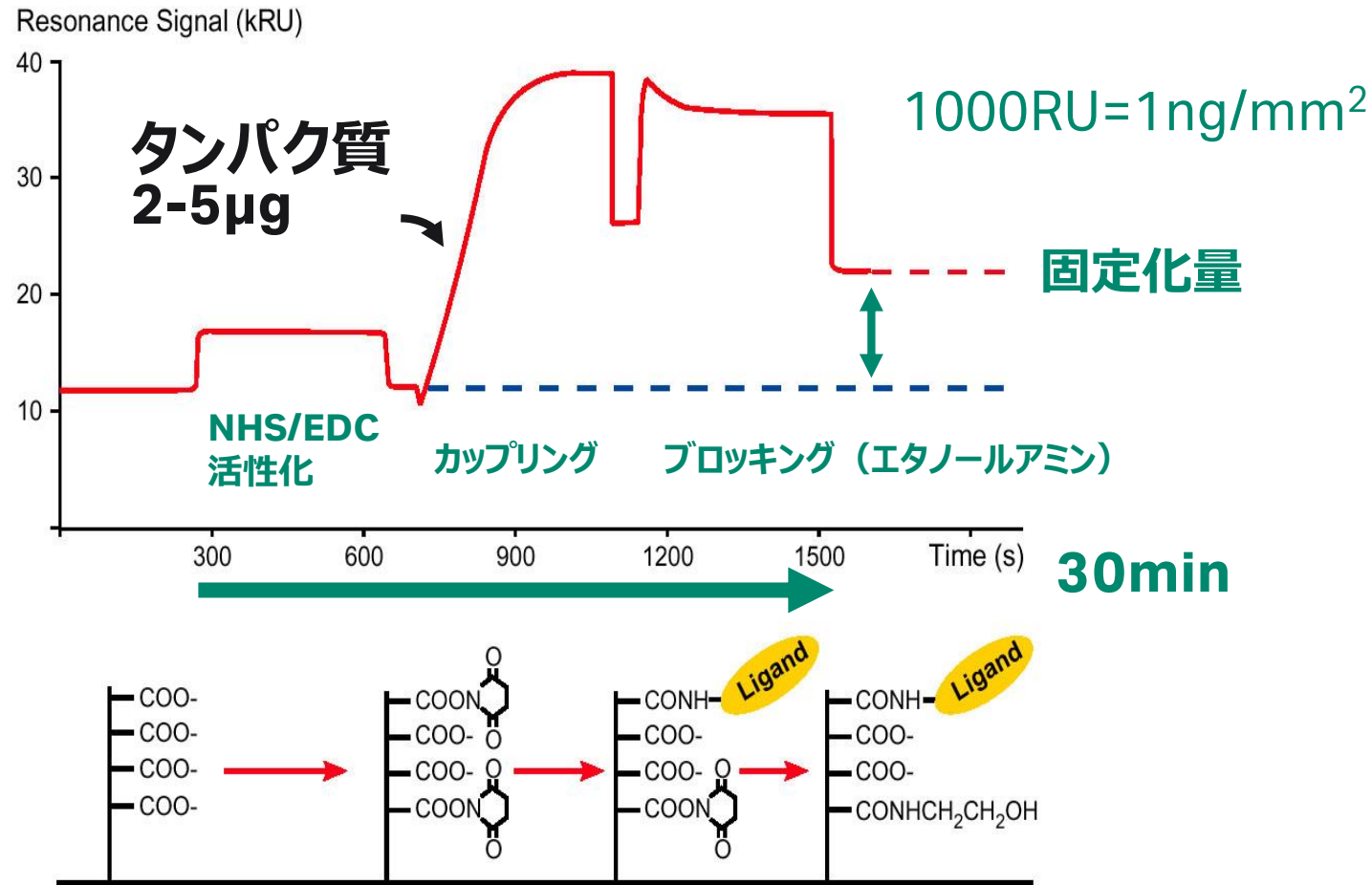
- リガンドのアミンカップリング
- 各種キットの抗体の固定化



Amine coupling kit

NHS, EDC, Ethanol Amineがセットになっています
(約50固定化分)

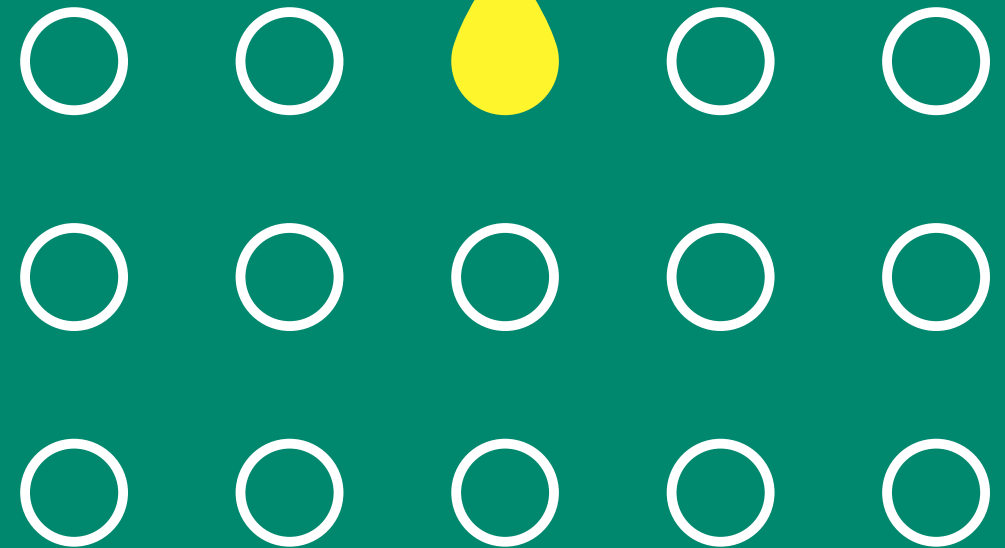
アミンカップリング法によるリガンド (またはCapturing molecule) の固定化



アプリケーション別お勧め固定化方法

サンプル	スクリーニング	キャクタイゼーション
抗体	各種抗体Capture kit Sensor Chip Protein A / Protein G	各種抗体Capture kit Sensor Chip Protein A / Protein G
低分子	Sensor Chip NA/SA	Biotin CAPture kit Sensor Chip NA/SA
その他	各種 Capture kit Amine Coupling Kit	Biotin CAPture kit 各種 Capture kit Amine Coupling Kit

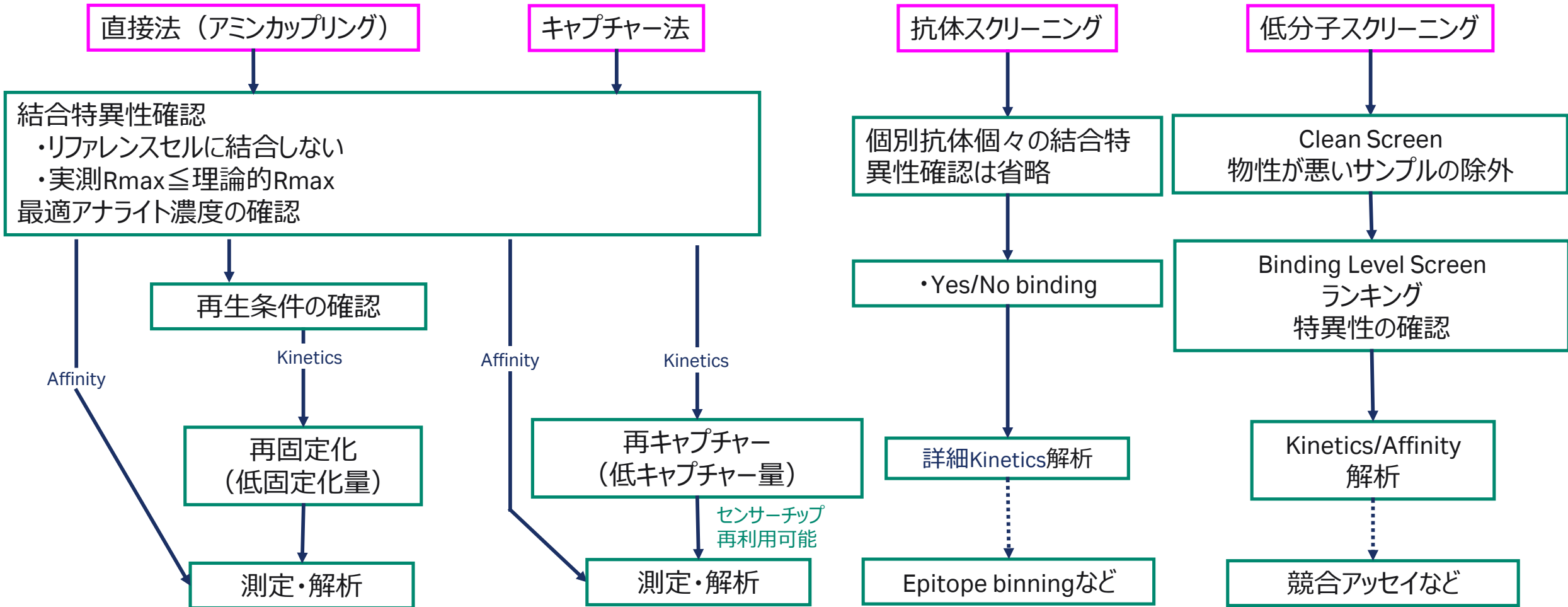
2. Biacore測定のワークフロー



K_D値算出までの固定化後のワークフロー

検体数が少ない場合

検体数が多い場合（スクリーニング）



【重要】特異的結合の確認

① 固定化リガンドに“特異的”に結合

リファレンスセルに結合しない

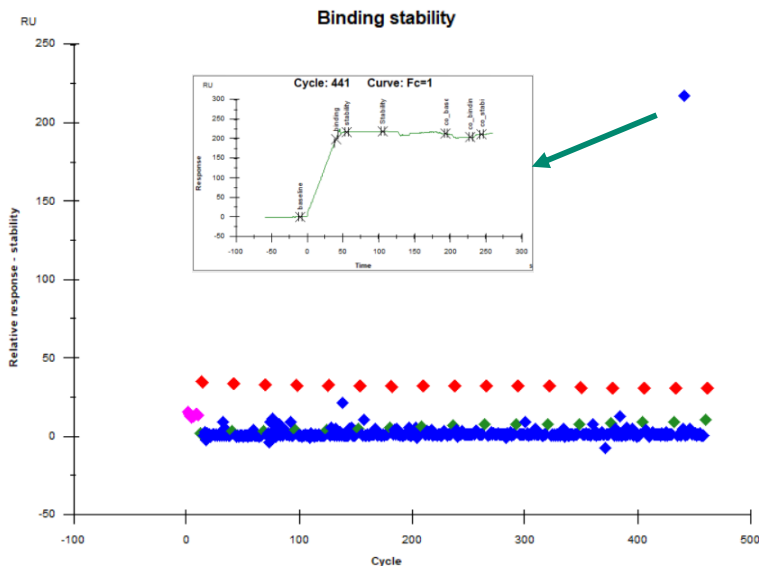
② リガンド上の特定の結合サイトに“特異的”に結合

実測Rmax ≤ 理論的Rmax

【重要】特異的結合の確認①

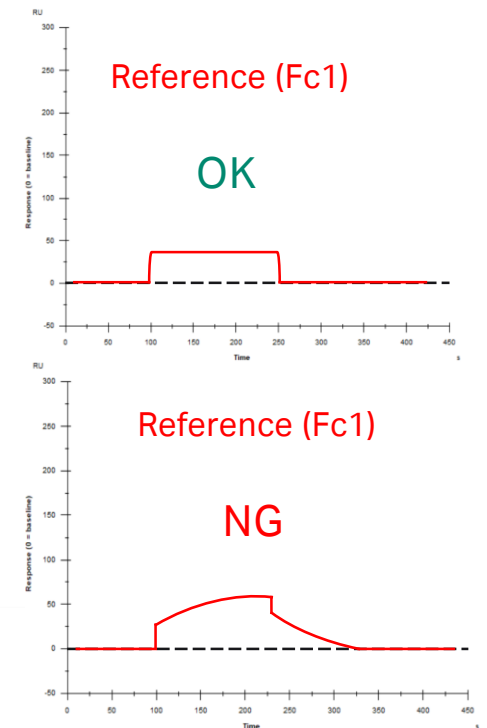
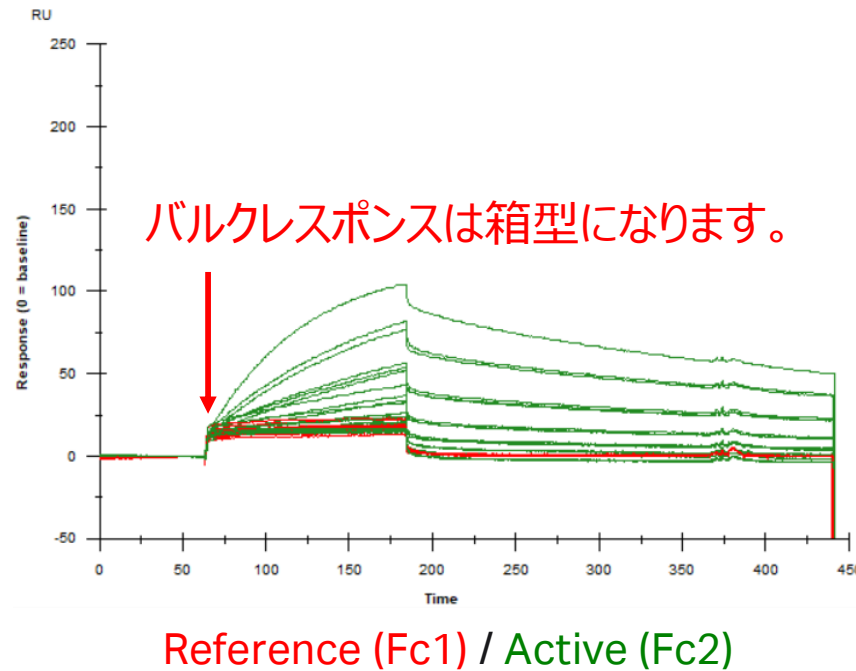
リファレンスセルに非特異的結合がないことを確認しましょう。

