

ibidiアプリケーションガイド

3D細胞培養

3D細胞培養	2
3D細胞培養用マトリックス	3
3D細胞培養アッセイ	4
スフェロイドとオルガノイドの培養	4
3Dマトリックス中の単一細胞	6
3Dにおける走化性および移動アッセイ	7
フロー培養を組み合わせた3D細胞培養	8
実験例	9
3Dマトリックス中の単一細胞観察	9
スフェロイド培養、オルガノイド培養	9
3D走化性実験	11

主要な出版物

P. Xu et al. Modulation of Intestinal Epithelial Permeability by Plasma from Patients with Crohn's Disease in a Three-dimensional Cell Culture Model. *Scientific Reports*, 2019, 10.1038/s41598-018-38322-8

[記事を読む](#)

E. Hoque Apu, S.U. Akram, J. Rissanen, H. Wan and T. Salo. Desmoglein 3 - Influence on oral carcinoma cell migration and invasion. *Experimental Cell Research*, 2018,

10.1016/j.yexcr.2018.06.037

[記事を読む](#)

M. Dietrich et al. Guiding 3D cell migration in deformed synthetic hydrogel microstructures. *Soft Matter*, 2018, 10.1039/C8SM00018B

[記事を読む](#)

H. Grobe, A. Wüstenhagen, C. Baarlink, R. Grosse and K. Grikscheit. A Rac1-FMN2 signaling module affects cell-cell contact formation independent of Cdc42 and membrane protrusions. *PloS one*, 2018, 10.1371/journal.pone.0194716

[記事を読む](#)

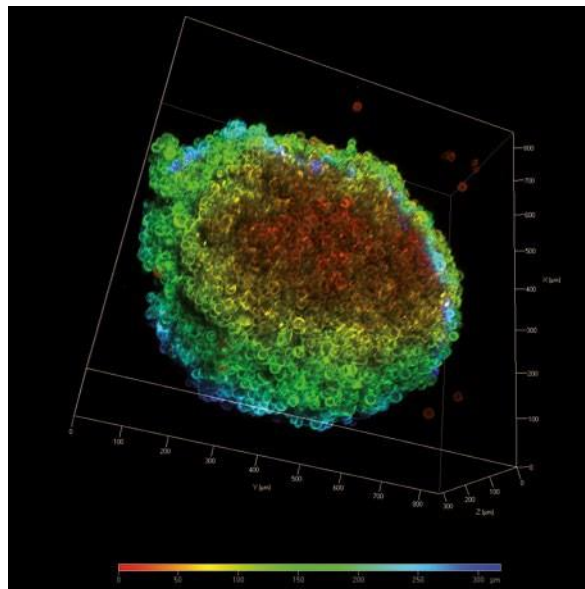
3D細胞培養

生きている組織の大部分の細胞は三次元的な微小環境で成長し、相互にそして周囲とコミュニケーションをとりながら機能します。動物細胞はプロテオグリカンと繊維状タンパク質(主にコラーゲン、エラスチン、フィブロネクチン)からなる細胞外マトリックス(ECM)に埋め込まれています。この複雑で動的な組織特異的3次元構造は、細胞に物理的な足場を与え、細胞の分化や行動に影響します。

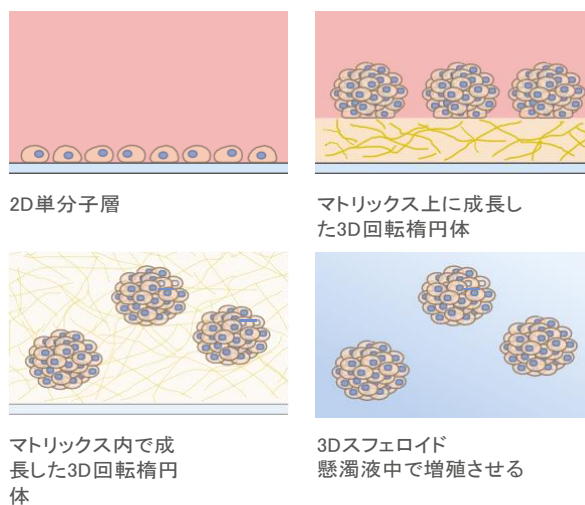
従来の二次元的なin vitro環境で培養すると、細胞は平面状(たとえば、標準的な細胞培養ディッシュの中の単層)に接着、増殖し、移動することができません。細胞を非接着性の表面上で浮遊培養するか、ECMを模倣した3Dマトリックス(マトリゲル®またはI型コラーゲンなど)中または上で培養するような三次元的in vitro環境の培養を3D細胞培養と言います。この3D細胞培養では、細胞は3次元的に移動、増殖できる場が与えられます。

3Dゲルマトリックス中の細胞は、2D環境と比較すると、異なった挙動を示します。細胞の挙動、分化、薬物治療への反応、遺伝子やタンパク質の発現などを解析する際には、このことを考慮すべきであり、多くの場合、3D環境ではin vivo環境に近い挙動を示すことが知られています。

多くの細胞で3D培養が利用が検討されており、その一例として、腫瘍モデルとして不可欠である[スフェロイド](#)や[オルガノイド](#)を使用した薬物スクリーニングなどがあります。



HT-1080 LifeActスフェロイドの共焦点レーザー走査顕微鏡を使用した三次元投影像
色は表面からの距離を示します。暖色=表面に近く、冷色=表面から遠く離れています



従来の2D単層と比較した3D細胞培養応用

Edmondson R, Broglie JJ, Adcock AF, Yang L (2014) 3次元細胞培養システムと創薬および細胞ベースのバイオセンサーへの応用アッセイ
ドラッグデブテクノル12(4):207-18.10.1089/adt.2014.573.

