

## Cellular Analysis Application Note No. 1

## HeLa細胞における カパーゼ-8の過剰発現に よるアポトーシス効果を 測定するためのワークフロー

Sandra Ussat, Gudrun Scherer and Sabine Adam

Institute of Immunology, University Hospital Schleswig-Holstein, Campus Kiel, Michaelisstrasse 5, Kiel, Germany

Sabine Adam



### 1 イントロダクション

プログラムされた細胞死であるアポトーシスは、相互作用を行う細胞成分の多数のコンプレックスが関与しています。これらの成分の顕著なものは、高度に保存されたプロテアーゼであるカパーゼファミリーです。

カパーゼはアポトーシスの開始と実行に関与しています(1)。それらはイニシエーターカパーゼ(ほ乳類ではカパーゼ-2、-8、-9、および-10)とエフェクターカパーゼ(ほ乳類ではカパーゼ-3、-6、-7)の2つのサブグループに分類されます(2)。これらのプロテアーゼは不活性化酵素前駆体として合成され、環境条件の変化に反応して選択的に活性化されます。特に興味深いのはイニシエーターカパーゼであるカパーゼ-8の活性化です。活性化カパーゼ-8はエフェクターカパーゼであるカパーゼ-3を切断、活性化し、細胞死における最終段階までのイベントカスケードを開始します(3)。

この研究では、カパーゼ-8のみの過剰発現が、HeLa細胞におけるアポトーシスを誘導するのに十分であることを支持するために、*in vitro* 及び *in vivo* アッセイを含むワークフローを使用しています。

## 2 方法

### 1. カスパーゼ-8 発現プラスミドの調製とトランスフェクション

#### A) プラスミドの調製

真核細胞発現ベクターpRK5 (BD Biosciences)、pRK-GFP (pRK5にクローン化されたEGFP (enhanced Green Fluorescent Protein) を含む) およびpRK-Casp8 (pRK5にクローン化されたヒトカスパーゼ-8遺伝子を含む) は、Genopureプラスミドマキシキット (ロシュ) を使用して*E. coli* XL1-Blueから精製しました。3 mlのLB培地を含む3つのバイアルに、それぞれのプラスミドを含むXL1-Blueの100 $\mu$ l凍結グリセロールストックを接種し、8時間の激しい振とうによって37 $^{\circ}$ Cで増殖しました。200mlのLB培地に各々の3mlのプレカルチャーを接種し、激しい振とうによって37 $^{\circ}$ Cでオーバーナイトインキュベートしました。Genopureマニュアルの記述どおりに、DNA調製を実施しました。収量は、280 $\mu$ g (pRK)、860 $\mu$ g (pRK-GFP) および480 $\mu$ g (pRK-Casp8) でした。

#### B) 細胞培養と FuGENE<sup>®</sup> HD トランスフェクション試薬

HeLa細胞 (ATCC<sup>®</sup> CCL-2<sup>TM</sup>) を、10%ウシ胎児血清、10mMグルタミン、ストレプトマイシンおよびペニシリンをそれぞれ50 $\mu$ g/mlずつ添加したDMEM (HEPES不含) で増殖しました。トランスフェクションの24時間前、細胞をトリプシン処理し、1ウェル当たり $2 \times 10^5$ 個の細胞密度で6-ウェルプレートに播種しました。各ウェルについては、2 $\mu$ gの発現ベクターpRK5 (BD Biosciences)、pRK-Casp8 (pRK5にクローン化したヒトカスパーゼ-8遺伝子を有する)、またpRK-GFP (pRK5にクローン化したEGFPを有する) を、100 $\mu$ lのOpti-MEMと混ぜ、次に6 $\mu$ lのFuGENE<sup>®</sup> HDトランスフェクション試薬 (ロシュ) を添加しました。室温で15分のインキュベーション後、トランスフェクション混合液を培地に滴下し、細胞を37 $^{\circ}$ Cおよび5%のCO<sub>2</sub>条件下で最大48時間インキュベートしました。

