

# Megazyme

---

## クエン酸(塩)分析法 (安定性向上品)

### CITRIC ACID (CITRATE) ASSAY PROCEDURE (*EXTENDED STABILITY*)

K-CITR 04/20

K-CITR  
(用手法 72 回分\*)  
(自動分析法 840 回分)  
(マイクロプレート法 720 回分)

\* 半量で分析すると検体数は2倍

**日本バイオコン株式会社**

## はじめに - INTRODUCTION -

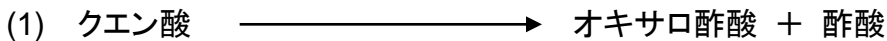
クエン酸(塩)は酸味、風味、防腐特性により果汁やその他のソフトドリンク、ビール、牛乳、パン、キャンディー、乳製品や肉製品など、多くの天然および加工食品と飲料に含まれています。クエン酸は製紙業のほかワイン産業で酸味料として多く使われていますが、EUにおける使用上限は最終濃度で僅か 1 g/L です。

臨床化学上クエン酸の定量は重要です。またブドウ果汁、発酵マスト、ワインに含まれるタンニンによる障害を防ぐため、ポリビニルピロリドン(PVP)が分析系に組み込まれています。2年以上の安定性のあるキットを安価に提供しており、用手法(3ページ「A」を参照)、自動分析法(5ページ「B」)およびマイクロプレート法(5ページ「C」)と、各規模の実験室のご用途に合わせた分析が可能です。

## 原理 - PRINCIPLE -

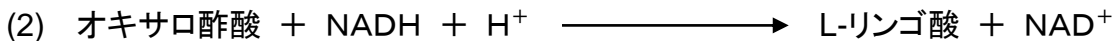
クエン酸(塩)はクエン酸リアーゼ(CL)により、オキサロ酢酸と酢酸に分解されます(1)。

(CL)



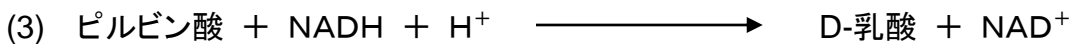
生成物であるオキサロ酢酸は、NADHの存在下、L-リンゴ酸デヒドロゲナーゼ(L-MDH)によりL-リンゴ酸とNAD<sup>+</sup>に変換されます(2)。

(L-MDH)



但しサンプル中にオキサロ酢酸デカルボキシラーゼが存在する場合、オキサロ酢酸の一部はピルビン酸に変換されます。そのためクエン酸を確実に定量するため D-乳酸デヒドロゲナーゼ(D-LDH)を用いて、生成したピルビン酸を D-乳酸とNAD<sup>+</sup>に変換します(3)。

(D-LDH)



一連の反応で生じるNAD<sup>+</sup>量はクエン酸量と化学量論的に同一です。NADHの消費量は340nmの吸光度の減少により測定されます。

## 特異性、感度、直線性と精度

### - SPECIFICITY, SENSITIVITY, LINEARITY AND PRECISION -

この測定法はクエン酸に対して特異性が高いです。市販のクエン酸一水和物を分析した場合、結晶水の一部が失われるため、100%を越える結果が予想されます。

吸光度差の最小値は 0.005 です。これは最大サンプル量 1.70mL を用いた場合、分析試料中のクエン酸濃度 0.246mg/L に相当します。検出限界は最大サンプル量 1.70mL を用いた場合、分析試料中のクエン酸濃度 0.491mg/L で、吸光度差 0.010 に相当します。

この分析は 1.0~100μg のクエン酸間で直線性を示します。同一サンプルを2本1組で分析した場合、吸光度のバラつきは 0.005~0.010 の範囲で発生し、これは最大サンプル量 1.70mL を用いた場合、クエン酸濃度約 0.246~0.491mg/L に相当します。

サンプル調製中にサンプルが希釈される場合、結果に希釈係数 F を掛ける必要があります。サンプル調製時、例えば 10g/L を秤量する場合、0.02~0.05g/100g の誤差が生じます。

## 阻害 - INTERFERENCE -

クエン酸の変換が分析法で定義された時間(約5分)内に完了している場合、一般に阻害が生じていないと結論付けることができます。また反応終了時のキュベットにクエン酸(0.2mL 中に約40 $\mu$ g)を加えることで確認することができます。吸光度が有意に減少すれば、阻害が生じていないことを示します。