[記事を読む](#)

Frantz C, Stewart KM, Weaver VM (2010) 一見細胞外マトリックス。
J Cell Sci 123(Pt 24):4195-200.10.1242/jcs.023820.

[記事を読む](#)

3D細胞培養用マトリックス

現在、細胞を3D環境で培養するために様々なマトリックスが用意されています。それは天然タンパク質から合成されたものまで広範囲に及びます。適切なマトリックスの選択には、使用する細胞の種類や、固有の実験にも強く依存します。コラーゲンやフィブリンのような、高分子網目構造を水で膨潤するハイドロゲルと呼ばれるものがあります。このゲルは、実際の細胞外マトリックス(ECM)にみられるいくつかの特徴を再現しており、3D細胞培養実験の天然マトリックスの代わりとして用いられます。

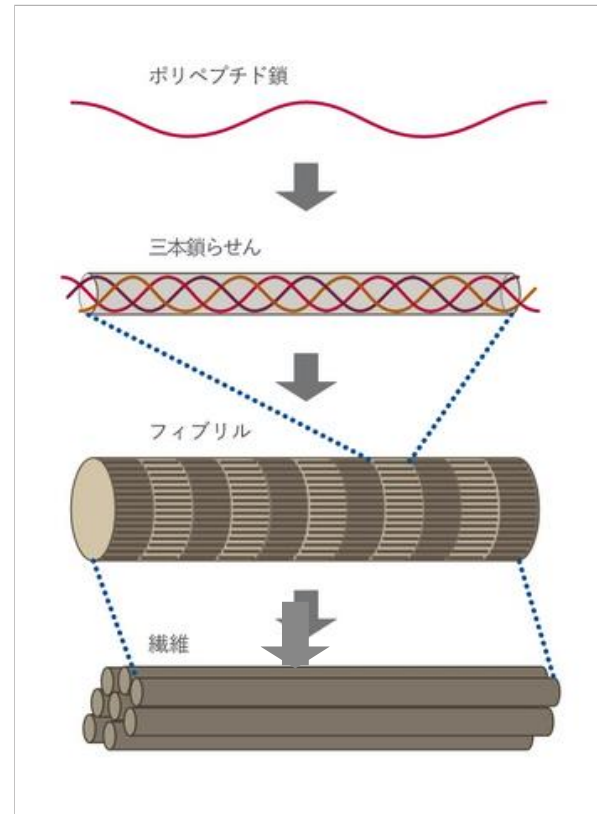
I型コラーゲンは結合組織の主成分であり、哺乳類の体内に豊富に存在します。繊維状タンパク質は3本の α 鎖からなり、これらが結合してロープ状の三重らせんを形成し、ECMに引っ張り強度を与えます。三重らせんは凝集し、自己組織化され原線維を形成します。in vivoでは、線維は重合して線維となり、腱や真皮などの組織を形成します

コラーゲンは細胞外マトリックスをモデル化するための3D細胞培養に広く用いられています(ほとんどの場合I型)。マトリックス中の細胞を埋め込むために、液体ゲルと混合し、容器内にピペットで注入します。pHと温度が上昇すると、コラーゲン原線維の自己集合を伴うゲル化が起こり、細胞がカプセル化されます。

マトリゲル®はコラーゲンとラミニンを含むハイドロゲルで、多くの3D細胞培養アプローチ(オルガノイド培養など)に用いられます。マウス Engelbreth-Holm-Swarm (EHS)肉腫腫瘍由来で、主にラミニン、IV型コラーゲン、エンタクチンから構成されています。

各ハイドロゲルの用途、利点、欠点などの詳細な比較は下記論文をご参照ください

Caliari SR, Burdick JA (2016) 細胞培養用ハイドロゲルの実用ガイド。
ナット法13(5):405-414.10.1038/nmeth.3839 Read記事



コラーゲンの構造。

ibidi Solution

[ibidi コラーゲンタイプ I \(ラット尾由来\)](#) は、ペプシン処理を行っていない天然コラーゲンで、ゲル化したものは、ECMのモデルとして用いられます。重合が速く、3D培養中のゲル内で、細胞分布に偏りを生じにくいのが特徴です。

ibidi コラーゲンタイプ I (ラット尾由来)を用いた3Dゲルの調製法については [AN26:3D細胞培養用I型コラーゲンゲル](#)を参照してください。



3D細胞培養アッセイ

スフェロイドとオルガノイドの培養

スフェロイドは、三次元的な非接着環境下で培養することによって、細胞同士が互いに接着し形成される細胞塊です。多分化能を持たず、完全に分化した細胞で構成されています。一般的には、足場のない浮遊状態で作成され、ハンギングドロップ法や浮遊培養法が知られています。

スフェロイドは自己複製ができず、分化能も持ちません。例外は腫瘍細胞のスフェロイドです。腫瘍細胞は無限増殖能を有するために、それらは分裂し、再生することができます。このため、スフェロイドは、腫瘍細胞の挙動を調べるための有用なモデルと考えられており、大規模薬物スクリーニングなどに用いられます。

マイクロプレート血管新生におけるスフェロイド生成の詳細なプロトコルを知りたい場合には、：[AN32: スフェロイドの生成\(PDF\)](#)を参照ください。

オルガノイドは「ミニ器官」と培養される。それらは、成体幹細胞(ASC)または多能性幹細胞(PSC)から生成することができます。三次元マトリックス/スキャフォールド(例えば、Matrigel®やコラーゲン)で培養すると、これらの細胞は臓器特異的な細胞形態に分化し、小さな機能的臓器を形成します。

Sato *et al.*がLgr5+幹細胞から作成した腸オルガノイドを皮切りに、腸、肝臓、脳、前立腺、腎臓、膵臓、肺、甲状腺など、さまざまな器官からのオルガノイド生成用の多くのプロトコルの確立されました。CRISPRなどを用いて編集することができる点も忘れてはならず、個別化療法、器官形成、薬物スクリーニングに関する研究の強力なツールを提供します。

Sato T, et al. (2009) Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 459(7244):262–265. 10.1038/nature07935.