スクリーニングの場合
QCプロットの確認



Reference (Fc1) のみをプロット
(Y軸：解離後のReport point (Stability))

キャラクタイズの場合
センサーグラムの確認

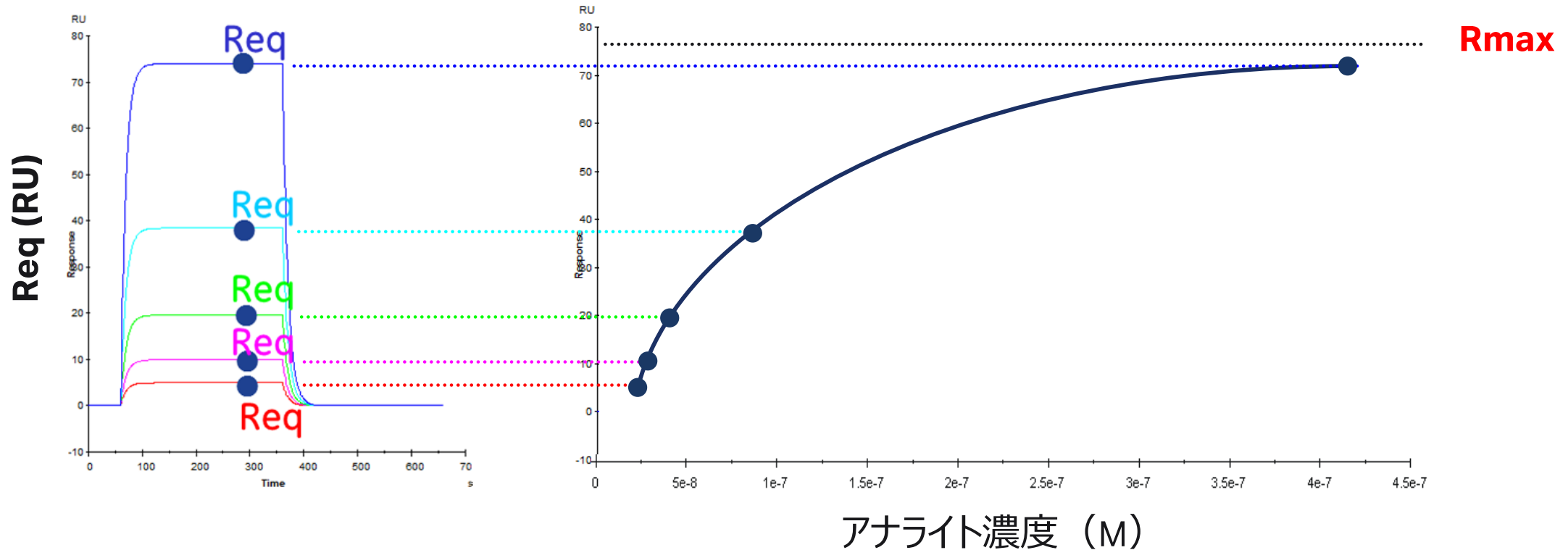


【重要】特異的結合の確認 ②

非特異的結合のレスポンスを解析しても意味がありません！

アナライト濃度を上げていき、理論的Rmax以下でResponseが飽和することを確認。

実測 $R_{max} \leq$ 理論的 R_{max}



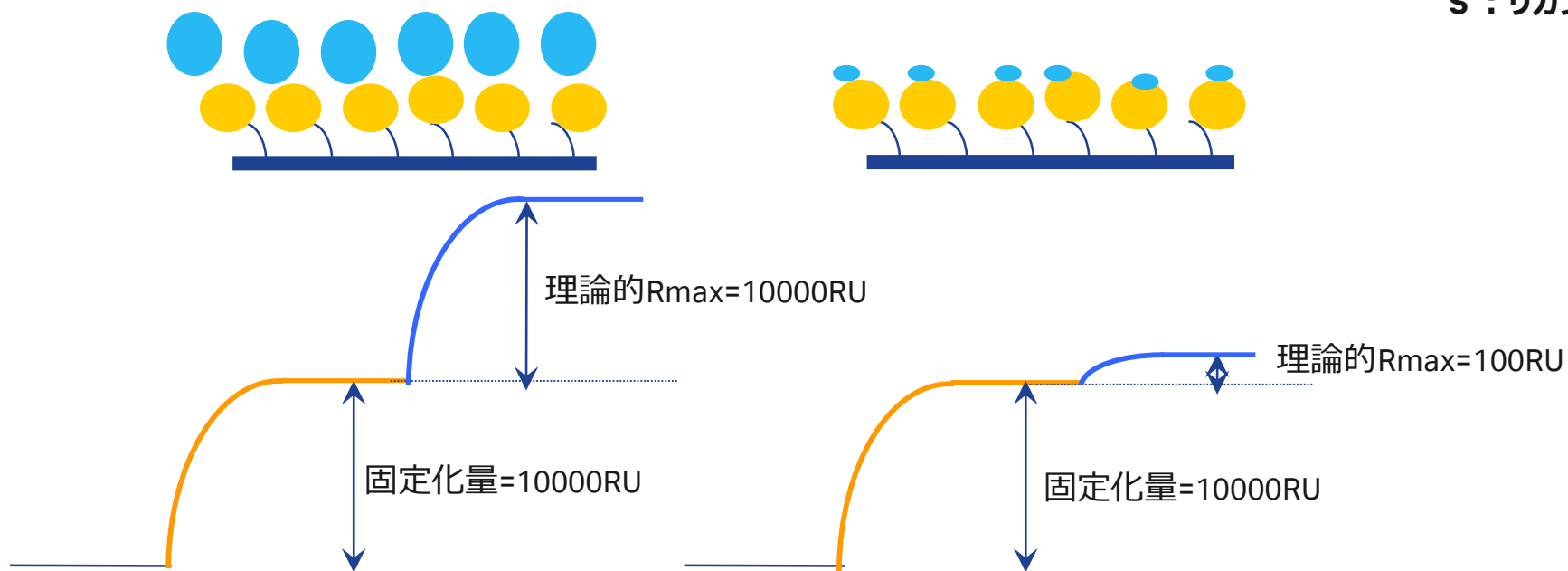
【Tips】Rmaxの算出方法

理論的Rmax : 固定化したリガンド分子にアナライトが全て結合した時に得られる理論上最大のレスポンス(RU)

実測Rmax : 実際にアナライトを添加した時、結合量が飽和するレスポンス(RU)

$$\text{最大結合量(理論的Rmax)} = \frac{\text{アナライトの分子量(Da)}}{\text{リガンドの分子量(Da)}} \times \text{リガンドの固定化量(RU)} \times s$$

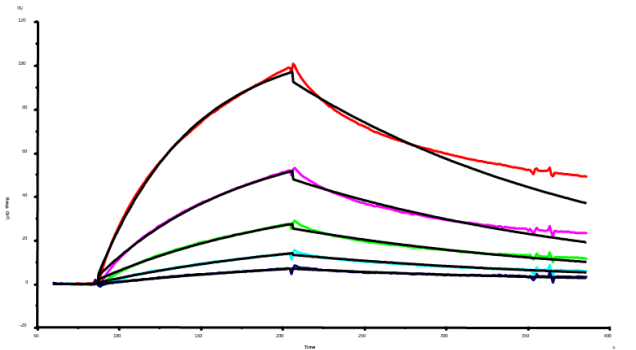
s : リガンドの価数



カインेटクス解析とアフィニティ解析

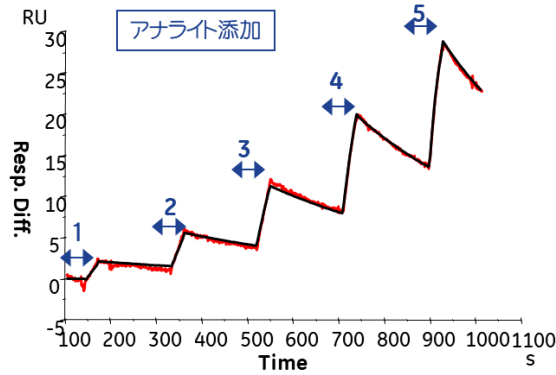
カインेटクス解析

k_a, k_d, K_D が求められる



	ka (1/Ms)	kd (1/s)	Rmax (RU)	RI (RU)	Conc of analyte	KA (1/M)	KD (M)
but_2 Fc=2-1 - 1	4.43e4	5.19e-3	408		13	66.7n	8.54e6
but_2 Fc=2-1 - 2				5.07	2.5	33.4n	1.17e-7
but_2 Fc=2-1 - 3				16.7n			
but_2 Fc=2-1 - 4				0.922		8.3n	
but_2 Fc=2-1 - 5				0.177		4.2n	

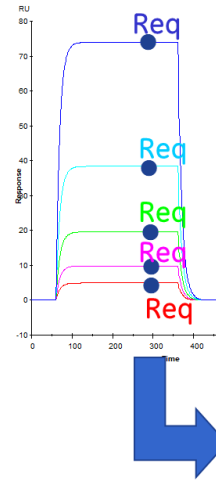
マルチサイクルカインेटクス (MCK)



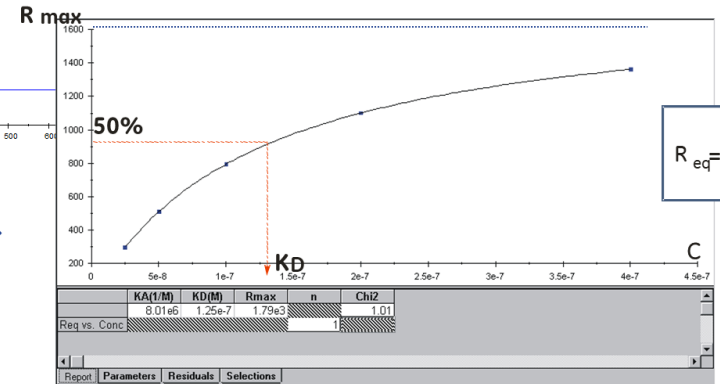
シングルサイクルカインेटクス (SCK)

アフィニティ解析 (センサーグラムが箱型の場合)