試料中の妨害物質の存在は、内部標準を加えることにより確認することができます。標準品の量的な回収が可能ははずです。サンプルの取り扱いおよび抽出におけるロス回収実験、すなわち抽出工程の最初にサンプルにクエン酸を添加することによって確認することができます。

## 安全性 - SAFETY -

すべての化学物質に適用される一般的な安全対策を遵守する必要があります。この製品の安全な使用および取扱いの詳細、SDSについては日本バイオコンまでお問い合わせ下さい。

## キット - KITS -

用手法 72 検体(自動分析法 840 検体/マイクロプレート法 720 検体)分析用キットを提供しております。キットには以下のものが含まれます。

- ボトル1:** 緩衝液(40mL、pH 7.5)。防腐剤として 0.02%アジ化ナトリウム含有。4°Cで2年以上安定です。
- ボトル2:** NADH+PVP。-10°C以下で5年以上安定です。
- ボトル3:** L-リンゴ酸デヒドロゲナーゼ+D-乳酸デヒドロゲナーゼ、1.5mL。4°Cで2年以上安定です。
- ボトル4:(×3)** クエン酸リアーゼ凍結乾燥品。-10°C以下で5年以上安定です。
- ボトル5:** クエン酸標準液(5mL、0.20mg/mL)。0.02% (w/v)アジ化ナトリウム含有。密封条件下、4°Cで2年以上安定です。

## 試薬溶液/懸濁液の調製

### - PREPARATION OF REAGENT SOLUTIONS/SUSPENSIONS -

1. 付属のボトル1をそのまま使用して下さい。4°Cで2年以上安定です。
2. ボトル2の内容物を蒸留水 16mL に溶解します。  
4°Cで約4週間安定または-10°C以下で2年以上安定です  
(凍結/融解の繰り返しを避けるため、ポリプロピレンチューブに小分けして凍結します)。
3. 付属のボトル3をそのまま使用して下さい。最初に開封する前に、ゴム栓に付着した可能性のある酵素を混合するためボトルを振って下さい。その後、ボトルを直立させて保管します。  
使用前にボトルを軽く振り混ぜて下さい。4°Cで2年以上安定です。
4. ボトル4の1本を蒸留水 0.55mL に注意深く溶解します。4°Cで4週間、-10°C以下で6ヶ月以上安定です。必要になるまで2本目以降のボトルは溶解させないで下さい。

**NOTE:** 溶解液を効率良く回収するために、ボトル4溶解時は反転させず、また直立させて保存して下さい。

5. 付属のボトル5をそのまま使用して下さい。密封条件下、4℃で2年以上安定です。

NOTE : クエン酸標準液は、使われる分光光度計の精度やサンプル中の妨害物質による阻害が疑われる場合にのみ使用します。

クエン酸濃度は、NADHの吸光係数から直接算出します(4ページ)。

### 機器(推奨):

1. メスフラスコ (50mL, 100mL, 500mL)
2. 使い捨てプラスチック製キュベット(光路 1cm, 3.0mL)。紫外部対応のもの
3. マイクロピペッター、例 Gilson Pipetman® (20µL, 100µL, 1mL)
4. ポジティブディスプレイメント方式ピペッター、例 Eppendorf Multipette®
  - 5.0mL Combitip® (緩衝液1、NADH/PVP溶液分注用)
  - 25 mL Combitip® (蒸留水分注用)
5. 分析用天秤
6. 340nm に設定した分光光度計
7. ボルテックスミキサー
8. 実験室用タイマー(ストップウォッチ)
9. ワットマン No.1 濾紙(9cm 径)

## A. 分析手順 (用手法) - MANUAL ASSAY PROCEDURE -

波長:	340nm
キュベット	光路 1cm (ガラスもしくはプラスチック)
反応温度	約 25℃
反応最終容量	2.74 mL
サンプル溶液	クエン酸 1.0~100µg (サンプル液量を 0.20~1.0mL とした場合)