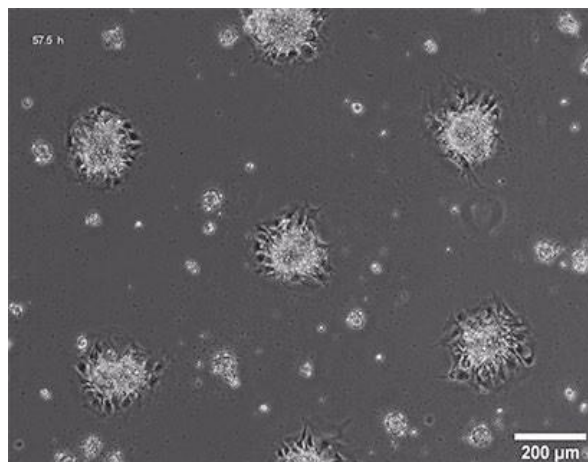
[記事を読む](#)

Drost J, Clevers H (2018) Organoids in cancer research. *Nat Rev Cancer* 18:407–418. 10.1038/s41568-018-0007-6.

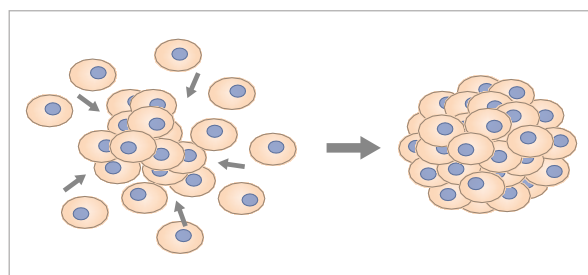
[記事を読む](#)

Tuveson D, Clevers H (2019) Cancer modeling meets human organoid technology. *Science* 364(6444):952–955. 10.1126/science.aaw6985.

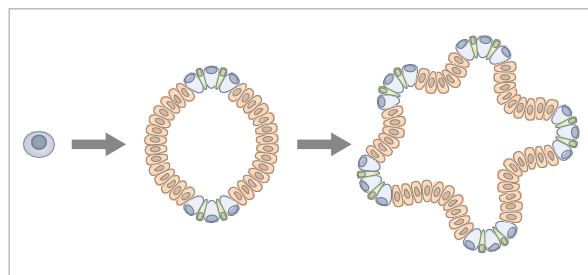
[記事を読む](#)



ibidiマイクロパターン上に特定のスフェロイドを形成するNIH-3T3細胞。直径200 μm接着スポットを有するμ-SlideV10.4に細胞を播種し、14日間フロー下で(3 dyn/cm²)培養した。



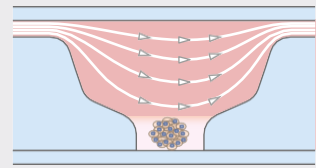
スフェロイドは細胞凝集体であり、しばしば癌細胞から作成されます。



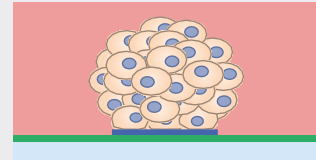
オルガノイドは、幹細胞に由来し、ミニ器官として培養されます。

ibidi Solutions

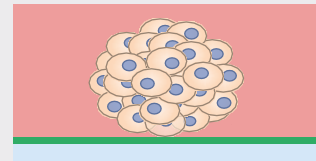
[マイクロスライド スフェロイド パフュージョン](#)は、長期スフェロイド培養を可能にする特殊なフローチャンバーです。スライド上には、独自の窪地形状を有するウェルが、1レーンあたり7個 x 3レーン分(計21ウェル)備わっており、そこで細胞が培養できるようになっています。ウェル上部には、培地を灌流させることにより、適切な栄養と酸素を細胞に提供する一方で、灌流に伴うシヤーストレスに細胞をさらすことのない形状になっております。



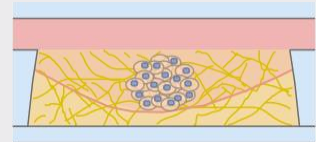
[μ-Slide With Multi-Cell μ-Pattern](#)は、スフェロイドおよびオルガノイドを特定の細胞接着スポットに作成することができ、長期培養や高分解能イメージングにも使用できるスライドです。細胞接着スポット周囲のBioinert加工された表面は、完全に細胞接着を阻害するため、細胞懸濁液中の単一細胞は、接着スポットにしか接着できません。このため、細胞は接着スポットで互いに凝集し、特定の領域にスフェロイドを作成することができます。



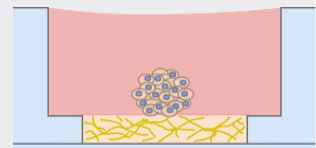
[Bioinert](#)は、生体分子に対する不活性な表面のことで、細胞や生体分子を接着させない面です。スフェロイド、オルガノイド、浮遊細胞の長期培養、高解像度顕微鏡観察に使用できます。現在、[マイクロディッシュ^{35 mm, high}](#) [バイオイナート](#)などで利用可能です。