K_D のみ求められる



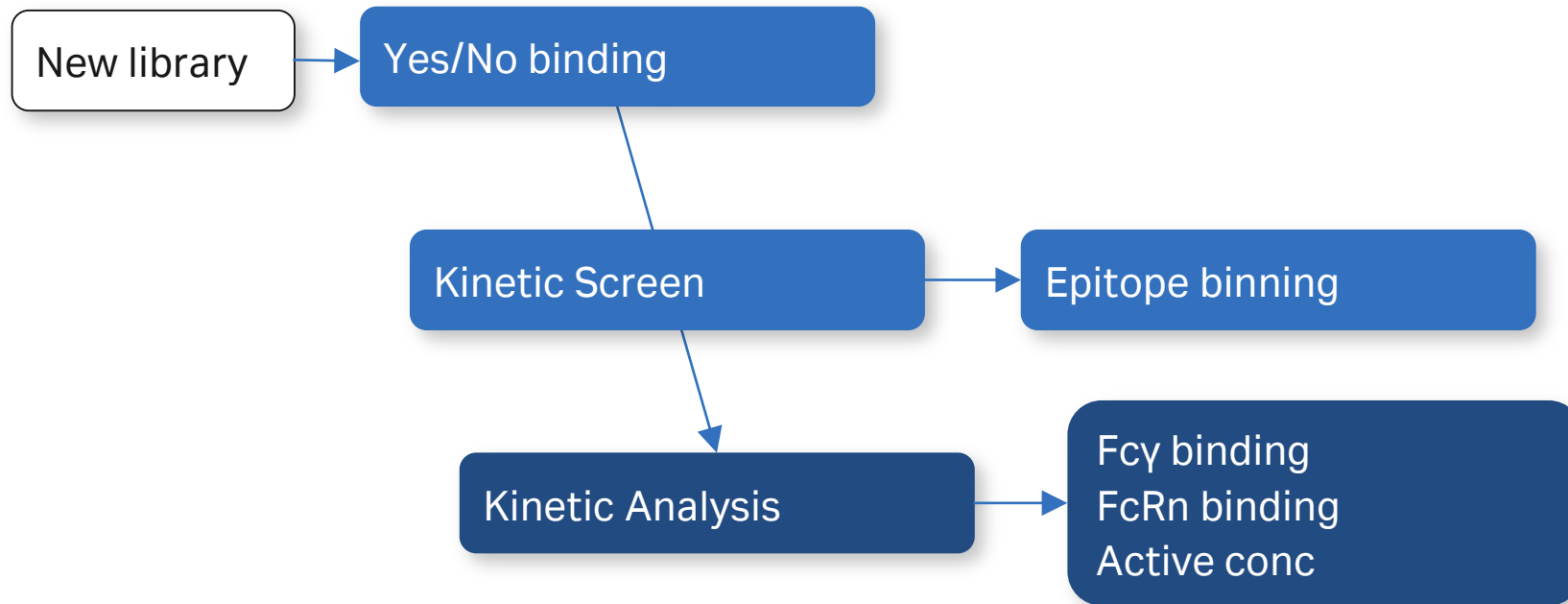
Fit to model $A + B \rightleftharpoons AB$ at steady state



$$R_{eq} = \frac{K_D \cdot C \cdot R_{max}}{(K_A \cdot C \cdot n + 1)}$$

K_D : 1/2 Rmax (RU)となるアナライト濃度に相当

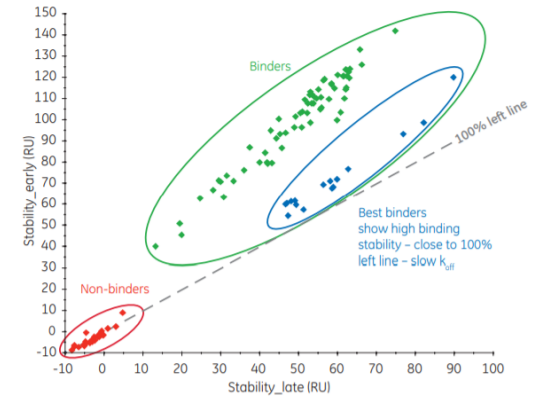
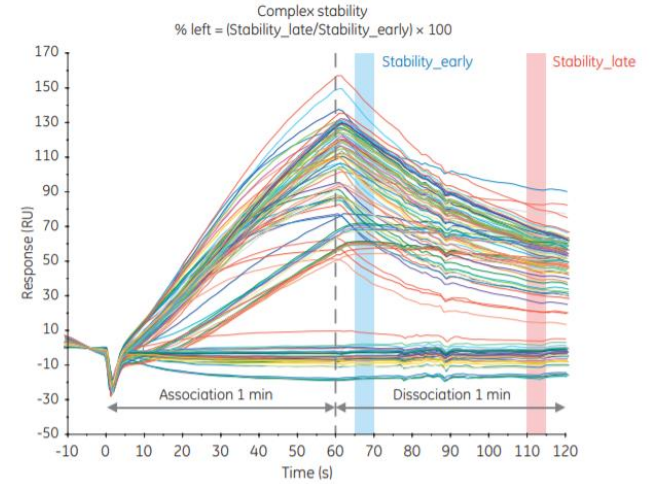
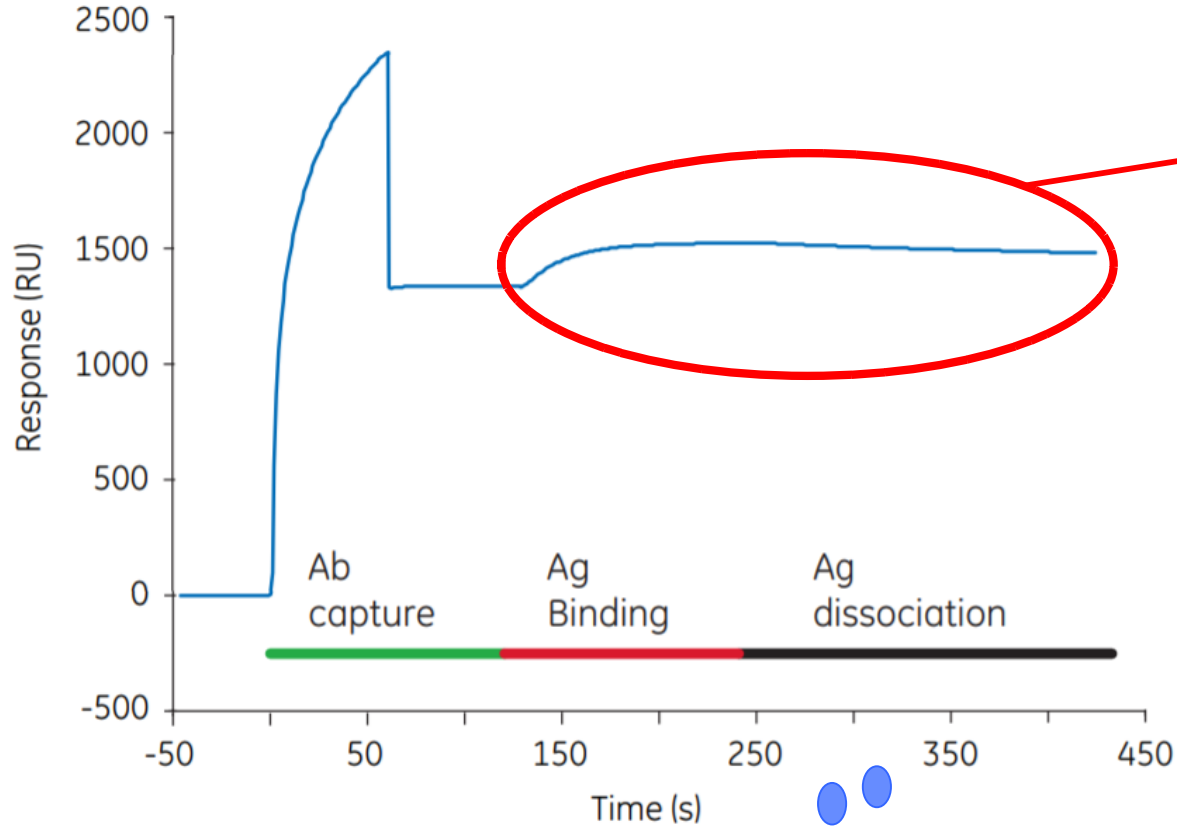
抗体スクリーニング/キャラクタライゼーションワークフロー



Antibody screening with Biacore™ systems (29338835 AA)

<https://cdn.gelifesciences.com/dmm3bwsv3/AssetStream.aspx?mediaformatid=10061&destinationid=10016&assetid=33038>