### 2. トランスフェクション後の遺伝子発現の確認

#### A) フローサイトメトリーによる GFP のトランスフェクション効率の推計

トランスフェクションの48時間後、pRK-GFPを導入した細胞をトリプシンを使用して分離し、一度PBSで洗浄し、200 $\mu$ lのPBSに再懸濁しました。コントロールとしてpRK5を導入した細胞の処理を並行して行いました。GFP陽性細胞は488nmレーザーおよびFL1チャンネルを利用し、FACSCalibur<sup>TM</sup>フローサイトメーター (BD Biosciences) で分析しました。

#### B) ウェスタンブロットティングによるカスパーゼ-8 の過剰発現の検出

pRK-Casp8でトランスフェクションしたHeLa細胞 (ATCC<sup>®</sup> CCL-2<sup>TM</sup>) を、トランスフェクションから24時間後にトリプシン処理により分離し、PBSで一度洗浄し、200 $\mu$ lのcComplete Lysis-M Buffer (ロシュ) に再懸濁しました。コントロールの目的で、トランスフェクションしていない細胞とpRK5を導入した細胞の処理を並行して行いました。遠心分離により細胞残渣を沈殿させた後 (5分間、14,000rpm、4 $^{\circ}$ C)、クマシーブルーを用いてタンパク質濃度を測定しました。

各サンプルで、20 $\mu$ gのタンパク質が15%のSDS-PAGEゲルで分離され、ニトロセルロース膜に転写されました。ブロッキングし、PBSで3度洗浄した後、5%BSA添加PBSで1:1000に希釈したモノクロナールマウス-カスパーゼ-8-抗体 (Cell Signaling Technologies)中でニトロセルロース膜を3日間、4 $^{\circ}$ Cでインキュベートしました。3回洗浄した後、5%BSA添加PBS中のPOD標識ラビット抗マウス抗体 (濃度0.008g/ml) で常温にて1時間ニトロセルロース膜をインキュベートしました。5回洗浄後、Lumi-Light<sup>PLUS</sup>のマニュアルに従い、Lumi-Light<sup>PLUS</sup>ウェスタンブロットティング試薬 (ロシュ) でのインキュベーション、及びそれに続く写真フィルムへの露光により、結合した2次抗体が検出されました。

### 3. カスパーゼ-8 発現プラスミドをトランスフェクションされた HeLa 細胞における代謝変化のアッセイ

#### A) WST-1 による細胞代謝の測定

HeLa細胞 (1×10<sup>4</sup>個/ウェル) を96-ウェルプレートに播種しました。3個のウェルはコントロールとしてトランスフェクションせず、3種類の発現ベクター (pRK5、pRK-GFPおよびpRK-Casp8; 0.1μgプラスミドと0.25μlのFuGENE® HD トランスフェクション試薬)の各々について、3ウェルずつトランスフェクションしました。トランスフェクションの4、24および48時間後に、10μlの細胞増殖試薬WST-1(ロシュ)を各ウェルに添加しました。37℃で60分間インキュベートした後、生成したWST-1ホルマゼンを分光光度計によって定量しました。

#### B) カスパーゼ-3 アッセイ

pRK-Casp8でトランスフェクションしたHeLa細胞を24時間増殖し、細胞にトリプシン処理を行い、PBSで1度洗浄し、カスパーゼ-3活性アッセイキット (ロシュ) に含まれる200μlのライシスバッファーに再懸濁しました。コントロールの目的で、トランスフェクションしていない細胞とpRK5を導入した細胞の処理を並行して行いました。クマシーブルーを用いてタンパク質濃度を測定した後、キットのマニュアル記述どおりに、各サンプルからタンパク質250μgを使用してカスパーゼ-3活性を分析しました。陽性コントロールライセートと2種類の希釈度のAFC (アッセイ蛍光産物) -溶液 (いずれもキット付属)も、コントロールとして使用しました。