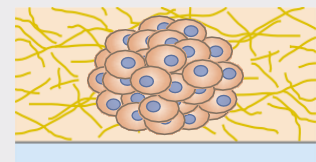
[マイクロスライド III 3D パフュージョン](#)では、スフェロイドまたはオルガノイドをゲル上で培養するか、3Dマトリックスに埋め込んで培養することができます。特殊なチャンネル形状により、低流量での灌流が可能になります(例えば、[ibidiポンプシステム](#)を使用する場合)。この設定により、最長数週間の長期培養が可能となります。さらに、底面は薄いカバースリップで構成されているため、高解像イメージングにも対応します。



[マイクロスライド アンジオジェネシス](#)または [マイクロプレート アンジオジェネシス 96ウェル](#)を使用しても、スフェロイドおよびオルガノイドを、ゲルマトリックス上またはゲルマトリックス内での3D培養することができます。高解像イメージングにも対応し、費用対効果の高い3D培養アプリケーションです。ゲル層と比較すると、上部の培地リザーバが大きいため、老廃物の迅速な拡散、効率的な培地供給を可能にします。



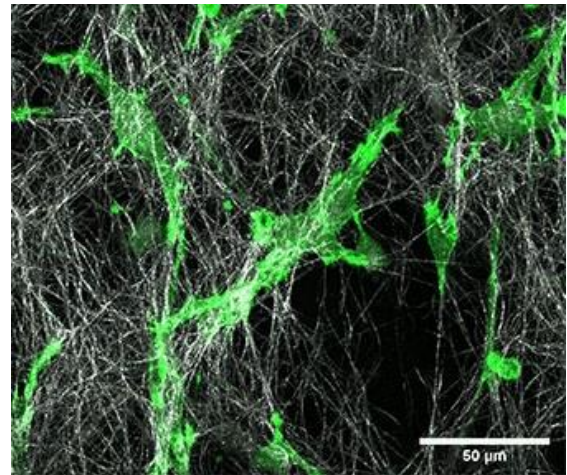
[ibidi I型コラーゲン\(ラット尾由来\)](#)は、ペプシン処理を行っていない天然コラーゲンで、ゲル化したものは、ECMのモデルとして用いられます。重合が速く、3D培養中のゲル内で、細胞分布に偏りを生じにくいのが特徴です。ibidi コラーゲンタイプ I (ラット尾由来)を用いた3Dゲルの調製法については[AN26:3D細胞培養用I型コラーゲンゲル](#)を参照してください。



3Dマトリックス中の単一細胞

3D培養は、多くの点で、2D細胞培養よりもin vivo様の培養環境を提供します。3Dゲル内で細胞を培養し、単一の細胞を観察すると、細胞の変形、遊走性、管形成、ECM分解などの多様な生物学的疑問を分析することができます。1種類の細胞だけの培養だけではなく、複数の細胞種を共培養する場合もあり、たとえば、癌細胞の線維芽細胞に対する浸潤挙動などを調べる系も作成することができます。

ゲルマトリックスから細胞を単離する際は、マトリックスを酵素的で分解します(例えば、コラーゲナーゼによるコラーゲン)。回収した細胞は、新たなゲルマトリックス中で増殖させたり、DNA、RNA、またはタンパク質を抽出するなど、さらなる解析に使用することもできます。



μ -スライド ケモタキシスを用いて、ibidi コラーゲンタイプ I (ラット尾由来)中のLifeActを発現したHT-1080細胞(緑色)

ibidi Solutions

[ibidi I型コラーゲン\(ラット尾由来\)](#)は、ペプシン処理を行っていない天然コラーゲンで、ゲル化したものは、ECMのモデルとして用いられます。重合が速く、3D培養中のゲル内で、細胞分布に偏りを生じにくいのが特徴です。[ibidi I型コラーゲン\(ラット尾由来\)](#)を用いた3Dゲルの調製法については[AN26:3D細胞培養用I型コラーゲンゲル](#)を参照してください。

[マイクロスライド III 3D パフュージョン](#)では、単一細胞を3Dマトリックスに埋め込むことができます。特殊なチャンネル形状をしており、(例えば、[ibidiポンプシステム](#)を使用することで)低流量での灌流が可能です。灌流することにより、静置培養では滞りがちな、酸素と栄養分を十分に供給することができます。このため、最長数週間の長期培養が可能となります。底面は薄いカバースリップボトムであるため、高解像イメージングにも対応します。

[マイクロスライド アンジオジェネシス](#)または [マイクロプレート アンジオジェネシス 96 Well](#)は、簡単に3Dゲル中、もしくは3Dゲル上の単一細胞もしくは共培養の細胞観察系を構築することができます。このシステムでは、内部ウェルに作成したゲルの上面で、培地リザーバーと接し、この面を介して迅速かつ容易な培地との物質のやりとりをしている。ibidiポリマー底面だけではなく、もし、必要であれば、カバースリップ厚1.5Hのガラスボトムタイプの製品も入手可能です。