抗体スクリーニング/キャラクタライゼーション ワークフロー



● 1:1 反応にするため抗体をリガンドとする。

● キャプチャー法により Sensor Chip 再生可能



Ab Capture kit
ProA Chip(ヒト)
ProG Chip(げっ歯類)など



評価抗体の
キャプチャー



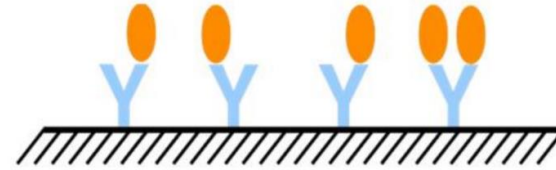
抗原の
結合/解離



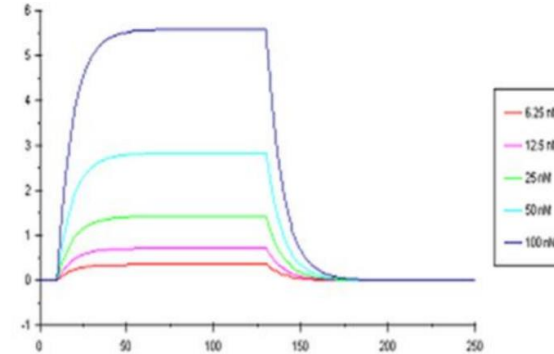
再生

【Tips】なぜ抗原側を固定化が第一選択ではないのか？

Affinity

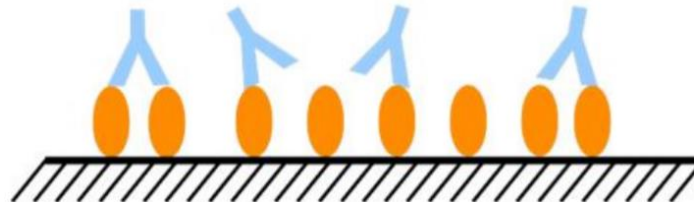


抗体側を固定化

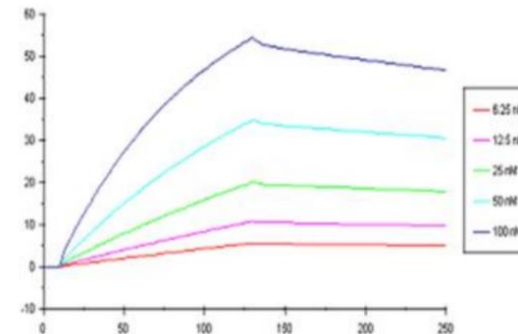


抗体がリガンドで、1つの結合サイトと抗原が1:1 Bindingで結合。

Avidity



抗原側を固定化

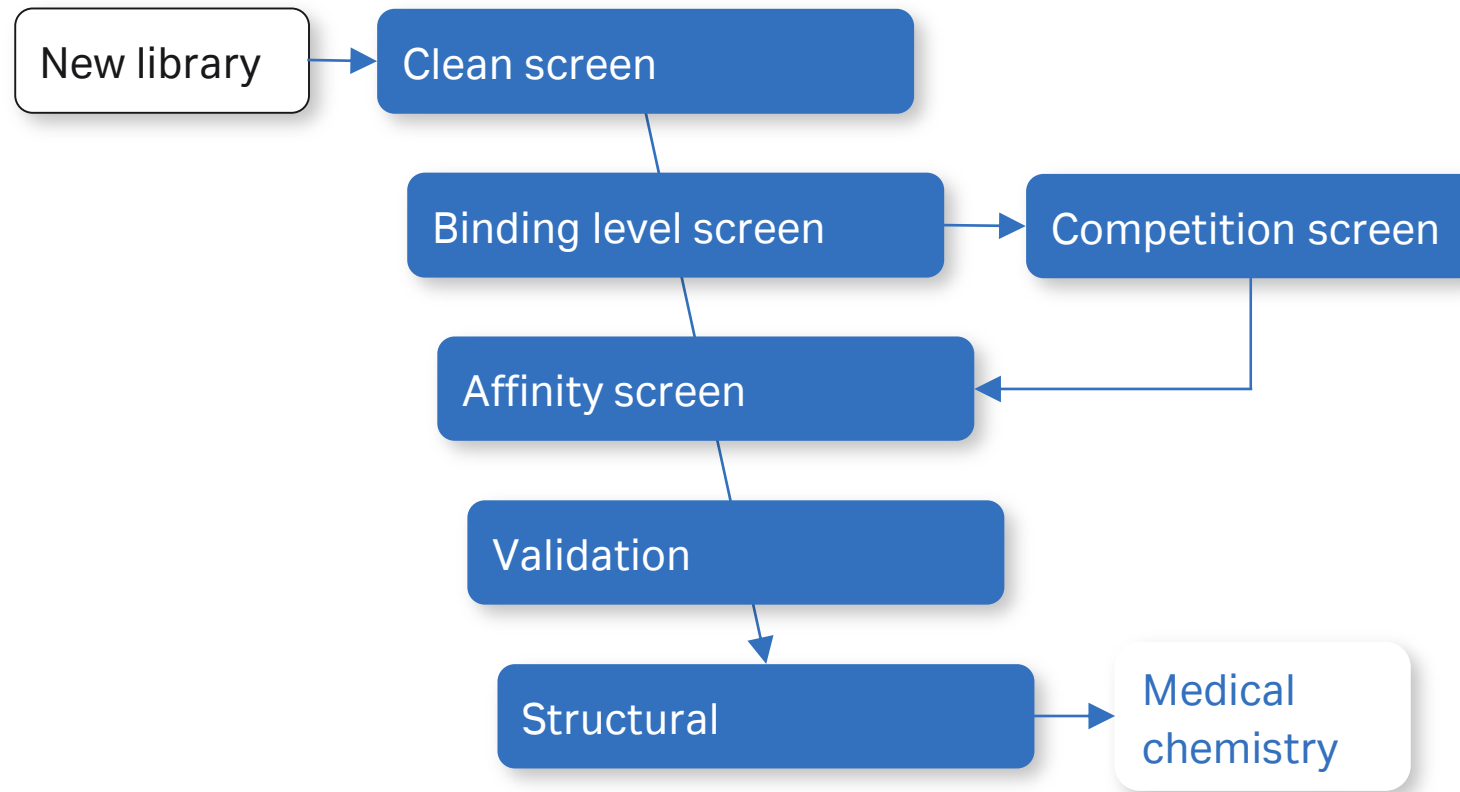


抗体がアナライトで、2つの結合サイトが抗原と結合。

1:1 Bindingよりも解離せず、見かけ上解離速度が遅くなります。

抗体以外にも、結合サイトが複数ある分子がアナライトの場合、アビディティの影響を受けます。

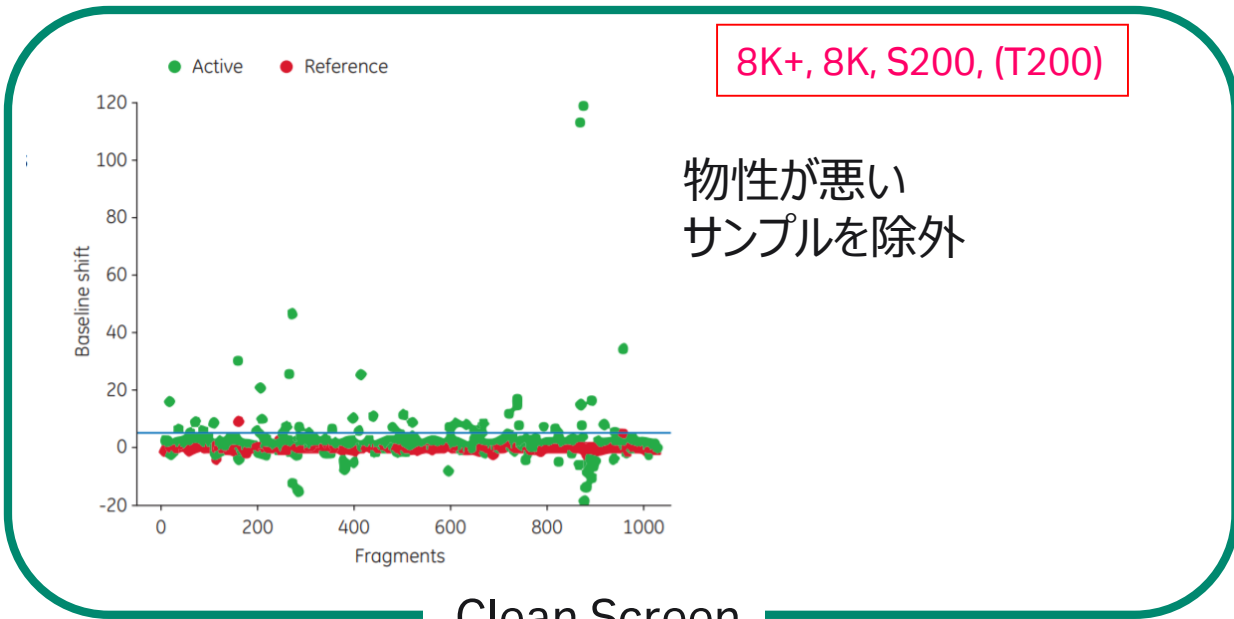
低分子(FBDD)スクリーニング/キャラクタライゼーションワークフロー



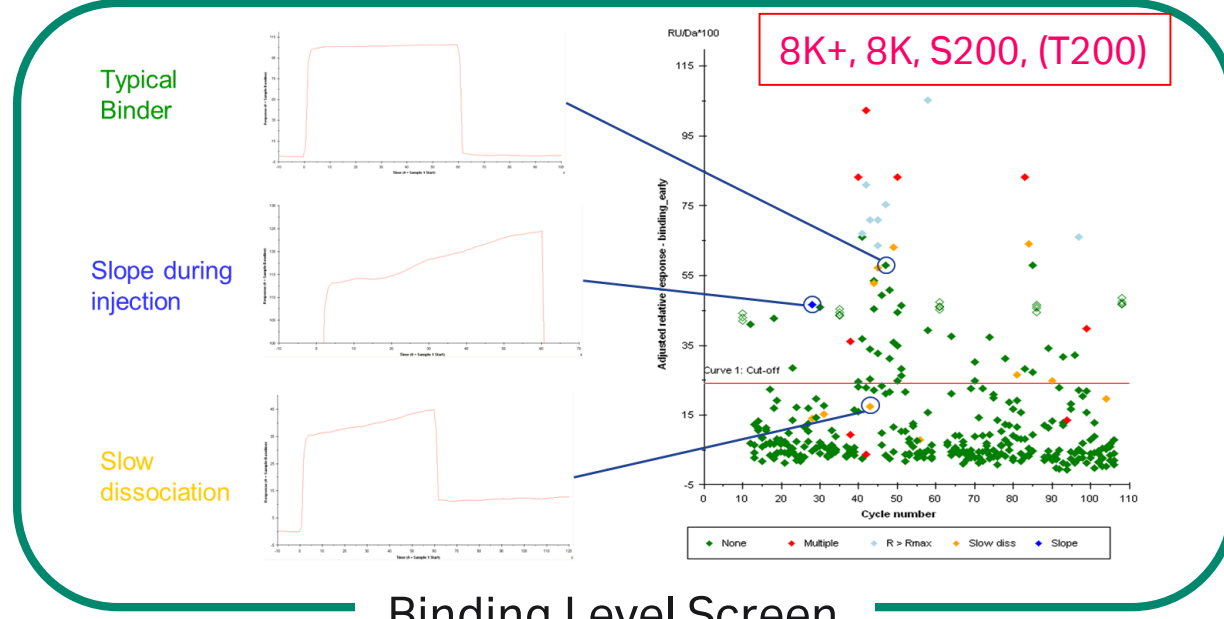
Fragment and small molecule screening with Biacore™ systems (29338836 AA)

<https://cdn.gelifesciences.com/dmm3bwsv3/AssetStream.aspx?mediaformatid=10061&destinationid=10016&assetid=33040>

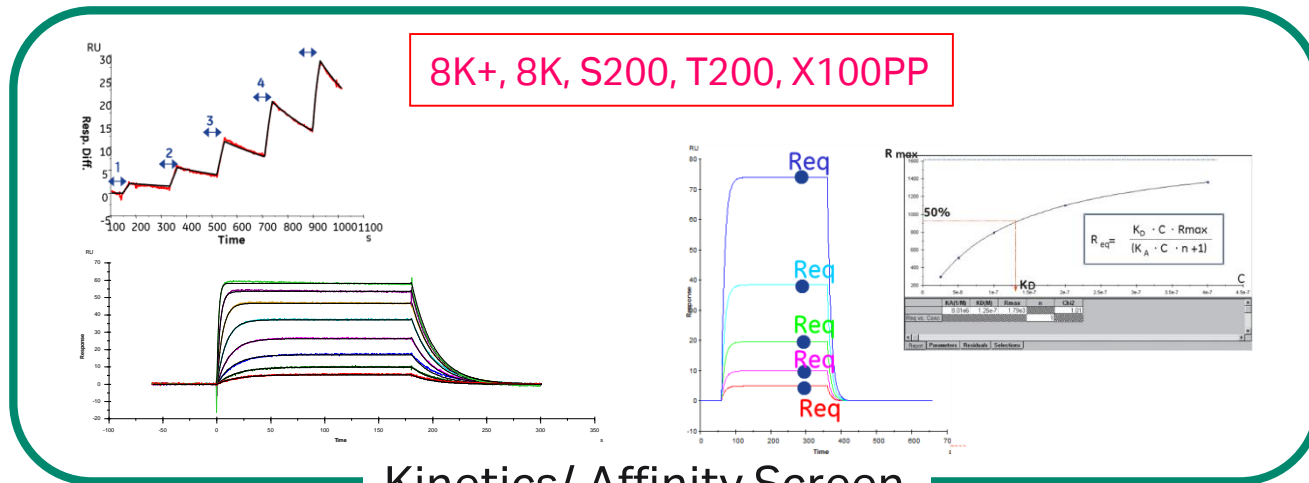
低分子スクリーニング/キャラクタライゼーションワークフロー



Clean Screen



Binding Level Screen



Kinetics/ Affinity Screen

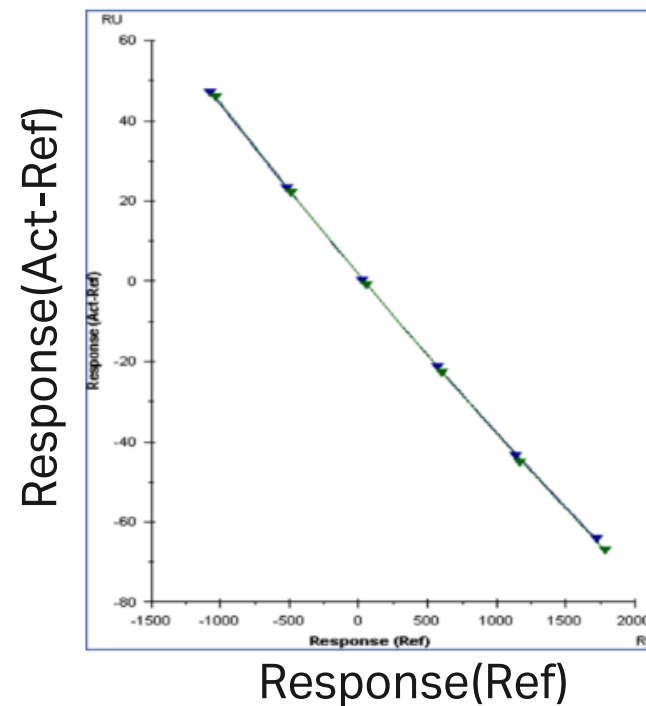
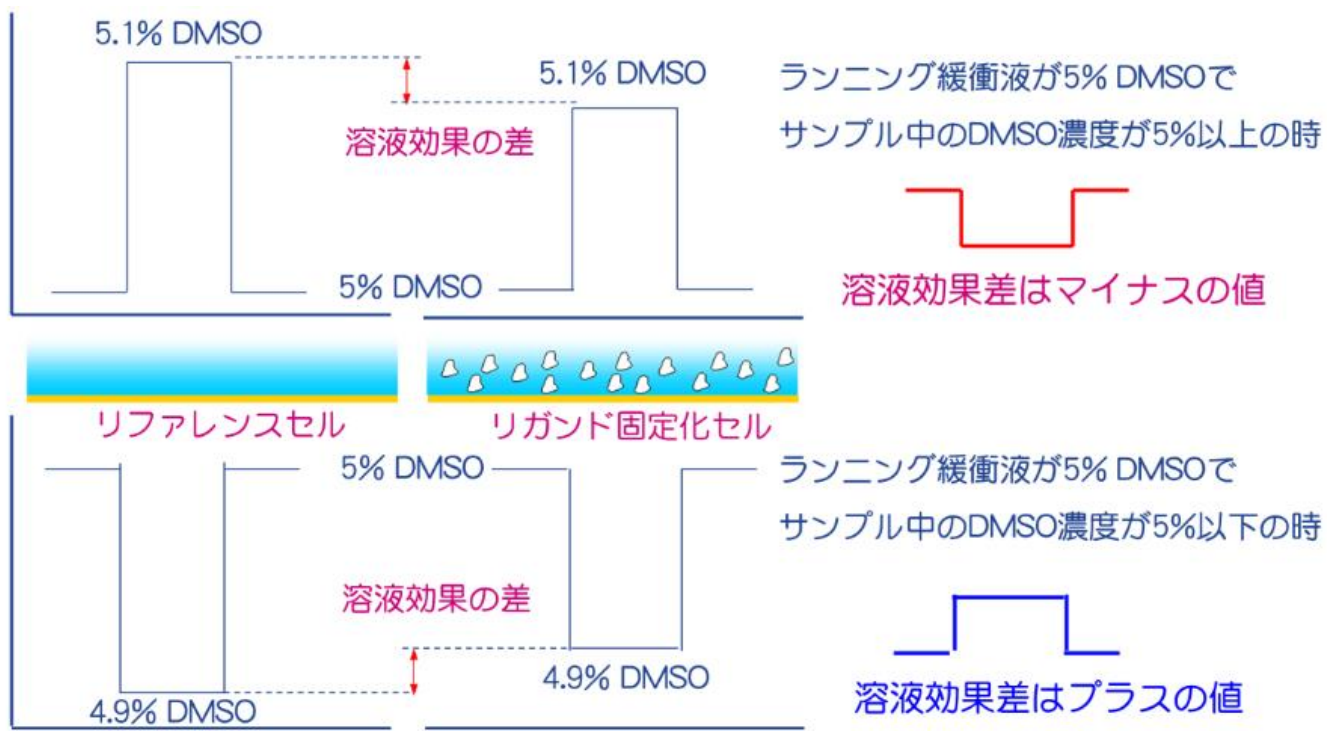
8K+, 8K, S200, T200, X100PP