**図1:** HeLa細胞におけるカスパーゼ-8の過剰発現によるアポトーシス効果を測定するためのワークフロー。

カスパーゼ-8発現プラスミドがHeLa細胞に導入されたとき、何が起きているかを測定するための各ステップのスキーム。

### 4. カスパーゼ-8 発現プラスミドをトランスフェクションされた HeLa 細胞におけるアポトーシスアッセイ

#### A) アネキシン V-Alexa™ 568 によるアポトーシスのフローサイトメトリー検出

pRK5とpRK-Casp8でトランスフェクションしたHeLa細胞を48時間増殖し、トリプシン処理により分離しました。PBSで1度洗浄し、100μlのアネキシンV-Alexa 568 (ロシュ) のマニュアル記載どおりに調製した、インキュベーションバッファー (Hepes-NaCl-CaCl<sub>2</sub>) に再懸濁しました。2μlのアネキシンV-Alexa 568を添加した後、FACSCalibur™ フローサイトメーターで488nmのレーザーおよびFL3チャンネルを使用し、細胞染色を分析しました。

#### B) xCELLigenceシステムによるアポトーシス誘導のリアルタイムモニタリング

約4,000個のHeLa細胞をE-プレート96の各ウェルに播種しました。プレートをxCELLigenceリアルタイムセルアナライザー (RTCA) SPインスツルメント (ロシュ) にセットし、細胞を5% CO<sub>2</sub>存在下、37℃で26時間増殖しました。細胞を、WST-1アッセイ (セクション3.A参照) で記述したように、3種類の発現ベクター (pRK5、pRK-GFPおよびpRK-Casp8) の各々について、E-プレート96中で直接トランスフェクションし、さらに48時間インキュベートしました。細胞のインピーダンス測定は15分毎に72時間行いました。結果として得られる値のセルインデックス (CI) はRTCAソフトウェアを用いて得られました (図1)。

カスパーゼ-8をpRK5にクローニングし、*E. coli* XL1-Blue中でプラスミドを増幅

バクテリアからのカスパーゼ-8発現プラスミド (pRK-Casp8) の精製 – Genopureプラスミドマキシキット

HeLa細胞へのpRK-Casp8のトランスフェクション – FuGENE® HD トランスフェクション試薬

トランスフェクションされた遺伝子の発現確認 – コンプリートライシスM、Lumi-Light<sup>PLUS</sup> ウェスタンブロットング基質

トランスフェクション細胞の代謝変化のモニタリング – 細胞増殖試薬WST-1、カスパーゼ3活性アッセイキット

エンドポイントと動的アッセイを用いたトランスフェクション細胞のアポトーシスによる変化のモニタリング – アネキシンV-Alexa 568とxCELLigenceシステム

### 3 結果

#### 1. FuGENE® HD トランスフェクション試薬を用いた HeLa細胞へのヒトカパーゼ-8遺伝子の効率的な導入

EGFP (pRK-GFP) あるいはカパーゼ-8 (pRK-Casp8) 遺伝子を持つ発現プラスミドを、Genopureプラスミドマキシキットを使用し、FuGENE® HDトランスフェクション試薬で HeLa細胞にトランスフェクションしました。

トランスフェクション効率を推計するために、pRK-GFPトランスフェクション細胞をFACSで分析しました (図2)。トランスフェクションの48時間後、トランスフェクション細胞の88%以上がGFP陽性でした。

トランスフェクションの成功とカパーゼ-8の活性化はウェスタンブロットングで確認しました (図3)。未トランスフェクション細胞とpRK5をトランスフェクションされた細胞では、内在性の2つのスプライズバリエーションである不活性化のカパーゼ-8 (分子量、約55kDa) が観察されました。カパーゼ-8の活性化によって、通常検出される分解産物は全く見られませんでした。pRK-Casp8でトランスフェクトした細胞では、内在性のものより少しサイズの大きなタンパク質も検出され、トランスフェクションした (FLAG® ペプチド標識された) カパーゼ-8の推定サイズと一致していました。より重要なことには、43kDaおよび18kDaのバンドが非常に強く見られました。カパーゼ-8のこれら (43および18kDa) の分解産物は、カパーゼ-8が過剰発現によって活性化されたことを示しています。