空気を対照(レファレンス側にセルを入れない)、または水を対照に分析

ピペットでキュベットに添加	ブランク	サンプル
蒸留水 (約25℃)	2.00 mL	1.80 mL <sup>†</sup>
サンプル溶液	-	0.20 mL <sup>†</sup>
溶液1 (緩衝液)	0.50 mL	0.50 mL
溶液2 (NADH/PVP)	0.20 mL	0.20 mL
懸濁液3(L-MDH/D-LDH)	0.02 mL	0.02 mL
混合*し、試薬添加の約4分後、反応液の吸光度測定(A <sub>1</sub> )		
次に以下のものを添加し反応開始:		
溶液4 (CL)	0.02 mL	0.02 mL
混合*し、反応継続。反応終了(約5分)後、反応液の吸光度測定(A <sub>2</sub> )。		

\* プラスチック製スパテルで攪拌するか、キュベット蓋またはパラフィンフィルムでキュベットに蓋をして穏やかに反転させる。

† サンプル量はサンプルと蒸留水添加量合計の範囲で変更可能(サンプル溶液の項参照)

## 算出法（用手法）

ブランクとサンプルの吸光度差 ( $A_1 - A_2$ ) を測定します。サンプルの吸光度差からブランクの吸光度差を差し引いて  $\Delta A$  を求めます。

十分に正確な結果を得るには、 $\Delta A$  は少なくとも 0.100 の吸光度差が必要です。

の濃度は、以下のように計算することができます。

$$c = \frac{V \times Mw}{\epsilon \times d \times v} \times \Delta A \quad [\text{g/L}]$$

ここで:

V = 最終反応液量 (mL)

Mw = クエン酸の分子量

$\epsilon$  = 340nm における NADH の分子吸光係数 = 6,300 (L/mol/cm)

d = 光路 (cm)

v = サンプル液量 (mL)

ここでは 0.2mL の例を示します。サンプル量により計算式に補正が必要です。

クエン酸濃度は以下の通り

$$\begin{aligned} c &= \frac{2.74 \times 192.1}{6300 \times 1.0 \times 0.2} \times \Delta A \quad [\text{g/L}] \\ &= 0.4177 \times \Delta A \quad [\text{g/L}] \end{aligned}$$

サンプルを調製中に希釈した場合は、計算結果に希釈係数 **F** を乗じる必要があります。固体および半固体サンプルを秤量後分析する場合、含有量 (g/100g) は、秤量値から以下のように算出されます。

クエン酸含量

$$= \frac{\text{クエン酸濃度 [g/L サンプル液]}}{\text{サンプル重量 [g/L サンプル液]}} \times 100 \quad [\text{g/100g}]$$

NOTE: 上記は、メガザイムウェブサイト ([www.megazyme.com](http://www.megazyme.com)) の各製品ページからダウンロード可能な Megazyme *Mega-Calc*<sup>TM</sup> を使用することで簡単に計算できます。

## B. 分析手順（自動分析法） - AUTO-ANALYSER ASSAY PROCEDURE -

### R1試薬調製

組成	液量
蒸留水	51.5 mL
溶液1(緩衝液)	13 mL
溶液2(NADH/PVP)	5 mL
懸濁液3(L-MDH/D-LDH)	0.5 mL
総液量	70 mL

### R2試薬調製

組成	液量
蒸留水	7 mL
ボトル4(CL)	Bottle 4
総液量	7 mL

\*自動分析の場合、ボトル4を7 mLの蒸留水で溶解します。

### 分析法(例)

R1:	0.25 mL
試料	~ 0.003 mL
R2:	0.025 mL
反応温度と時間	25°Cまたは37°C反応で約5分
波長	340nm
調製試薬の安定性	冷蔵にて5日間
定量法	エンドポイント法
反応方向	減少
直線性	反応液当たりクエン酸 33µg/L まで

## C. 分析手順(マイクロプレート法) - MICROPLATE ASSAY PROCEDURE -

### NOTE:

- クエン酸のマイクロプレート分析手順は、一点標準法または検量線法の何れかを使用します。
- 一点標準法または検量線で測定されるクエン酸の一連の分析バッチごとに、同一ロットの試薬を用いて一度に分析する必要があります。

### 分析法

波長:	340nm
マイクロプレート	96穴 (ガラスまたはプラスチック製の底が平らなもの)
反応温度	約25°C
最終反応液量	0.274 mL
直線性	サンプル量 0.02~0.10 mL 時、クエン酸 0.1~ 10µg/ウェル