[マイクロスライドI Luer 3D](#)は、灌流下しながら、3Dゲルマトリックス上もしくはマトリックス中で細胞を培養するために設計されています。スライド上には流路があり、その流路には、3D培養するためのゲルが作成できる3つのウェルが備わっています。灌流する場合、本スライドを[ibidiポンプシステム](#)などのポンプに接続し、酸素や栄養などを供給します。細胞極性の研究に最適で、3Dゲルマトリックスと細胞層をコンタクトさせ、3Dゲルマトリックス内に存在する因子により、細胞層の極性化をもたらすような系を組むことができます。また、3Dマトリックス中に癌細胞を埋め込み、白血球を培地とともに流すことで、癌細胞より発せられる物質に誘引される白血球を観察する系を組むことができます。

[マイクロスライド ケモタキシス](#)と[スティッキースライド ケモタキシス](#)は、2Dおよび3D培養下における、細胞の遊走を解析するのに適したスライドです。3D培養に用いたとしても、[コラーゲンゲル](#)やMatrigel®などのゲル構造は、拡散に基づく誘引物質もしくは忌避物質の濃度勾配形成を妨げません。

[マイクロスライド メンブレン イビポアフロー](#)は、膜を介した移動および物質のやりとりの研究に使用できるスライドです。静置培養もしくは還流培養下いずれにも使用することができます。

[マイクロ・ディッシュ _{35mm, high}](#)または[マイクロスライド 8 Well high](#)など、ほぼ全てのibidi labwareは、3Dマトリックスを使用することができ、3D培養に使用することができます。



3Dにおける走化性および遊走アッセイ

走化性アッセイは、走化性物質指向性細胞遊走を分析するために使われてきました。走化性アッセイの際に2D環境で細胞を培養することは、in vivoの状況を反映せず、細胞挙動および遊走結果を見誤る可能性があります。この問題を克服するために、コラーゲン、マトリゲル®、その他のヒドロゲルなどの自然環境を模倣した3Dマトリックスに細胞を埋め込みます。

3D走化性アッセイの利点

- 大部分の細胞種にとって、よりin vivoに近い環境を与えます
- ECMに似た環境を与えます
- 接着細胞、浮遊細胞を問わず走化性アッセイが可能

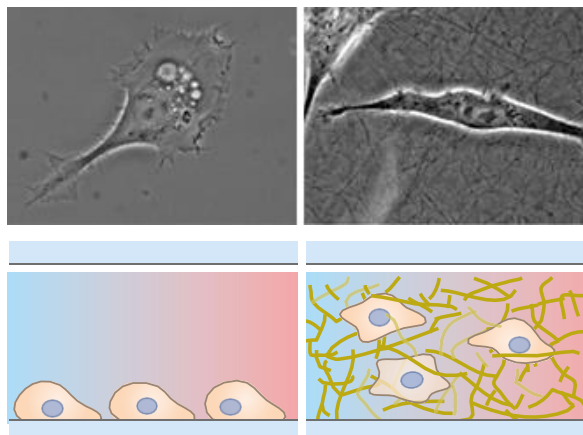
3D走化性アッセイの限界

- 比較的ゲルの取り扱いが難しい;実験中に制御しなければならないパラメータが多い
- 細胞がゲル表面もしくは底面付近に付着し、2D表面的な現象を示す可能性がある
- トラッキング中に、Z軸方向に細胞が移動し、焦点を外れることがある

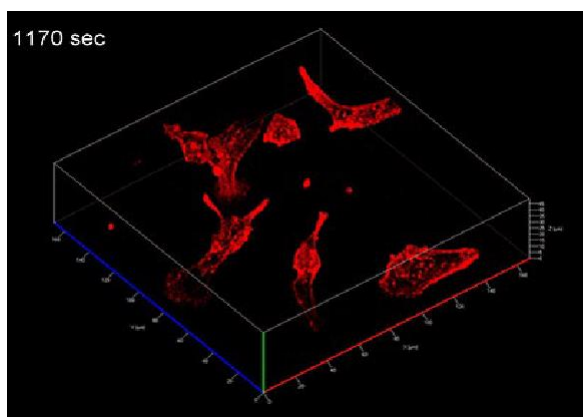
2Dおよび3D走化性アッセイに関する詳しい情報は、以下のアプリケーションノートに記載されています:

- [AN 17:走化性2Dと3D \(PDF\)](#)
- [AN23:ゲルマトリックス\(PDF\)中の非接着性細胞のための3D走化性プロトコル](#)
- [AN24:2Dおよび3D \(PDF\)におけるHT-1080細胞の走化性](#)
- [AN26:3D細胞培養用I型コラーゲンゲル\(PDF\)](#)
- [AN34:2Dおよび3D \(PDF\)におけるHUVEC細胞の走化性](#)

Biswenger V, et al. Characterization of EGF-guided MDA-MB-231 cell chemotaxis in vitro using a physiological and highly sensitive assay system. *PLoS One*, 2018, 10.1371/journal.pone.0203040.
[記事を読む](#)



接着したHT-1080癌細胞の顕微鏡検査と模式図。2D表面上(左)、 μ -スライドケモタキシス上の3DコラーゲンIゲルに埋め込まれている(右)