これらの結果は、FuGENE® HDトランスフェクション試薬が、EGFPやカパーゼ-8発現ベクターをHeLa細胞へ高い効率で導入できることを示唆しています。それ以上に、ウェスタンブロットングによる知見は、カパーゼ-8がトランスフェクション細胞内で活性化されたことを示唆しています。活性化産物の量は、トランスフェクション細胞中のカパーゼ-8の過剰発現と矛盾していませんでした。

#### 2. ヒトカパーゼ-8遺伝子の導入後のHeLa細胞における代謝変化の証明

カパーゼ-8遺伝子の過剰発現により引き起こされる代謝変化を検出するために、2種類のキットを使用しました。

HeLa細胞のトータルの代謝活性をWST-1で測定し (図4)、生細胞での解糖の代謝活性を間接的にモニターしました。このアッセイでは、トランスフェクションの24時間及び48時間後において、pRK5をトランスフェクションされた細胞は、未トランスフェクション細胞より僅かに代謝活性が低くなっており、トランスフェクション操作により代謝活性が僅かに減少させられることを示唆しています。しかしながら、pRK-Casp8をトランスフェクションされた細胞は、トランスフェクションの48時間後に代謝活性を大きく減少させていました。これらのアッセイは、カパーゼ-8の過剰発現が HeLa細胞の代謝を劇的に減少させることを示唆しています。

カパーゼ-8はカパーゼ-3の能動的活性化酵素であるため、細胞中のカパーゼ-3のレベルをカパーゼ3活性アッセイキットで測定しました (図5)。pRK-Casp8をトランスフェクションされた HeLa細胞のライセートは、高いカパーゼ-3活性を含んでいました。それに対して、未トランスフェクション細胞とpRK5をトランスフェクションされた細胞は、活性化されたカパーゼ-3が実質的には見られませんでした。これは、他のアポトーシス誘導試薬を添加することなく、カパーゼ-8のみの過剰発現によって、カパーゼ-3を活性化することを示唆しています。

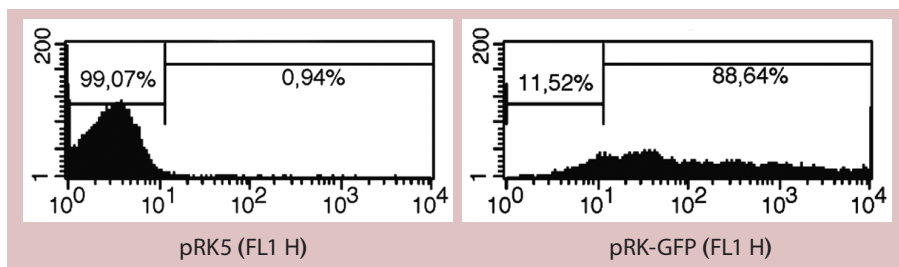
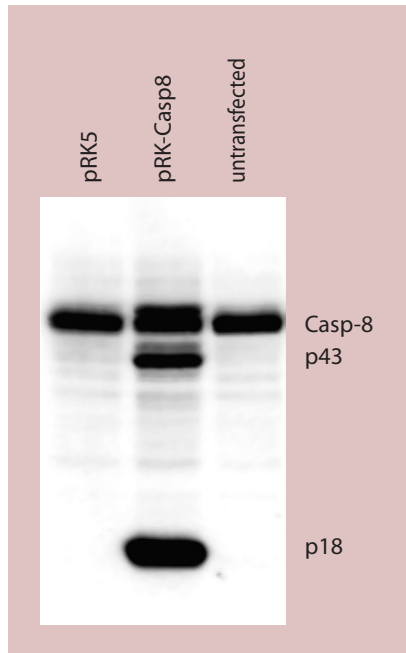
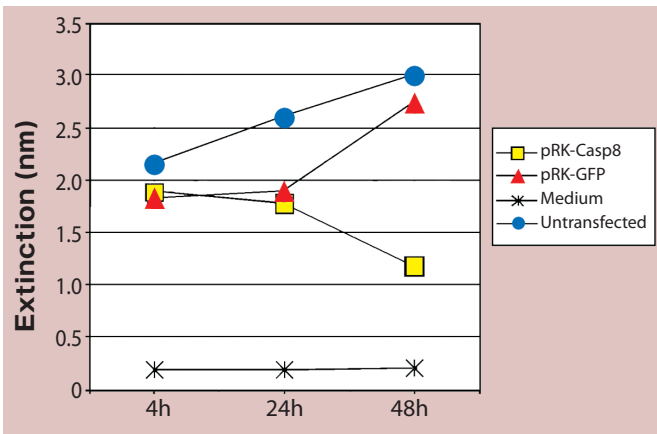