ピペットでキュベットに添加	ブランク	サンプル	標準
蒸留水	0.200 mL	0.180 mL <sup>†</sup>	0.180 mL
サンプル溶液	-	0.020 mL <sup>†</sup>	-
標準液	-	-	0.020 mL
溶液1 (緩衝液)	0.050 mL	0.050 mL	0.050 mL
溶液2 (NADH/PVP)	0.020 mL	0.020 mL	0.020 mL
懸濁液3 (L-MDH/D-LDH)	0.002 mL	0.002 mL	0.002 mL
混合*し、試薬添加の約4分後、反応液の吸光度測定(A <sub>1</sub> ) 次に以下のものを添加し反応開始:			
溶液4 (CL)	0.002 mL	0.002 mL	0.002 mL
混合*し、反応継続。反応終了(約5分)後、反応液の吸光度測定(A <sub>2</sub> )。 5分後も反応が終了していない場合、2分間の吸光度変化がなくなるまで2分間隔で吸光度を測定する**。			

\* マイクロプレートリーダーの自動攪拌機能を使用、もしくは 50~100 $\mu$ L のピペッティング

\*\* この「クリープ」現象がブランクより大きい場合、試料の吸光度は溶液4の添加から外挿する

† サンプル量はサンプルと蒸留水添加量合計の範囲で変更可能(直線性の項参照)

## 算出法 (マイクロプレート法)

$$g/L = \frac{\Delta A_{\text{試料}}}{\Delta A_{\text{標準}}} \times \text{標準 [g/L]} \times F$$

サンプルを調製中に希釈した場合は、計算結果に希釈係数 **F** を乗じる必要があります。

## サンプルの調製 - SAMPLE PREPARATION -

### 1. サンプル希釈 (用手法用)

キュベット中に添加されるクエン酸の量(すなわち、試料 0.2mL 中)は、1.0~100 $\mu$ g の範囲である必要があります。従って試料溶液のクエン酸が 0.005~0.50g/L の範囲に入るよう、濃度を調整します。

希釈表	推定クエン酸濃度(g/L)	水による希釈	希釈度 (F)
	< 0.50	希釈不要	1
	0.50~5.0	1 + 9	10
	5.0~50	1 + 99	100
	> 50	1 + 999	1000

サンプル吸光度  $\Delta A$  の値が低すぎる(例えば<0.100)場合、サンプル量を増やすか、希釈度を下げます。またはサンプルと蒸留水添加量の合計が 1.70mL となるよう、キュベットに添加するサンプル量を 1.70mL まで増やし、計算式のサンプル量を変える方法もあります。

### 2. サンプルの清澄化

Carrez 試薬による清澄法は回収率が低いため、本法のサンプル調製には使用できません。代替法として過塩素酸またはトリクロロ酢酸を用います(夫々の該当ページを参照願います)。

### 3. 一般的な注意事項

- a) **液状試料**: 透明で僅かに着色した程度の、中性に近い液状試料はそのまま分析に使用できます。
- b) **酸性試料**: 酸性試料 0.2mL 以上を希釈なしで使用する場合(例 ワイン、果汁)は、2M NaOHを用い溶液の pH を 7.4 近くにまで上げ、室温で30分間放置する必要があります。
- c) **炭酸ガス**: ビールのように炭酸ガスを含む試料は、2M NaOH を用い溶液の pH を 7.4 近くにまで上げ、穏やかに攪拌するか、ガラス棒で攪拌して炭酸ガスを除きます。
- d) **着色した試料**: 反応液にCLを添加しない、試料ブランクの測定が必要な場合があります。
- e) **強く着色した試料**: 強く着色した試料をそのまま分析する場合は、試料 10mL にPVPP (ポリビニルポリピロリドン) 0.2g を添加して前処理します。試験管を5分間激しく振とうし、Whatman No.1 濾紙で濾過します。
- f) **固体試料**: 固体試料を蒸留水中でホモジナイズまたは粉碎し、必要に応じて濾過します。
- g) **脂肪を含む試料**: 脂肪を含む試料は、脂肪の融点より高い温度の熱水(例 60℃)で、100mL 容メスフラスコ中で抽出します。室温に戻した後に定容します。氷上または冷蔵庫で15~30分間冷却し、脂肪を分離させて濾過します。濾液は最初の数 mL は廃棄し、透明な上清(僅かに白濁していても良い)を分析に使用します。
- h) **タンパク質を含有する試料**: 等容量の氷冷した 1M 過塩素酸を混合しながら加えて除タンパクします。1,500g で10分間遠心分離し、上清を 1M KOH で中和します。またはトリクロロ酢酸を用います。