溶媒補正

【Tips】 溶媒補正の考え方

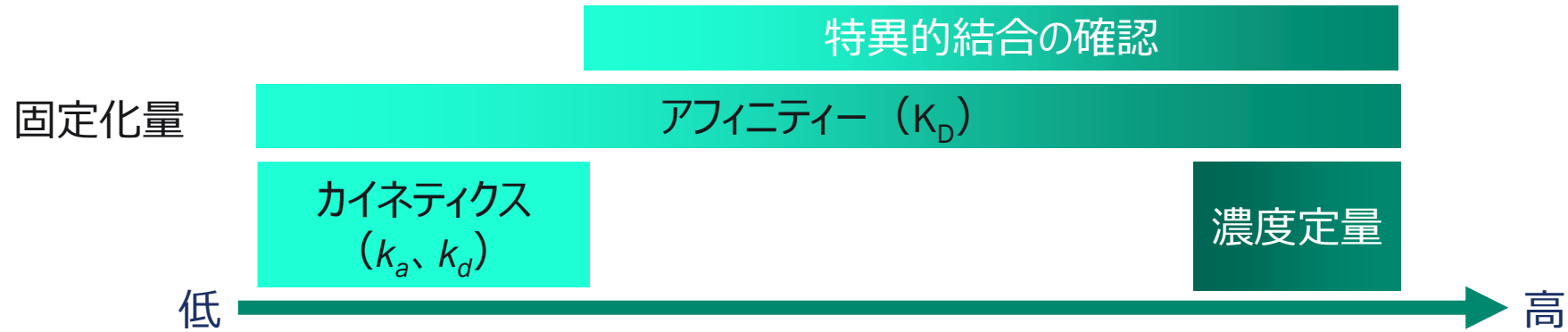
ランニング緩衝液とアナライツ溶液中のDMSO濃度1%の違いは約1,500 RUのバルクレスポンスに相当。
DMSO濃度の調製誤差が無視できないバルクレスポンスの差を生む可能性がある。

リガンド固定化セルに添加した溶液は、リガンド分子の占有体積分排除されるため、
リファレンスセルのバルクレスポンスは、リガンド固定化セルよりも大きい。



補正用曲線を利用して溶媒誤差を補正

固定化量の設定の考え方 (Tips Rmaxの算出方法のページ参照)



【カインेटイクスにおける目安】

タンパク質アナライト : 実測 Rmax ≤ 50 RUになる程度の固定化量
 低分子アナライト : 実測 Rmax ≤ 30 RUになる程度の固定化量

リガンド : Carbonic anhydrase (30 kDa)
 アナライト : Furosemide (330 Da)で 20RU を目指すなら・・・

$$20 \text{ RU(Rmax)} = \frac{330 \text{ (Da)}}{30,000 \text{ (Da)}} \times \text{リガンドの固定化量(RU)} \times 1$$

$$\text{リガンドの固定化量} = 1,819 \text{ RU}^*)$$

*) リガンドが100%結合活性を保持している前提のもと

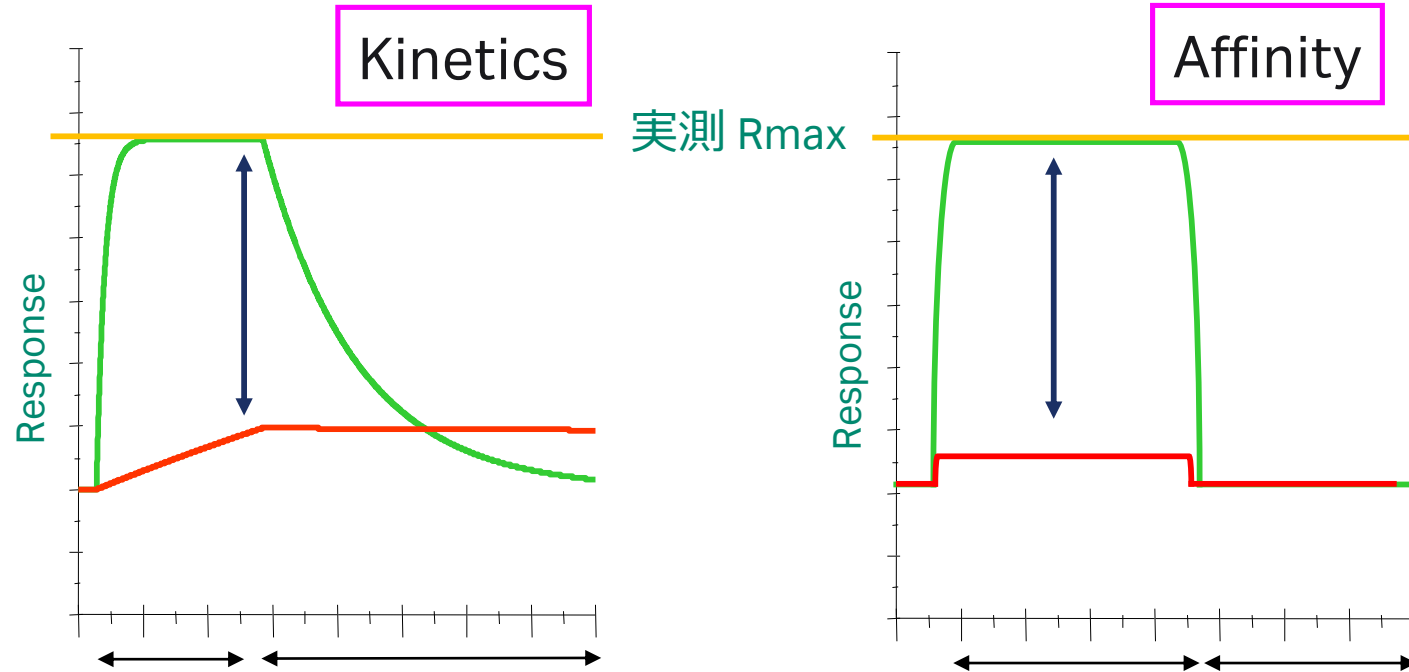
アナライト添加濃度・時間の設定の目安

Rmax近くからギリギリレスポンスが得られる範囲で、～3桁程度の添加濃度レンジ。

(例) 3倍希釈で5点。

条件検討の方法

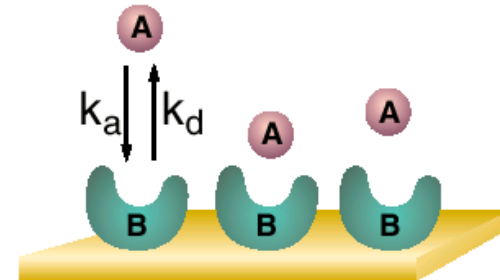
- ✓ T200/S200/X100 : Manual Runでチェックする。
- ✓ 8K : 2D kinetics で幅広く測定。



	Kinetics	Affinity
添加時間	結合・解離が緩やかなセンサーグラム : 2-5 min 箱型に近いセンサーグラム : 1-2 min	結合・解離が緩やかなセンサーグラム : 適用不可 箱型または箱型に近いセンサーグラム : 1-2 min
解離時間	結合・解離が緩やかなセンサーグラム : ~90 min 箱型に近いセンサーグラム : 1~2 min	不要
濃度点数	5	8

カインेटクス解析を目的とした至適測定条件

1. 低い固定化量に調節する
2. 高流速で測定する
30 $\mu\text{l}/\text{min}$ 以上
3. 適切なアナライト濃度・時間を用いる
4. アナライト濃度は5段階以上ふる
5. 0濃度 (blank) も必ず測定



