

平成12年度

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究

## 重点研究報告書

### 第2分野

生体機能調節等の解明に関する研究

# 目 次

文献No	課題番号			
20000937A	21008	血管壁細胞の抗血栓性機能の制御機構の解明と新規抗血栓薬の開発	加藤 久雄	1
938A	21019	組織内脂肪蓄積の予防及びGLUT4の発現増加を目指したインスリン抵抗性治療法の研究	江崎 治	14
939A	21045	慢性呼吸器疾患の発症機構の解明と医療への応用	斎藤 博久	18
940A	21052	閉経後骨粗鬆症の発症機構の解明とその予防と治療薬に関する研究	宮浦 千里	25
942A	21067	細菌感染に関与する病原遺伝子の発現機構の解明とその制御法の開発	渡辺 治雄	33
943A	21073	脳循環障害による神経細胞死の発症機序の解析と治療法の開発	内村 英幸	38
944A	21079	疾患モデルマウスを用いたβ-ガラクトシドシスの病態解析と治療への応用	松田潤一郎	46
945A	21081	精神疾患の分子メカニズムの解明と新しい診断・治療法の開発への応用	西川 徹	53
946A	21086	新しい生体防御調節物質の機能と作用の解析	鈴木 和男	60
948A	21089	感染症が誘発する自己免疫疾患病態の解明とその医療への応用に関する研究	大川原明子	68
949A	21092	生体膜脂質を介する細胞機能調節機構の解明とその医療への応用	西島 正弘	80
950A	21096	免疫・内分泌系による神経系の障害機構の解明とその制御	田平 武	88
951A	21102	移植免疫寛容とマイクロキメリズムに関する基礎的研究	木村 廣光	92
952A	21104	G蛋白質共役型受容体の個体レベルでのゲノム機能評価	辻本 豪三	98
953A	21107	難治性腎疾患の病態解明と医療への応用に関する研究	藤本純一郎	111
954A	21110	食細胞による感染防御機構の解明と医療への応用	綱脇 祥子	118
955A	21121	抗酸化機能調節に及ぼす運動と栄養の影響に関する研究	樋口 満	126
956A	21130	神経変性疾患における神経細胞死の分子機構の解析	桃井 隆	134
957A	21142	C型肝炎ウイルスに対するインターフェロン(IFN)の治療効果を増強する新薬の開発研究	小長谷昌功	144
958A	21150	グリア細胞の機能調節による神経疾患治療法の開発	高坂 新一	149
959A	21166	新規破骨細胞形成抑制因子(OCIF)とそのリガンドである破骨細胞分化因子(ODF)の生理的役割の解明と医療への応用	高橋 直之	160
960A	21177	コレステロール代謝・動脈硬化関連遺伝子の発現調節因子の検索	松本 明世	167
961A	21179	血圧調節物質・動脈硬化起因物質などに関する分子生物学的、生化学的研究	南野 直人	178
964A	21215	アトピー性皮膚炎自然発症(NC)マウスを用いた皮膚掻痒症の発症機序の解明と新規治療薬の創製	廣田 直美	183
965A	21224	ヒト血液細胞情報伝達の解明とオリゴヌクレオチドを用いた治療法の開発	湯尾 明	193
966A	21225	癌化とウイルス感染を制御する細胞内情報伝達分子を標的とする薬剤の探索	松田 道行	200

20000969A	21228	細胞内シグナル伝達の解明による創薬シーズの探索	上原 至雅	……	204
968A	21234	スフィンゴ脂質の情報伝達の研究と抗血栓症薬開発	望月 直樹	……	208
969A	21279	中枢神経系におけるATP受容体の機能の解析と医療への応用	井上 和秀	……	213
941A	22055	宿主の防御機能動態と感染機構の解明と医療への応用	高津 聖志	……	221
949A	22088	ビタミンE欠乏性脊髄小脳失調症の病態解明と治療法の確立に関する研究	水澤 英洋	……	228
962A	22183	炎症・アレルギー性疾患の発症機構の解明と医療への応用	清水 孝雄	……	233
963A	22194	コレステロール代謝を標的とした抗動脈硬化薬開発のための基盤研究	新井 洋由	……	237