### サンプルの調製例

#### (a) ワイン中の遊離クエン酸の定量

一般に、白および赤ワイン中の遊離クエン酸濃度[F]は、サンプル処理せずに測定可能です(希釈表による希釈を除く)。通常、1:4 倍希釈とサンプル量 0.2mL で十分です。

#### (b) ワイン中のクエン酸およびそのエステル化誘導体の定量

白ワインと赤ワインの遊離[F]およびエステル化[E]クエン酸の合計濃度[F+E]は、以下の手順で測定します。ワイン 20mL に 2M NaOH 6mL を加え、攪拌しながら30分間加熱還流します。冷却後、1M 硫酸で溶液の pH を 7.4 に慎重に調整し、蒸留水で 50mL に定容します。次に手順に従い分析します。本法で得られる結果は、遊離およびエステル化クエン酸の総量[F+E]ですので、エステル化クエン酸濃度[E]は次のように計算します。

$$[E] = [F+E] - [F] \quad [\text{g/L}]$$

#### (c) ビール中のクエン酸の定量

ガラス棒で攪拌して二酸化炭素を除去し、希釈表に従ってサンプルを希釈し分析します。

**註**> ダークビールには遊離ピルビン酸塩が含まれている可能性が高いため、追加のNADHが必要になる場合があります(例: 2mg/mL の **C-NADH** を 0.2mL 追加)。

通常、希釈は不要でサンプル量 0.2mL で十分です。

#### (d) 果汁、清涼飲料、茶およびその他の飲料中のクエン酸の定量

サンプルを希釈し、クエン酸濃度が 0.50 g/L 未満になるようにします(希釈表を参照)。通常、透明で中性の溶液は希釈後にそのまま分析可能です。また一般的に混濁液は希釈前に濾過すれば充分です。着色液は適切なクエン酸濃度に希釈後分析すれば良いです。但し着色液を原液で分析する必要がある場合は、次のように脱色します。液状品 25mL を 1M NaOH で pH 約 7.4



に調整し、蒸留水で 50mL に定容します。PVPP 0.5g を加え、5分間攪拌し、Whatman No.1 濾紙で濾過します。分析には透明で僅かに着色した程度の濾液を使用します。

通常、さらに 1 : 20 倍希釈し、サンプル量 0.2mL で十分です。

#### (e) チーズ、肉、パン、野菜および果物製品中のクエン酸の定量

試料の平均的な部分約 5g を 100mL 容メジウム瓶に精秤します。1M 過塩素酸 20mL を加え、Ultra-turrax®または Polytron®ホモジナイザー(または同等品)を使用して2分間ホモジナイズします。50mL 容ガラスビーカーに全量移し、2M KOH で pH を約 8.0 に調整します。100mL 容メスフラスコに全量移し、蒸留水で定容します(脂肪含有層が「標線より上」にあり、水面が「標線」にあることを確認します)。氷上で20分間保持し過塩素酸カリウムと脂肪(存在する場合)を沈殿分離します。濾過し、最初の 3~5mL を捨て、透明な濾液を分析に用います。

通常、希釈は不要で、サンプル量 0.2mL で十分です。

#### (f) 食用油、マーガリンおよび軟膏中のクエン酸の定量

試料の平均的な部分約 5g を 200mL 容ガラスビーカーに定容し、蒸留水 60mL を加え、ホットプレート付マグネティックスターラー上で沸騰するまで激しく攪拌します。水層をピペットで 100mL 容メスフラスコに分取します。蒸留水 30mL で抽出を繰り返します。

メスフラスコを 20~25°C まで冷却し、蒸留水で定容します。メスフラスコを氷水浴または冷蔵庫に15分間放置し、溶液の一部を Whatman No.1 濾紙で濾過します。