HT-1080癌細胞にトランスフェククションしたLifeAct TagRFPのスピニングディスク共焦点タイムラプス顕微鏡画像。 μ -スライドケモタキシスの3Dコラーゲンマトリックス中を移動。×63油浸レンズ使用

ibidi Solutions

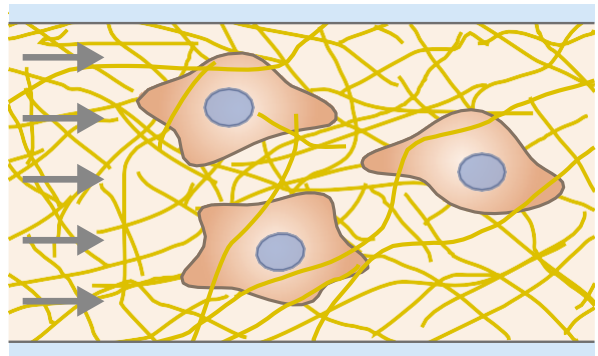
[マイクロスライド ケモタキシス](#)と[スティッキー スライド ケモタキシス](#)は、2Dと3D両方の走化性実験に適しています。濃度勾配は、ゲル構造は、分子拡散による可溶性勾配の形成を阻害せず、コラーゲンIゲルやマトリゲル®などの3Dハイドロゲルを使用することで3D走化性アッセイ系を確立できます。



フロー培養を組み合わせた3D細胞培養

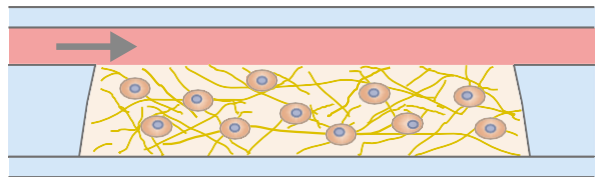
間質流

*in vivo*では、多くの細胞が絶えず流れに伴うシヤアストレスにさらされています。*in vitro*の3Dマトリックスで培養する場合でも、非常に緩やかな流れで灌流しながら、増殖培地、試薬・薬剤を提供することにより、より自然な細胞培養条件を実現することができます。



灌流

チャンネルを有するスライドに3Dゲルマトリックスを作成し、ゲルマトリックス内に細胞を埋め込むことで、ゲル上で培地を流すことができます。この系では、流れに伴い運ばれてきた酸素や栄養などが、3Dマトリックス内に拡散し、供給されます。このため、適切な流量を調整することにより、栄養レベルを規定し、長期間の生細胞実験を可能にします。



ibidi Solutions

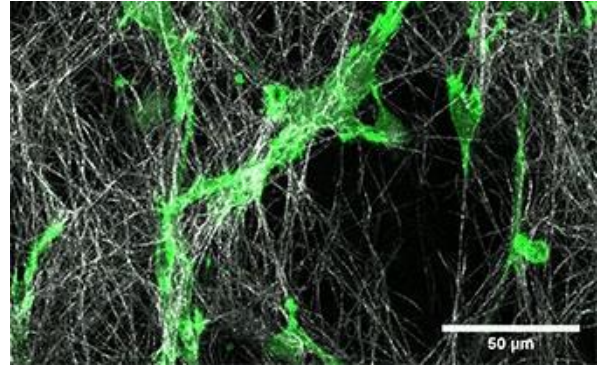
[マイクロスライド III 3Dパフュージョン](#)、[マイクロスライドI ルアー3D](#)、[マイクロスライドスフェロイド パフュージョン](#)および[マイクロスライドVIファミリー](#)を含むibidiチャンネルスライドは、3Dマトリックスへの細胞の播種および灌流(例えば、[ibidiポンプシステム](#)の使用)の適用を可能にします。



3Dマトリックス中の単一細胞

コラーゲンマトリックスでのHT-1080癌細胞遊走3D生細胞イメージング

LifeActを発現するHT-1080細胞(緑色)を播種した [マイクロスライド ケモタキシス](#)上の1.5mg/ml [I型コラーゲン\(ラット尾由来\)](#)層(白色)中に播種しました。細胞遊走は、水浸対物レンズ40x/1.2を用いて、Zeiss共焦点顕微鏡LSM 880 AxioObserver上で300秒毎に撮影することにより記録しました。



[ここをクリックすると、当ウェブサイトで見ることが出来ます。](#)

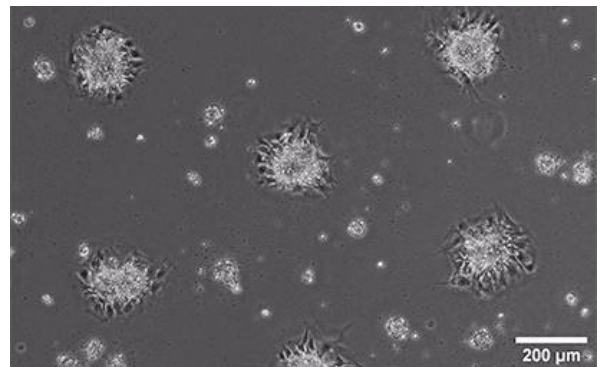
スフェロイド培養、オルガノイド培養

特定のマイクロパターン上のスフェロイド形成

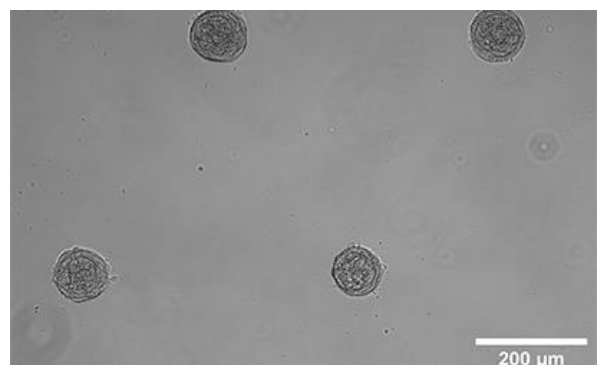
マイクロパターンは、3Dアッセイを最適化するための強力なツールである。ibidiの[マルチセルアレイ用マイクロパターンスライド](#)は、2Dおよび3D細胞培養している細胞の、特定の空間への配置を可能にするスライドである。細胞懸濁中の接着性細胞は、非接着性のBioinert表面には接着できず、接着パターン上にしか接着できないため、細胞は接着パターン上で凝集しスフェロイドを形成する。