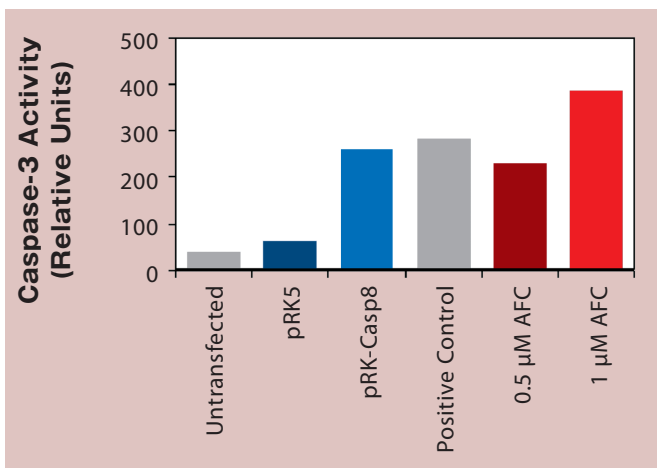
図2: トランスフェクション効率の推計。pRK-GFPトランスフェクション細胞をFACSで分析しました。pRK5のみを含む細胞をコントロールとして使用しました。pRK-GFPトランスフェクション細胞の88%以上が検出可能なレベルでした (エミッションピーク、509nm)。



**図3**：様々なベクターをトランスフェクションしたHeLa細胞のウェスタンブロットによる比較。pRK5やpRK-Casp8をトランスフェクションしたHeLa細胞からタンパク質を調製し、SDS-PAGEで分離し、ニトロセルロース膜に転写しました。ニトロセルロース膜上のカスパーゼ-8関連タンパク質を、抗カスパーゼ-8抗体とLumi-Light<sup>PLUS</sup>ウェスタンブロットング基質で可視化しました。内在性のカスパーゼ-8 (Casp8, 55kDa)は、発現プラスミドを含む2つの株と同様に、未トランスフェクション細胞でも可視化されました。pRK-Casp8トランスフェクション細胞のみが、pRK-Casp8により発現された僅かに大きいカスパーゼ-8タンパク質と、活性化されたカスパーゼ-8の特徴である2種類の切断産物を含んでいました。



**図4**：トランスフェクションされたHeLa細胞における代謝のWST-1アッセイ。トータル代謝活性をモニターするために、2種類のトランスフェクション細胞と未トランスフェクション細胞の培養液に細胞増殖試薬WST-1を添加しました。トランスフェクション後の各表示の時間で培養液を一部を取り出し、形成されたフォルマザン量を分光光度計で測定しました。測定した最後の時点(トランスフェクションの48時間後)で、pRK-Casp8をトランスフェクションされた細胞の代謝活性は、他の2つに比べて顕著に減少していました。