アフィニティー解析を目的とした至適測定条件

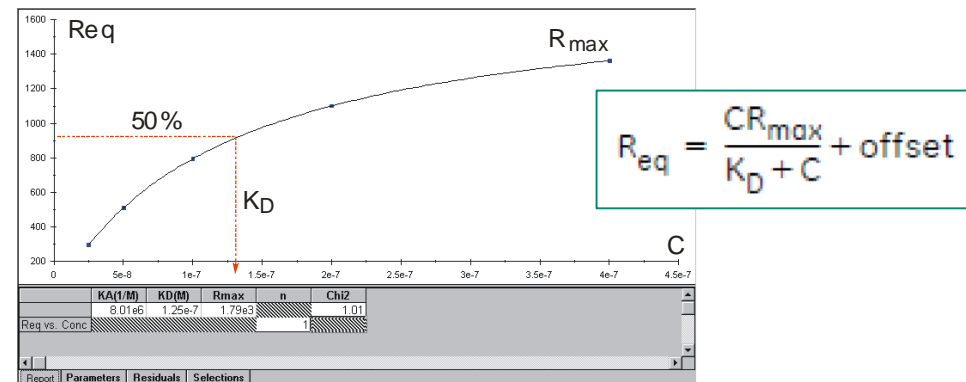
1. 固定化量は必要十分な結合レスポンスが得られる量

2. 適切なアナライト濃度・時間を用いる

1/10 ~ 少なくとも2×K_D値付近、できれば10×K_D値付近

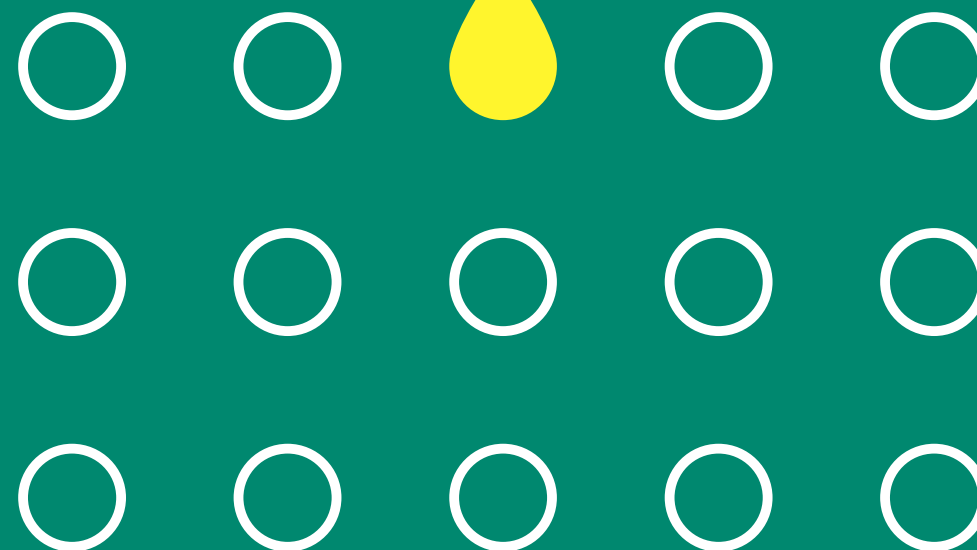
3. アナライト濃度は8段階以上ふる

4. 0濃度 (blank) を必ず測定



Fit to model $A + B \rightleftharpoons AB$ at steady state

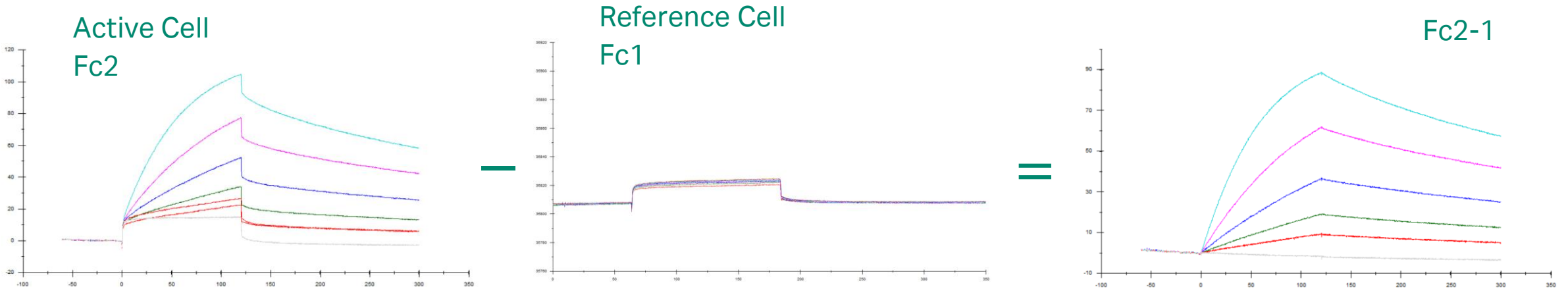
3. センサーグラムの解析



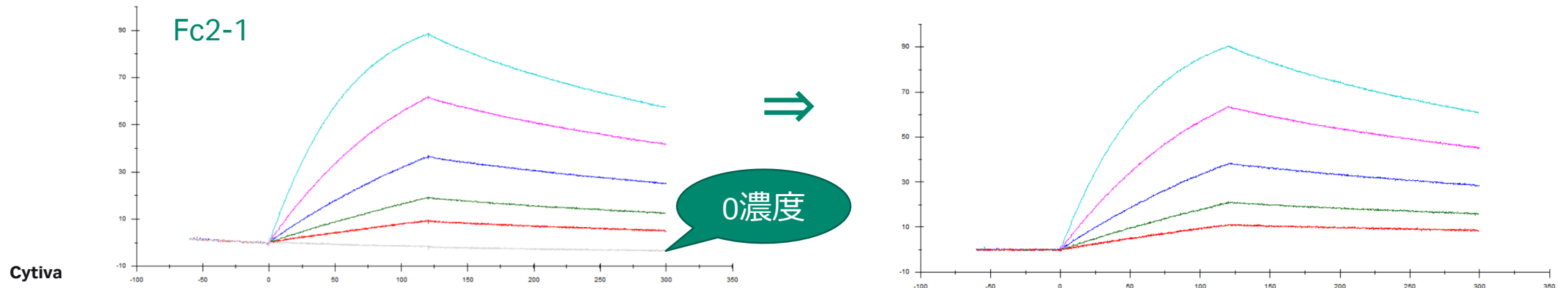
Biacore T200 evaluation ソフトウェアを用いた解析デモ

生データから解析対象データへの変換 -ダブルサブトラクションの考え方-

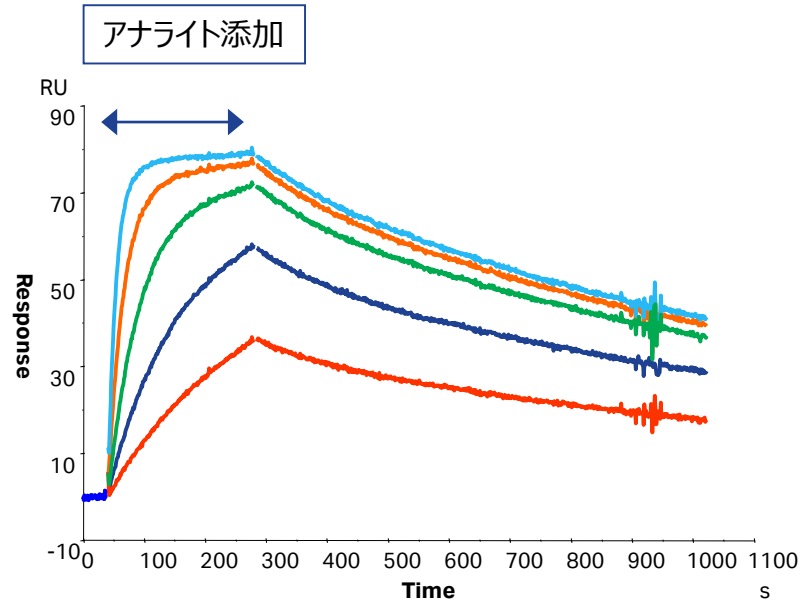
① Fc2-1の差し引き (サブトラクション) による溶液効果の補正。



② アナライト 0 濃度の差し引き (サブトラクション) によるドリフト等の補正



マルチサイクル vs シングルサイクルカインेटクス解析



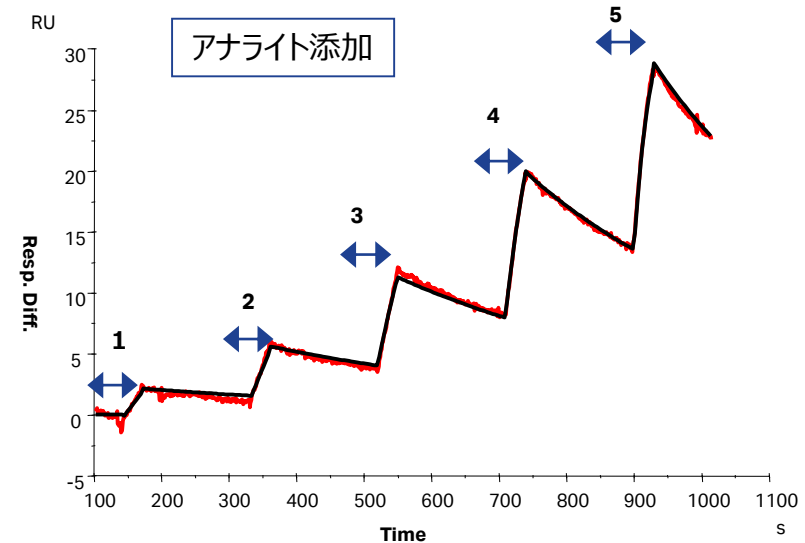
各濃度は個別サイクルで測定する



結合アナライトを取除く再生操作が必須

各サイクルでリガンドのアナライト結合活性の再現性が重要

再生が困難なサンプルには適用できない



各濃度は同一サイクルで測定する



再生操作が不要

再生が困難なサンプルにも適用できる

カインेटクス解析の反応モデル

反応様式に合わせたモデル式を選択してください。

1:1 Binding



リガンドとアナライトが 1 分子同士で結合するもっとも単純な反応モデル。

Bivalent Analyte



アナライトが 2 価もしくはホモ 2 量体の反応モデル。AB 複合体形成後、リガンド B が 2 次的に結合する反応。

Heterogeneous Analyte $A_1 + B \rightleftharpoons A_1B, A_2 + B \rightleftharpoons A_2B$

競合反応。リガンド上の 1 種類の結合部位を 2 種類のアナライトが競合する反応。

Heterogeneous Ligand $A + B_1 \rightleftharpoons AB_1, A + B_2 \rightleftharpoons AB_2$

アナライトに対して親和性の異なる 2 つの結合部位を持つリガンドにアナライトが並行して結合する反応モデル。

Two state Reaction



リガンドとアナライトの 1 分子同士の結合であるが、複合体形成後コンフォメーション変化を起こす反応モデル。

* 可能な限り **1:1 Binding** のアッセイ系を構築する。

カイネティクス解析 クォリティーコントロール(1)

	Quality Control	Report	Residuals	Parameters
①	✓	Kinetic constants are within instrument specifications.		
②	✓	Kinetic constants appear to be uniquely determined.		
③	✓	No significant bulk contributions (RI) found.		
④	→	Check that sensorgrams have sufficient curvature.		
⑤	→	Examine the residual plot. Pay attention to systematic and non-random deviations.		

①速度定数がシステムのスペック範囲内か？

	8K/8K+	T200	S200	X100
k_a (1/Ms)	$\sim 10^9$	$10^3 \sim 10^9$	$10^3 \sim 10^9$	$10^3 \sim 10^7$
k_d (1/s)	$10^{-6} \sim 0.5$	$10^{-5} \sim 1$	$10^{-5} \sim 2$	$10^{-5} \sim 0.1$

②各パラメータが独立して算出されているか？

k_a 、 k_d および Rmax の間には相関性がなく、独立した値となる。

マストランスポートリミテーションの強い状況下で測定した結果は、 k_a 、 k_d に相関性が見られる。

③溶液効果の値 (RI) の妥当性

リファレンスセルおよびアナライトのゼロ濃度を差し引いた際、RI はゼロに近い値となるはずである。

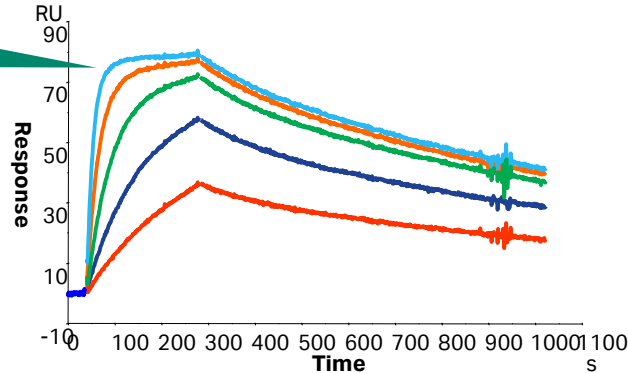
それに対して、RIの解が大き過ぎないかを確認する。

カインेटクス解析 クォリティーコントロール(2)

④センサーグラムはカーブを描いているか？

センサーグラムの結合相が直線的（拡散依存）の場合、得られる解析結果の信頼性は低い。

高濃度サンプルに注目



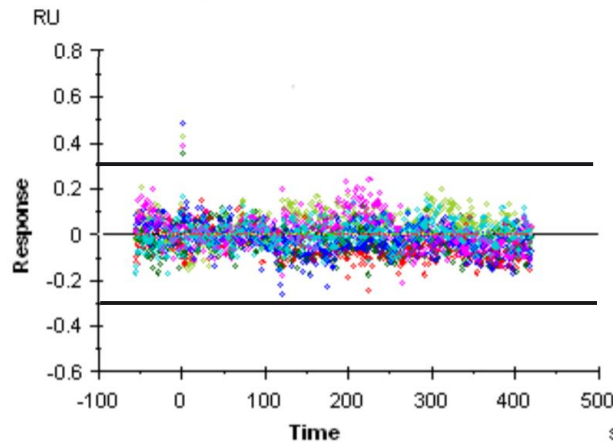
⑤フィッティングカーブに対して測定プロットがランダムに分散しているか？残差プロットを確認。