200 μmの接着斑上でのNIH-3T3細胞(マウス胚線維芽細胞)のスフェロイド形成、スフェロイド生成が64時間立証された。位相差ライブセル撮像、4倍対物レンズ。

ウェブサイトで動画を見る方は[こちらをクリック](#)

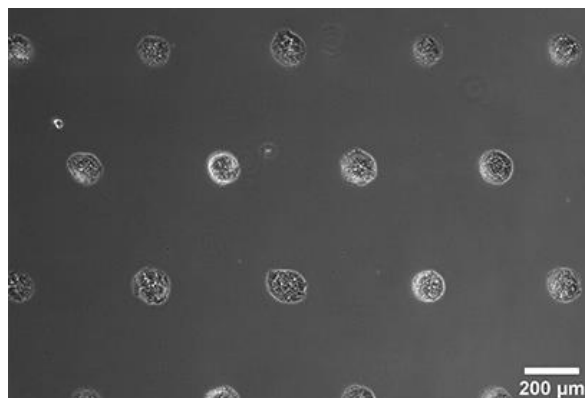


NIH-3T3細胞(マウス胚線維芽細胞)のスフェロイド形成。[マルチセルアレイ用マイクロパターンスライド](#)に細胞を播種してから14日後に撮影した。明視野顕微鏡使用。対物レンズ×10。



特定のパターンに沿って形成された スフェロイド形成

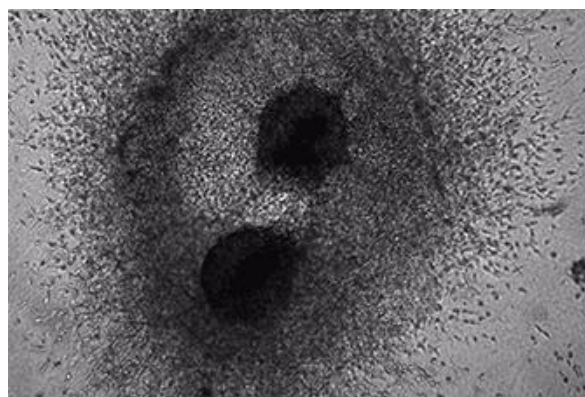
NIH-3T3細胞(マウス胚線維芽細胞)のスフェロイド形成。マルチセルアレイ用マイクロパターンズライドに細胞を播種してから14日後に撮影した。明視野顕微鏡使用。対物レンズ×10。



3Dコラーゲンゲル中の内皮細胞の出芽

浸潤性ヒト線維肉腫スフェロイド(HT-1080)をI型コラーゲン(ラット尾由来)に埋めこんだ結果。マイクロスライド 8ウェルを使用し、ゲルマトリックスへの浸潤を48時間記録した。対物レンズ×4、明視野顕微鏡使用。

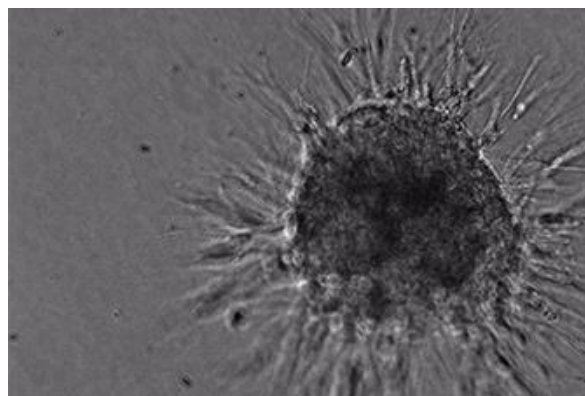
ウェブサイトで動画を見る方は[こちらをクリック](#)



3Dコラーゲンゲル中の内皮細胞の出芽

I型コラーゲン(ラット尾由来)で作られた3Dゲルに埋め込まれたヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)のスフェロイドの生細胞イメージング。マイクロスライド 8ウェルを使用し、ゲルマトリックスへの出芽過程を44時間記録した。対物レンズ×10もしくは×4、明視野顕微鏡使用。

ウェブサイトで動画を見る方は[こちらをクリック](#)

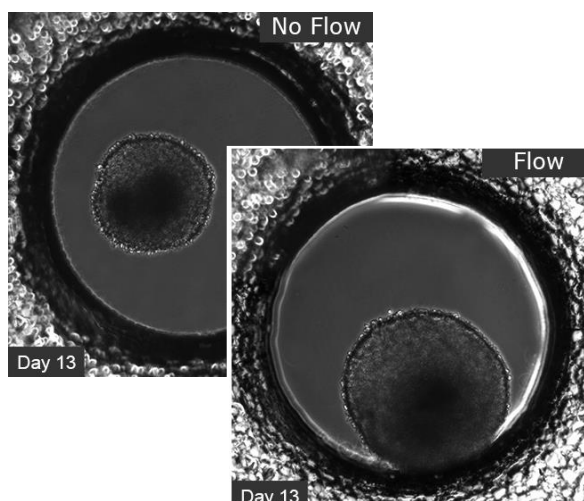


灌流培養でスフェロイドの成長が促進した事例

μ L929線維芽細胞の [マイクロスライド スフェロイド パフュージョン](#)、Bioinertを用いたスフェロイド形成例。5 x10⁵個/ mLで細胞を播種し、14日観察。