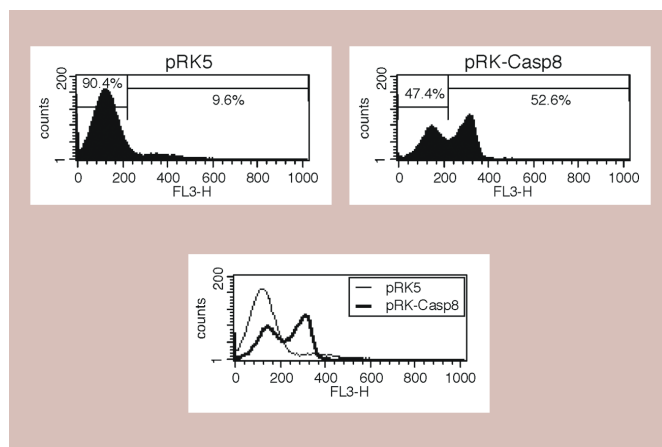


**図5**：トランスフェクションされたHeLa細胞中のカスパーゼ-3活性。pRK5やpRK-Casp8をトランスフェクションされたHeLa細胞を24時間インキュベートしました。細胞を溶解し、各サンプルから250μgのタンパク質をカスパーゼ-3活性アッセイに用いました。陽性コントロールライセートと2種類の希釈度のAFC(7-amido-4-trifluoromethylcoumarin)-溶液を、コントロールとして使用しました。トランスフェクションしなかった細胞や単なるベクターをトランスフェクションした細胞では、24時間後のカスパーゼ-3活性は非常に低いレベルでしたが、pRK-Casp8をトランスフェクションしたHeLa細胞では高いカスパーゼ-3活性を示しました。

### 3. ヒトカスパーゼ-8の過剰発現はHeLa細胞においてアポトーシスを誘導することの証拠

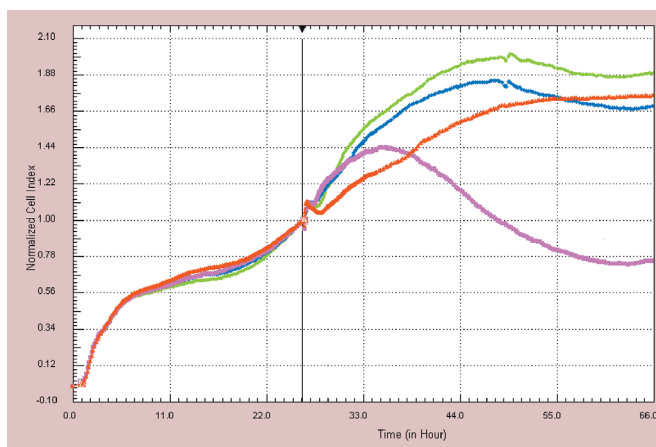
カスパーゼ-3活性の増加は、アポトーシスによる細胞死で終了する一連のイベントを開始させます。トランスフェクションされた細胞のアポトーシスの状態を測定するために、細胞膜の外層のホスファチジルセリン (PS) を検出する蛍光染色であるアネキシンV-Alexa 568に曝露しました。細胞膜を貫通してのPSの転座はアポトーシスの初期のイベントの一つで、アネキシンVの結合の増加は、細胞がアポトーシスの進行状態にあることを示唆します(4)。

pRK-Casp8をトランスフェクションされた細胞の50%以上が、アネキシン陽性で、トランスフェクションの48時間後に起こったアポトーシスに関連した変化を示唆していました(図6)。それに対し、コントロールとpRK5をトランスフェクションした細胞の10%以下がアネキシン陽性でした。