良好なフィッティング

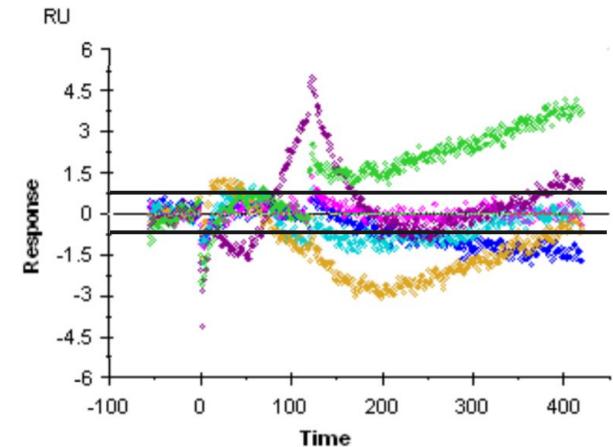
1) ランダムにプロットが分散。

2) ガイドライン内にほとんどのプロットが入っている

Residuals for a good fit



Residuals for a poor fit



カインेटクス解析 各種パラメータ

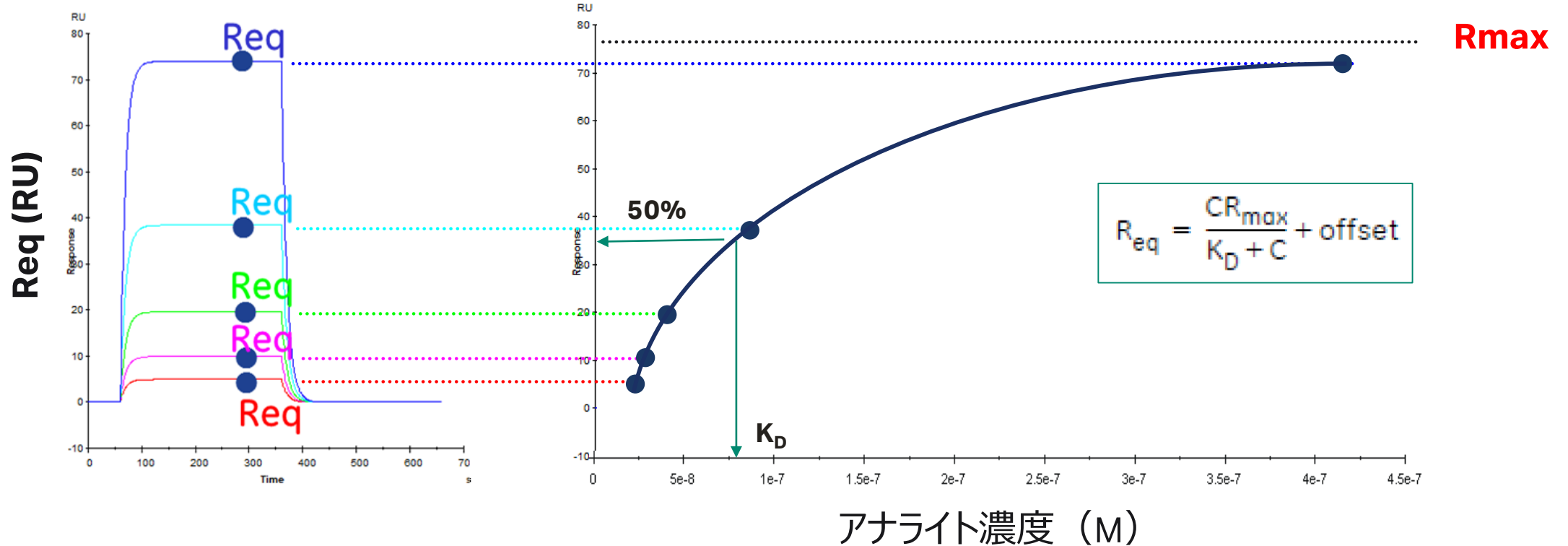
1:1 binding model 式の変数

Fittingやその解に対する 評価パラメーター

	結合速度定数 k_a	解離速度定数 k_d	解離定数 K_D	Rmax	溶媒効果 RI	tc値	カイ二乗 Chi ²	U-value	標準誤差 SE
単位	1/Ms	1/s	M	RU	RU	RU·M-1s ^{-2/3} m ⁻¹	RU ²	-	-
説明	複合体形成速度。 1MのAとBを混合した際に形成する複合体の数。	複合体の安定性。 複合体が1秒間に解離する割合。 $k_d = 0.01 \text{ s}^{-1} = 1\%$ 1秒当たり複合体が1%解離する。	アフィニティーは平衡状態においてどれだけの複合体が形成されているかを表す。	アナライトの最大結合力。	バルクレスポンスを引いた時に、ゼロからわずかにずれる誤差値。 (本来は極めて0に近い値をとるべき値)	tc=kt ³ √f マストランスポート (MTL) 定数 (kt) の流速非依存性コンポーネント * どれだけMTLが強くなっているかと算出しているかの指標。この値が小さい場合、センサーチップ表面に到達するアナライトの実際の濃度は低くなっていると計算されている。	測定データフィッティングカーブ間の差を示す。	ka, kd 値が独立して (Uniqueness) 算出されているかの指標 ≥25算出された値の信頼性は低い。 * 既存の 1:1 Binding モデル使用時のみ	各パラメータについて SEを算出。各パラメータの解析結果に対して、10%以下で一般的には問題ないと判定されることが多い。

アフィニティー解析を利用した解離定数の算出

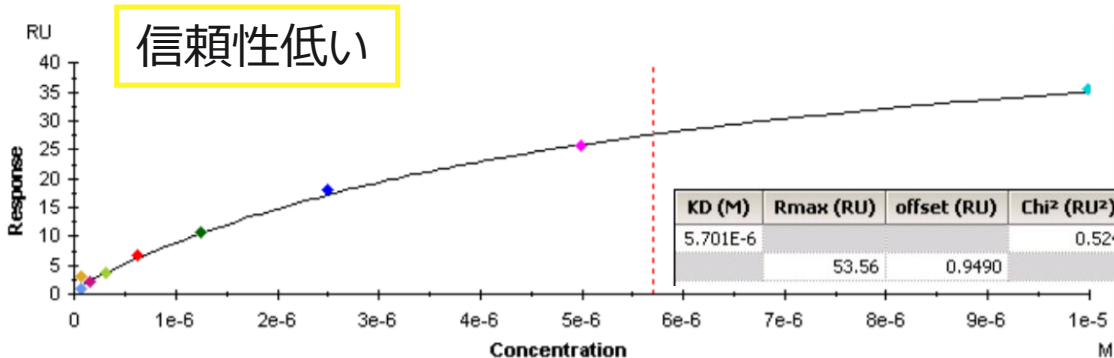
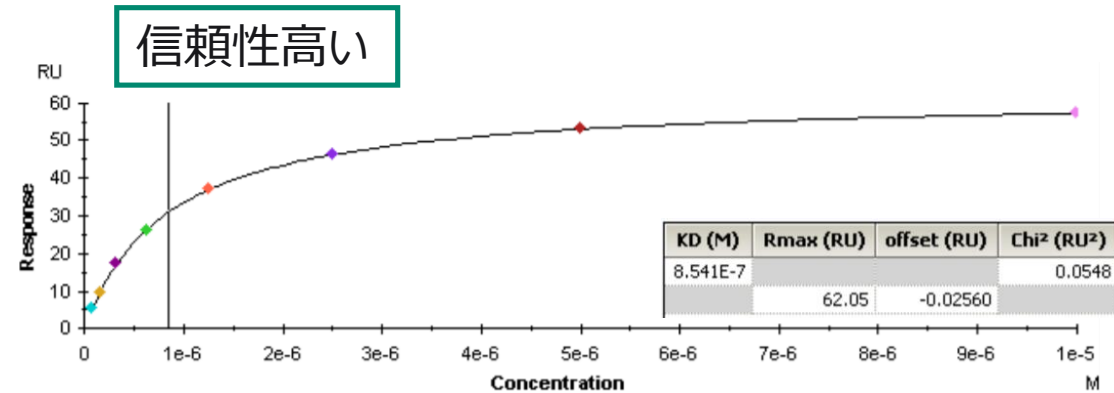
Fit to model $A + B \rightleftharpoons AB$ at Steady State Affinity



アフィニティー解析 クォリティーコントロール 各種パラメータ

クォリティーコントロール

平衡値解析において、信頼性の高い解析結果を得るためには、解析結果の K_D 値がアナライトのもっとも高濃度の $1/2$ 以下の濃度であることが必要。



Cytiva

1:1 binding model 式の変数

Fitting やその解
に対する評価
パラメーター

	解離定数 K_D	Rmax	Offset	カイニ乗 Chi^2
単位	M	RU	RU	RU^2
説明	アフィニティーは平衡状態においてどれだけの複合体が形成されているかを表す。	アナライトの最大結合量。実際にアナライ添加した時、結合量が飽和するレスポンス。	X = 0 の時のY軸の値	測定データとフィッティングカーブ間の差を示す。

数値 (K_D 、 k_a 、 k_d など) を採用するまでの考え方

測定者が研究の目的上許容する数値の誤差範囲を設定する



得られたセンサーグラムが本来検出したい相互作用を反映しているかを確認する。

- ・上述の特異的結合の確認など



ソフトウェアのフィッティング結果の目視や得られる各種評価パラメーターなどから総合的に得られた数値が許容する誤差範囲に十分入っている可能性が高いかどうかを判断する。

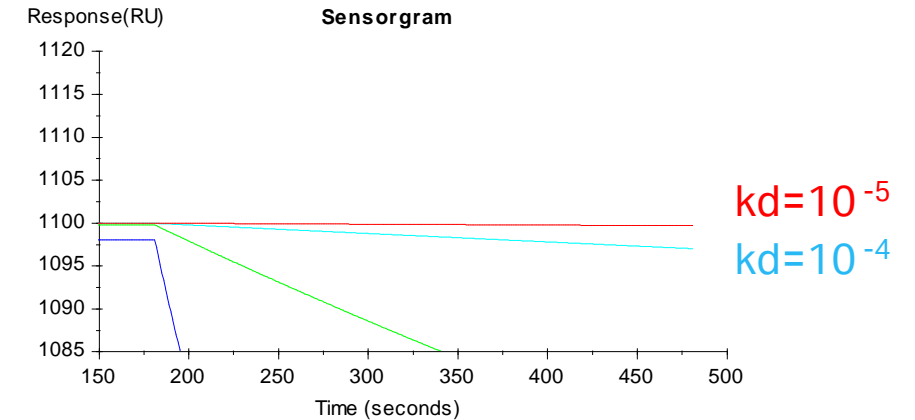
- ・以降のスライドで、この判断への勘所をお伝えします。

各種評価パラメータの見方、考え方

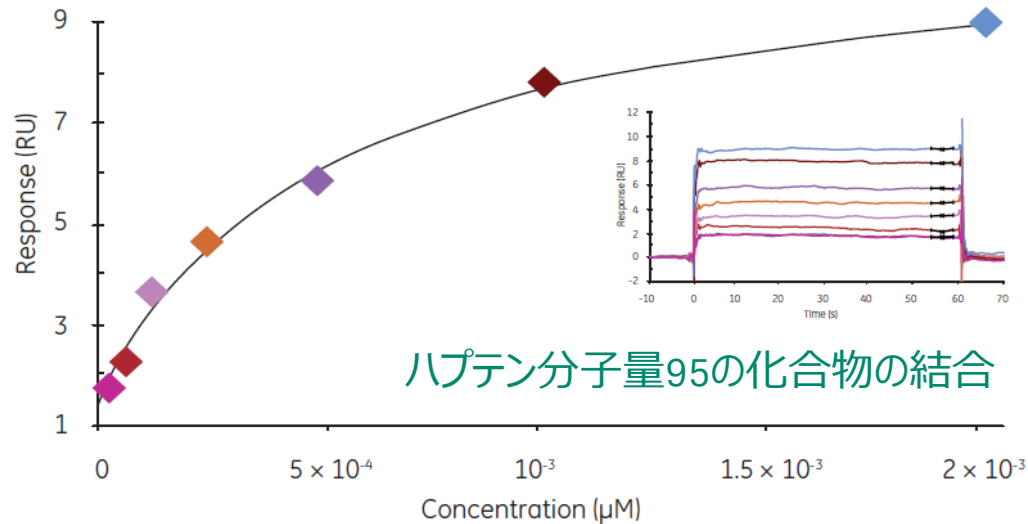
Chi²値

測定データが、フィッティングカーブに対してどの程度ズれているか？
値が小さいほど望ましいが、いくつ以下ならばOKという基準はない

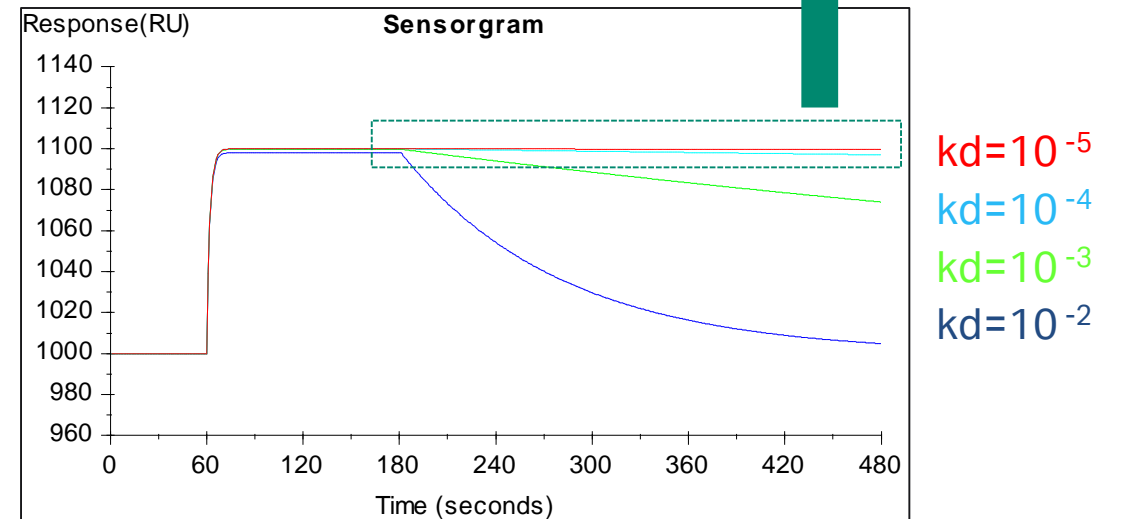
Chi²の絶対値が小さくても、KD値などの値の誤差が大きくなる傾向があるデータ例



1. Rmaxの小さいサンプル (低分子)



2. 解離の遅いサンプル (抗体)