通常、希釈は不要で、サンプル量 0.2mL で十分です。

#### (g) 製紙中のクエン酸の定量

製紙約 2g を 100mL 容メスフラスコに精秤します。蒸留水約 60mL を加えた後、内容物を室温で約1時間、マグネティックスターラーで激しく攪拌します。スターラーバーを取り出し、蒸留水で定容します。攪拌後 Whatman No.1 濾紙で濾過します。透明な濾液をそのまま分析します。

通常、希釈は不要で、サンプル量 0.2mL で十分です。

#### (h) ハードおよびソフトキャンディー中のクエン酸の定量

試料の平均的な部分約 3g を蒸留水約 70mL を加えた 100mL 容メスフラスコに精秤し、60°C で時々振とうしながら20分間または完全に分散するまで加熱します。室温まで冷却後、蒸留水で定容し攪拌後、Whatman No. No.1 濾紙で濾過します。

通常、希釈は不要で、サンプル量 0.2mL で十分です。

#### (i) 全血試料中のクエン酸の定量

##### a. 試薬

濃 Carrez I 溶液: ヘキサシアノ鉄(II)酸カリウム $\{K_4 [Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O\}$  (Sigma P9387 または同等品) 30g を 200mL の蒸留水に溶解し、室温で保存します。

濃 Carrez II 溶液: 硫酸亜鉛 $(ZnSO_4 \cdot 7H_2O)$  (Sigma Z4750 または同等品) 60g を 200mL の蒸留水に溶解し、室温で保存します。

##### b. 手順

全血試料 1mL を約80°Cで20分間加熱します。マイクロ遠心チューブで 13,000 × g、10分間遠心分離し、上清を回収します。濃 Carrez 試薬 II 20μL を添加して十分に混合し、次に濃 Carrez 試薬 I 20μL を添加して十分に混合します。サンプルを 13,000 × g、10分間再度遠心し、上清を回収します。必要に応じて蒸留水で便宜希釈します。

NOTE: 清澄上清の最終容量は、元試料の約 1/4 量になります。  
従って、分析に必要な上清液量を勘案して出発試料の液量を決めて下さい。

#### (j) 生体組織試料中のクエン酸の定量

生体組織の平均的な部分約 5g を精秤し、100mL 容メジウム瓶に入れます。1M 過塩素酸 20mL を添加し、Ultra-turrax®や Polytron®ホモジナイザー (または同等のもの) を使用して2分間ホモジナイズします。50mL 容ガラスビーカーに全量を移し、2M KOHを用いて pH をおよそ 8.0 に調整します。100mL 容メスフラスコに全量移し、蒸留水で定容します (脂肪含有層が「標線より上」にあり、水面が「標線上」にあることを確認する)。20分間氷冷して過塩素酸カリウムを沈殿させ、脂肪層があれば分離します。適量のサンプルを 13,000×g で10分間遠心するか、あるいは Whatman®No.1 濾紙で濾過し、最初の 3~5 mL を捨てた後の濾液を回収して得た清澄上清を分析に用います。必要に応じて蒸留水で便宜希釈します。

NOTE: 使用する出発材料の量や容量は、試料の分析対象物含量に応じて適宜調整して下さい。

#### (k) 尿や血清など体液試料中のクエン酸の定量

一部の体液試料では、希釈以外の前処理なしで直接分析が可能なものがあります。そうでない場合、過塩素酸またはトリクロロ酢酸の何れかによる除タンパクが必要になることがあります。

等量の氷冷した1M過塩素酸を混合しながら添加し、除タンパクします。試料の一部を 1,500×g で10分間遠心分離するか、あるいは Whatman®No.1 濾紙で濾過し、最初の 3~5mL を捨てた後の濾液を回収して得た清澄上清を分析に用います。必要に応じて蒸留水で便宜希釈します。あるいは、過塩素酸の代わりに 50% (w/v) のトリクロロ酢酸を使用します。