**図6:** アネキシンV-Alexa 568を用いたカスパーゼ-8発現ベクターをトランスフェクションした細胞における初期のアポトーシスのフローサイトメーターによる検出。HeLa細胞をpRK5とpRK-Casp8でトランスフェクションし、その後48時間インキュベートしました。細胞を洗浄し、細胞膜の外層のホスファチジルセリン (PS) を検出する蛍光染色である、アネキシンV-Alexa 568を含むバッファー中に再懸濁しました。染色された細胞をフローサイトメーターにより定量しました。pRK-Casp8でトランスフェクションされた細胞の約53%がアネキシン試薬で染色されましたが、pRK5をトランスフェクションした細胞の10%以下がアネキシン陽性でした。細胞膜を貫通してのPSの転座はアポトーシスの初期のイベントの一つでアネキシンV染色は、細胞がアポトーシス状態にあることを示唆します。

アポトーシスは長い時間かけて起こるため、エンドポイントアッセイではアポトーシスの全過程の完全な姿を捉えることができません。長期にわたるアポトーシスによる変化を調べるために、HeLa細胞と接触している微小電極を使用して、細胞のインピーダンスを連続的に測定する、xCELLigenceリアルタイムセルアナライザー (RTCA) システムにより、HeLa細胞のトランスフェクションの前後にわたり、連続的にモニタリングしました(図7)。これらの細胞のインピーダンスの変化は、セルインデックス (CI) ユニットで表現されます。CI値は細胞数や接着性の変化と直接的に相関します(5)。CI値の減少は細胞死の指標となり(6)、これを用いることで、アポトーシスの進行を測定します。他のトランスフェクションに対して、pRK-Casp8をトランスフェクションされた細胞は、トランスフェクションの12時間後という初期にCI値の減少を示しました。この減少は72時間のモニタリングの間、続きました。



**図7:** カスパーゼ-8発現ベクターをトランスフェクションした細胞におけるアポトーシス誘導のリアルタイム分析。3種類の発現ベクター (pRK5、pRK-GFP、pRK-Casp8) の各々を用いてトランスフェクションされたHeLa細胞を、xCELLigence SP インストルメントを使用して、トランスフェクションの前後にわたり連続的にモニターしました。コントロールとして未トランスフェクション細胞も実験の間モニターしました。pRK-Casp8をトランスフェクションされた細胞は、トランスフェクションの12時間後にCI値の減少を示し始めました。それに対して、コントロールベクターであるpRK5、pRK-GFPがトランスフェクションされた細胞のCIはモニターしている間 (トランスフェクション後46時間まで)、未トランスフェクションコントロール細胞と同様でした。CIの減少は細胞数の減少と強く相関します。

## 4 結論

この研究の目的は、HeLa細胞でのカスパーゼ-8過剰発現の効果を分析するための簡便に実行できるワークフローをデザインすることでした。ここに見られるように、カスパーゼ-8の過剰発現のみで、HeLa細胞にアポトーシスを誘導するのに充分であることを示すことができました。この効果は、カスパーゼ-8遺伝子が導入された後に、早くも24時間後に明瞭に観察されました。

基本的に、この同じワークフローは、他のアポトーシス関連遺伝子の過剰発現の効果をモニターすることにも使用できます。より重要なことは、このワークフローの多数のステップは他の多くの複雑な細胞プロセスにも適用できることです。

本件では、FuGene® HDトランスフェクション試薬は、様々なタイプの真核細胞への効率的な遺伝子導入に使用されました。これらは高い細胞生存を可能にするほど穏やかで、トランスフェクション後のタンパク質生産も高いレベルでした。

細胞増殖試薬WST-1は細胞数が少ない場合でも、培養細胞中の代謝的に活性のある細胞数を容易に測定できます。それゆえ、細胞増殖、細胞生存活性、化学物質や細胞を介する細胞障害性等の、高感度なNon-RIのモニタリングに適用できるでしょう。

xCELLigenceシステムはロースルーブット(RTCA DP インストルメント、3×16ウェルプレート)、ミディアムスルーブット(RTCA SP インストルメント、1×96ウェルプレート)、ハイスルーブット(RTCA MP インストルメント、6×96ウェルプレート)の3種類の機種により構成されています。これらの全自動で、インピーダンスに基づくバイオセンサーは、細胞増殖、細胞死、細胞障害効果、細胞接着、細胞表面レセプターの活性化を含む、細胞をベースとするアッセイの検証に有用です。細胞標識や他の侵襲的な操作を必要とせず、リアルタイムで細胞変化のモニタリングが可能となり、*in vitro*実験の間の顕著な細胞応答が起きる時間をピンポイントで決定できます。