各種評価パラメータの見方、考え方

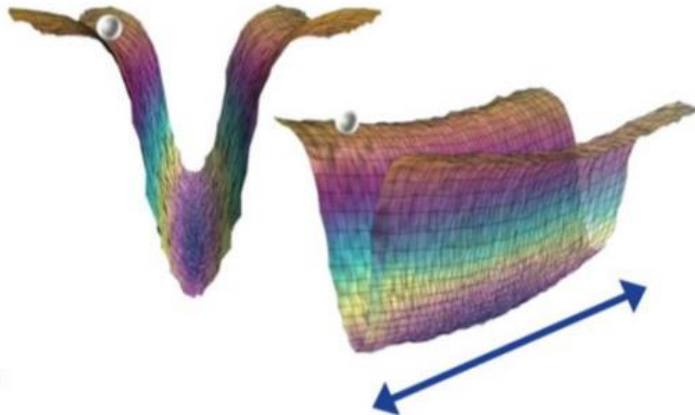
SE値

Chi²値が最も小さくなるようにFittingされた際に取りうる各値（ k_a , k_d など）の誤差範囲。

Biacoreの算出するSE値は、反復試験を実施した際の誤差ではありません。

Chi²値とSE値の間に相関はありません。

Chi²値が大きい場合でも、その際に取りうる誤差範囲を算出します。



SE値（標準誤差）のイメージ

SE値が小さい：窪みが非常に鋭く深い

SE値が大きい：窪みの幅が広い

窪みの幅が広い = 取り得る解の幅が広い。

⇒ 算出された解にほとんど意味がない。

各種評価パラメータの見方、考え方

RI

アナライトインジェクション前後での“段差”のパラメーター

ダブルサブトラクションをしたデータでは本来ほぼ0になるはず。

右センサーグラムへの解釈

・解離相に着目すると、**生データ**は瞬間的な“段差”ではなく二相性の解離速度を示している。

↓

フィッティング計算上単純にChi²を小さくするためにRI=33.1と大きな値を取っているが、実際の相互作用を正しく反映したフィッティングではない。

↓

・サンプルの相互作用様式が1:2などであることが分かっている

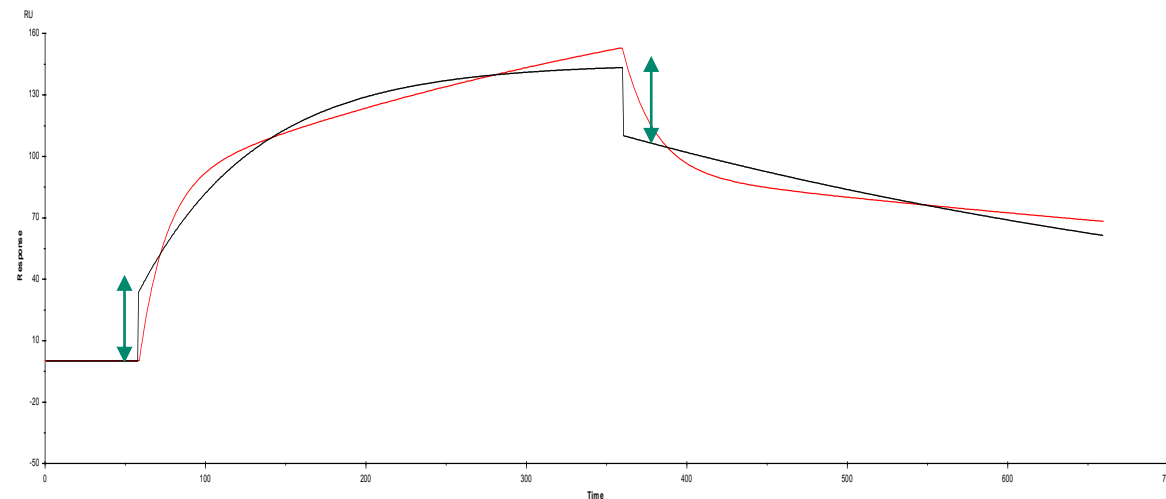
→Bivalent analyte モデルを用いる。

・サンプルの品質の問題などでリガンド、アナライトが不均一な成分になっている。

→サンプルの調製法を改善する。

・非特異的結合成分が混ざっている

→サンプルの調製法を改善する。固定化・バッファー条件などを変更する。



ka (1/Ms)	kd (1/s)	Rmax (RU)	RI (RU)
1.17e5	1.95e-3	131	33.1

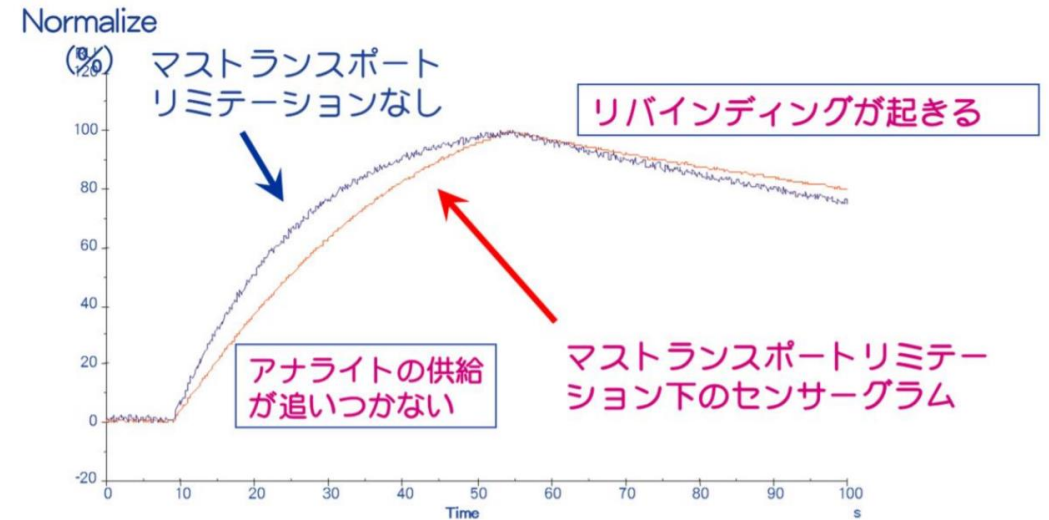


各種評価パラメータの見方、考え方

U-Value

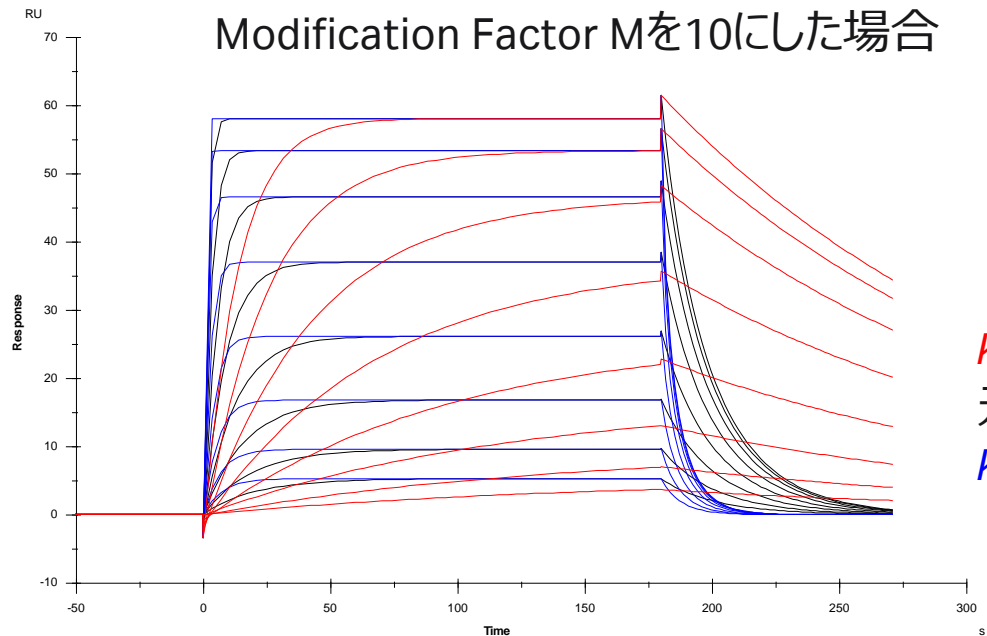
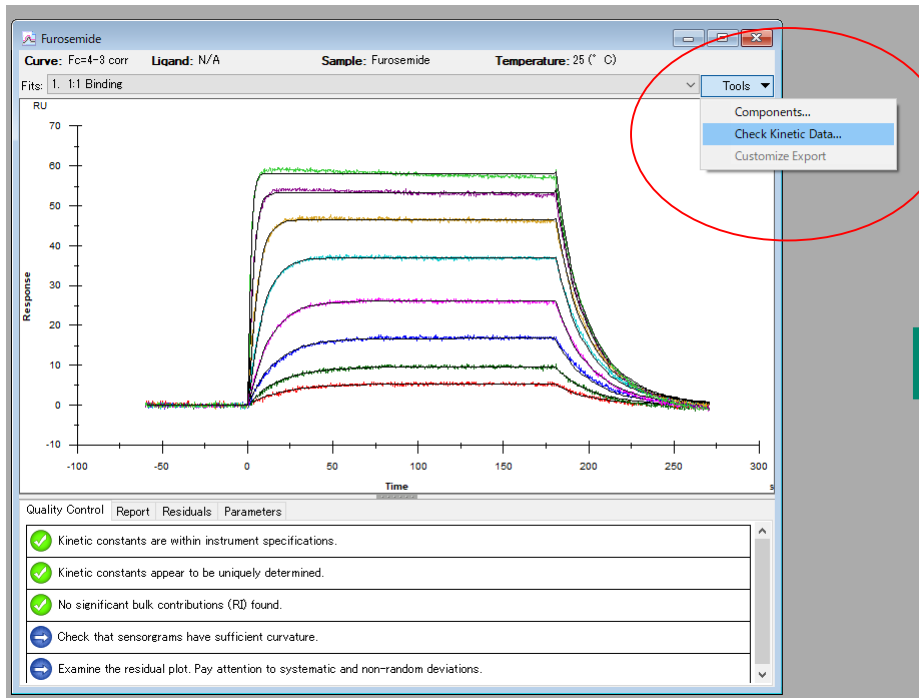
ka, kd 値が独立して (Uniqueness) 算出されているかの指標
小さい値の方が良い
 ≥ 25 算出された値の信頼性は低い。
(弊社マニュアル上での基準)

- MTL環境下などで数値が大きくなる。
- QC tab中の
Kinetic constant appear to be uniquely determined
に関連する指標。



算出されたka、kdの誤差を視覚的に確認するツール (Biacore T200, S200)

Tools > Check Kinetics Data



$k_a, k_d \times 10$
元のフィッティング
 $k_a, k_d \times 1/10$

単位時間あたりレスポンス変化量

$$dR/dt = f(R_{max}, k_a, k_d, tc)$$

例えばMTL環境ではセンサーグラム形状はアナライトの拡散現象 (tc で数値化される) により大きく依存し、 k_a, k_d 値には依存しない環境といえる。このことは逆に言うと、フィッティング結果の k_a, k_d から10倍・1/10倍に変更してセンサーグラムを再描画したとしても、両者の形状の差が小さい、ということの意味する。

Biacoreシリーズ

8本のニードルにより高品質測定データを短時間で

- 最大で、スクリーニング：2,300サンプルを1日、キャラクタライズ：64相互作用を4時間で処理
- 1サンプルの K_D 値を出すのに条件検討も含めて35分（2Dカインेटクス）
- 実験条件から数値データ、画像までを表計算ソフトへ一括Exportでき、レポートの負担を軽減



Biacore 8K/8K+

基礎研究から医薬品探索・品質管理まですべてに

- カインेटクス解析から、濃度測定、同等性評価まで1台でカバー
- 研究目的が多岐に渡るラボや、複数の研究者で使用する場合に
- 医薬品の特性解析、品質管理、プロセス開発をサポートするGxPパッケージ（オプション）



Biacore T200

低分子創薬に

- シリーズ最高感度
- フラグメントスクリーニングも効率化：384サンプルを最大16時間で測定、特化した解析ソフトを搭載
- 高難度標的分子の解析に



Biacore S200

小スケールの相互作用解析に

- Biacoreのデータ品質を備えたコンパクトモデル
- はじめてカインेटクス解析を行う方
- 少サンプルをじっくり評価したい方
- 濃度測定、低分子にも対応（Plus Packageのみ）



Biacore X100

【お問合せ先】

グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン株式会社

バイオダイレクトライン 内線#2をご選択ください

TEL: 03-5331-9336 / FAX: 03-5331-9370

e-mail: Tech-JP@cytiva.com

www.cytivalifesciences.co.jp

本資料の使用については、お客様施設内での使用に限ります。他社への転送、譲渡等は禁じます。本資料の著作権その他の知的財産権は、グローバルライフサイエンステクノロジーズジャパン株式会社に帰属します。無断転載、無断コピー、改ざん、二次利用を禁じます。

掲載されている価格は2020年5月現在の希望小売価格です（消費税は含まれておりません）。希望小売価格は単なる参考価格であり、弊社販売代理店が自主的に設定する販売価格を何ら拘束するものではありません。掲載されている製品は試験研究用以外には使用しないでください。掲載されている内容は予告なく変更される場合がありますのであらかじめご了承ください。掲載されている社名や製品名は、各社の商標または登録商標です。お問合せに際してお客さまよりいただいた情報は、お客さまへの回答、弊社サービスの向上、弊社からのご連絡のために利用させていただく場合があります。

弊社は、資料の掲載内容の正確性を記すべく、情報を随時更新しておりますが全ての情報が最新であることを保証するものではありません。

したがって、当資料上の掲載内容に誤りがあった場合でも弊社は責任を負いかねます。