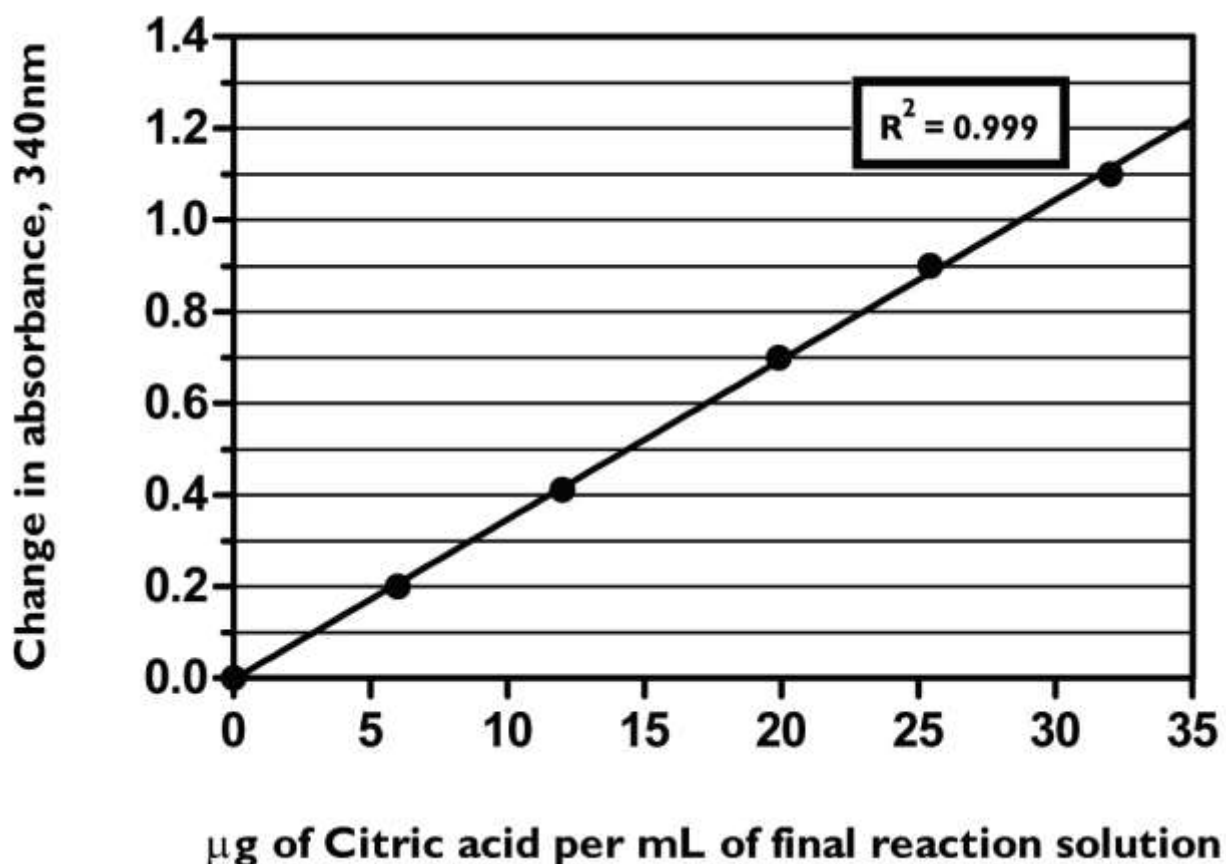


図 1. K-CITR キットによる検量線。光路長 10mm、25℃、5分反応。

## 文献 - REFERENCES -

Mollering, H. (1989). Citrate. *“Methods of Enzymatic Analysis”*  
(Bergmeyer, H. U., ed.), 3rd ed., Vol. VII, pp. 2-12, VCH Publishers (UK) Ltd.,  
Cambridge, UK.

---

# 日本バイオコン株式会社

## 名古屋本社

〒454-0852 名古屋市中川区昭和橋通三丁目 23 番地1 バイオコンビル

TEL 052-661-8105 (代表) FAX 052-659-0888

**TEL 052-659-4898 (試薬担当直通)**

**E-mail : [bj-megazyme@biocon.co.jp](mailto:bj-megazyme@biocon.co.jp)**

**Homepage : <http://www.biocon.co.jp>**

---

この小冊子に記載されている情報は、当社が知る限りにおいて事実かつ正確に記載されていますが、使用条件が当社の管理範囲外であるため、本文中にどのような推奨や示唆があったとしても、如何なる使用も特許を侵害しないということを保証しているものではありません