## 疾患モデルマウスを用いた $\beta$ -ガラクトシドーシスの病態解析と治療への応用

所属 国立感染症研究所 獣医科学部  
研究者 松田 潤一郎

### 分担研究者

- |                                |       |
|--------------------------------|-------|
| (1) 国際医療福祉大学臨床医学研究センター         | 鈴木 義之 |
| (2) (株)日本医科学動物資材研究所            | 日柳 政彦 |
| (3) 旭化成工業(株)ライフサイエンス総合研究所開発研究所 | 白岩 和己 |

### 要旨

正常ヒト $\beta$ -ガラクトシダーゼ( $\beta$ -Gal)トランスジーンによる $\beta$ -Gal KO マウスの病態回復に成功した。ヒト変異型 $\beta$ -Gal のみを発現するヒト型モデルマウスを作製した。モデル細胞/動物系において低分子化合物による治療法の可能性を示した。

### 1. 研究目的

複合糖質糖鎖の分解酵素の遺伝的欠損により、多くのリソソーム性蓄積症がヒトの難病として知られており、有効な治療法がなく致命的な経過をとるものが多い。典型的なリソソーム性蓄積症である $\beta$ -ガラクトシドーシスは、新しく提唱された疾患概念であり、酸性 $\beta$ -ガラクトシダーゼ( $\beta$ -Gal) 遺伝子の異常に基づく2つの先天代謝異常症、すなわち GM1 ガングリオシドーシスとモルキオB病を包含する。前者は主として中枢神経症状を呈し、発症の時期や臨床症状などから乳児型、幼児型、成人型に分類され、また後者は骨軟骨症状を主として示し神経症状は示さないなど、多様な臨床症状を呈する。私達は既に、 $\beta$ -Gal ノックアウト(KO)マウスを作成し、最も重篤な GM1 ガングリオシドーシス乳児型のモデルになることを明らかにしており、本研究では、さらに多様な臨床症状に対応するモデルマウスを作出し、この難病の病態発現の解明と、新たな治療法の開発を行うことを目的とする。本研究により、多様な病態を示すモデル動物が作成されれば、病因解明が進み、それぞれに対応した有効な治療法が開発されることが期待される。本年度は、C57BL/6 コンジェニック系 $\beta$ -GalKO マウスの蓄積物質の解明を進めるとともに、GM1 ガングリオシドーシスの幼児型、成人型に対応した残存酵素活性の認められるヒト変異 $\beta$ -Gal トランスジーンを $\beta$ -GalKO の遺伝的背景に導入し、多様な病型を示すヒト型モデルマウスの作製を行った。これらの残存活性を示す異常酵素の活性を上昇させることを期待し、低分子化合物による治療法開発を、モデル細胞、モデルマウスを用いて開始した。さらにトランスジーンによる遺伝子治療の試みとして、ヒト正常 $\beta$ -Gal 高発現 Tg マウスと $\beta$ -GalKO マウスの交配をすすめ、 $\beta$ -GalKO バックグラウンドへのトランスジーンの導入を行い、病態解析を行った。

### 2. 研究方法

#### (1) $\beta$ -GalKO コンジェニック系の系統維持と供給

C57BL/6 コンジェニック系 $\beta$ -GalKO マウスの作製は、マイクロサテライトマーカー検索などにより、C57BL/6 との戻し交配8世代(N8)にて、実質的に完了しているが、さらに精度の高いコンジェニック系とするため、さらに戻し交配を続けた。N8およびN14世代にてヘテロ欠損マウス同士の交配からホモ欠損KO マウスを得、ホモヘテロ系(ホモとヘテロの交配系)、ホモ系(ホモ同士の交配系)を作製し、系統維持、供給を行った。なおホモ個体、ヘテロ個体の判定は、尾の生検材料の $\beta$ -Gal 酵素活性を測定すること、およびPCRにてneo 遺伝子の有無を判定することによって行った。なお、動物飼育はSPF条件下で行った。