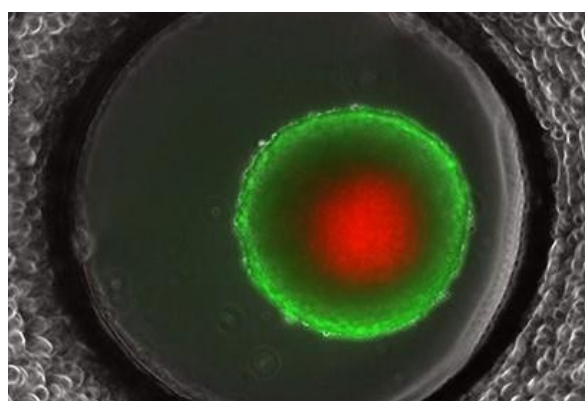
左: 灌流なし 右: [ibidiポンプシステム](#)による灌流、0.75mL /分。位相差顕微鏡、10倍の対物レンズ、ウェルの直径800 μ m

ウェブサイトで動画を見る方は[こちらをクリック](#)



長期培養スフェロイドの生細胞、死細胞染色

[ibidiポンプシステム](#)と[マイクロスライド スフェロイド パフュージョン](#)を使用し、L929細胞スフェロイドを14日後培養し、FDA/PI染色を用いて生細胞、死細胞染色を行った。フロー速度は0.75 ml/min。緑色:生細胞(FDA);赤色:死細胞(PI)。広視野蛍光顕微鏡使用。対物レンズ×10。



3D走化性実験

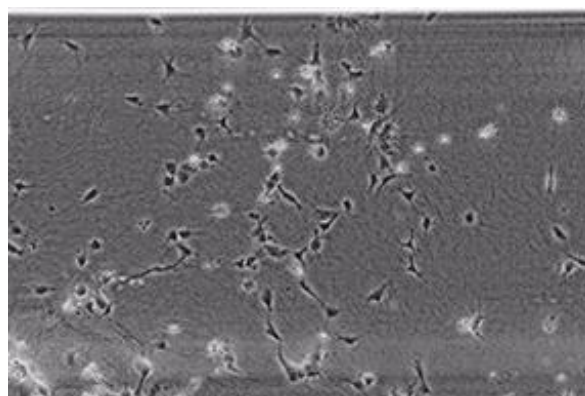
FCS勾配に向けた3DコラーゲンIゲル中の内皮細胞の走化性

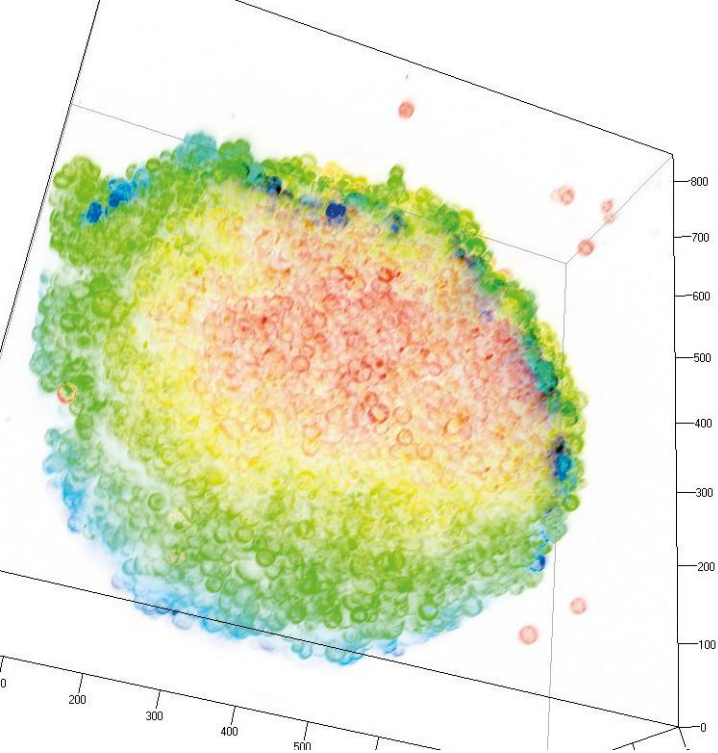
[マイクロスライドケモタキシス](#)上で、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC)を1.5 μ g/mlコラーゲンI型ゲルに包埋し、生細胞イメージングした結果。細胞は子牛胎児血清に向かって移動している。

位相差顕微鏡、対物レンズ×4、24時間の撮影

注意: 走化性の過程では、細胞同士が接触し、紐状になる場合があります。

ウェブサイトで動画を見る方は[こちらをクリック](#)





メーカー

イビディGmbH
ロハマーシュラグ11
82166 ドイツ・ガ
ーフェルフィンゲ

ドイツ国内無料:
電話: 800 / 00 11 11 28
FAX: 0800 / 00 11 11 29

国際電話:
電話: +49 89 / 520 46 17 - 0
FAX: +49 89 / 520 46 17 -
59

北米本社

米国ibidi社
2920 市場駆動装置、Suite 102
フィッチブルグ、WI
53719米国

米国内で無料化する:
電話: +1 844 276 6363

国際電話:
電話: +1 608 441 8181
FAX: +1 608 441 8383

E-Mail: ibidiusa@ibidi

すべてのibidiは、研究用のみ!誤りおよび省
略は除く。

© イビディGmbH

無料サンプル、アプリケーションノート、映画の取り扱いに
ついては、私たちのところを受診してください:

ibidi.com