## 5 リファレンス

1. Earnshaw, W.C., L.M. Martins, and S.H. Kaufmann(1999). Mammalian Caspases: Structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev. Biochem.* **68**, 383-424.
2. Riedl, S.J. and Y. Shi (2004). Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 897-907.
3. Kumar, S. (2007). Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Diff.* **14**, 32-43.
4. Homburg, C.M., M. de Haas, A.E. von dem Borne, A.J. Verhoeven, C.P. Reutlingsperger, and D. Roos(1995). Human neutrophils lose their surface Fcγ3 and acquire Annexin V binding sites during apoptosis *in vitro*. *Blood* **85**, 532-540.
5. Abassi, Y.A. and J.A. Jackson (2008). Real-time and dynamic monitoring of cell proliferation and viability for adherent cells. *xCELLigence App. Note* **1**, 1-5.
6. Glamann, J. and A.J. Hansen (2006). Dynamic measurement of natural killer cell-mediated cytotoxicity and cell adhesion by electrical impedance measurements. *ASSAY Drug Dev. Tech.* **4**, 555-563.

略語：AFC, 7-amido-4-trifluoromethylcoumarin; EGFP, enhanced Green Fluorescent Protein.

## Ordering Information

製品名	製品番号	包装単位	希望販売価格(税抜)
Genopure Plasmid Maxi Kit	3 143 422	1キット(10回)	¥18,900
FuGENE® HD Transfection Reagent	4 709 691	0.4ml	¥29,800
	4 709 705	1.0ml	¥62,800
	4 709 713	5 × 1ml	¥252,000
cComplete Lysis-M	4 719 956	1キット	¥41,800
cComplete Lysis-M, EDTA-free	4 719 964	1キット	¥41,800
Lumi-Light <sup>PLUS</sup> Western Blotting Substrate	2 015 196	100ml(1,000cm <sup>2</sup> メンブレン)	¥50,600
Cell Proliferation Reagent WST-1	5 015 944	8ml	¥15,000
	1 644 807	25ml(2,500回)	¥39,000
Caspase 3 Activity Assay	2 012 952	1キット(96回)	¥108,300
Annexin-V-Alexa 568	3 703 126	500µl(250回)	¥84,600
RTCA SP Instrument	5 229 057	1台	ご照会

For life science research only.

GENOPURE, COMPLETE, and XCELLIGENCE are trademarks of Roche.

ALEXA 568 is a trademark of Molecular Probes Inc., USA.

E-PLATE and ACEA BIOSCIENCES are registered trademarks of ACEA Biosciences, Inc. in the US.

BD FACSCalibur™ is a trademark of BD Biosciences Immunocytometry Systems.

FLAG is a registered trademark of Sigma-Aldrich Biotechnology LP and Sigma-Aldrich Co.

FuGENE is a registered trademark of Fugent L.L.C., USA.

The ATCC trademark and trade name and any and all ATCC catalog numbers are trademarks of the American Type Culture Collection.

Other brands or product names are trademarks of their respective holders.

**ATCC**® To ensure the quality of cells to be transfected, Roche recommends using freshly-obtained, low-passage cell lines from ATCC®. For more information, please visit and bookmark [www.atcc.org](http://www.atcc.org)



お問い合わせは…

**ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社**  
AS事業部 (研究用試薬・機器)

本社：〒105-0014 東京都港区芝2丁目6番1号  
TEL.03-5443-5287 FAX.03-5443-7098  
E-Mail: [tokyo.biochemicals@roche.com](mailto:tokyo.biochemicals@roche.com)  
U R L: <http://www.roche-biochem.jp>