#### (2) $\beta$ -GalKO コンジェニック系の脂質分析

N8世代由来のコンジェニックマウス6か月齢を用い、脳と肝臓のガングリオシドGM1およびアシアロGM1の定量を行った。常法に従い、大脳からガングリオシド画分および中性糖脂質画分を得、薄層クロマ

トグラフィーはHPTLCプレートを用いて行った。展開溶媒には、クロロホルム-メタノール-0.2%CaCl<sub>2</sub> (60 : 35 : 8, v/v) あるいはクロロホルム-メタノール-0.2%CaCl<sub>2</sub> (65 : 25 : 4, v/v) を用い、検出試薬として、ガングリオシドにはレゾルシノール-塩酸試薬を、中性糖脂質にはオルシノール-硫酸試薬を使用した。

### (3) ヒト正常型β-Galトランスジーンによるβ-GalKOマウス治療実験

昨年度までに作製されたヒト正常β-Gal過剰発現 Tg マウス (CG35) をβ-GalKO マウスと交配し、KO 遺伝子ホモでトランスジーンを持つマウスの作出を行った。マウスβ-Gal KO 遺伝子座 (エクソン 15 に neo 遺伝子が挿入されている) およびヒトβ-Gal トランスジーン の判定は、それぞれ特異的なプローブを用いサザン解析によった。すなわち尾の DNA(3μg)を EcoR I で切断し、常法により電気泳動、プロッティングを行ない、<sup>32</sup>P でラベルした Neo 耐性遺伝子(pMC1Neo)/Tth111 I / Bam HI フラグメント 600bp とヒト正常型β-Gal cDNA 遺伝子 Pvu II / Hind III フラグメント 1.8kbp をプローブとして順次ハイブリダイゼーションを行い、BAS2000 によりシグナルを検出した。ヒトとマウスのβ-Gal はセルロースアセテート電気泳動-活性染色により判別した。すなわちマウス肝臓ホモジネイト(50mM Tris, 1mM EDTA, pH 7.5 を臓器と等量加えホモジナイズしたもの)の上清 (12,000rpm, 30 分遠心) 0.6μl をセルロースアセテート膜に塗布し、電気泳動 (180V, 30 分間。泳動バッファー, 0.25mM Tris, 200mM glycine, pH 8.45) した後、pH 4.2 の条件下で X-gal 染色を行った。病理学的検索は、常法に従った。

### (4) 多様なモデルマウスの作製

昨年度までに GM1 ガングリオシドーシス成人型変異β-Gal Tg マウス(I51T, GalA)が 3 系統、同幼児型β-Gal Tg マウス(R201C, GalB)が 2 系統、モルキオ B 型β-GalTg マウス(W273L, GalF)が 2 系統得られ、遺伝子発現が確認されている。これらの Tg マウスについてトランスジーンをホモ化するとともに、β-GalKO マウスと交配し、KO 遺伝子ホモで各種ヒト変異型β-Gal トランスジーンを持つマウスの作出を行った。

### (5) 低分子化合物による新たな治療法開発の試み

β-GalKOマウスの皮膚線維芽細胞を培養、SV40による株化を行い、これにヒトβ-ガラクトシドーシスの各病型に特異的な遺伝子を導入し、それぞれの細胞モデルを作成した。1-deoxy-galactonojirimycin (DGJ), N-(n-butyl)-deoxy-galactonojirimycin (NB-DGJ)を0.5 mMの濃度でモデル細胞培養液に4日間添加し、β-Gal活性増大効果を検討した。動物実験として、成人型Tgマウス1ラインおよび幼児型Tgマウス1ライン (C57BL/6を遺伝的背景とし、ともに内在性のマウス正常β-Gal遺伝子を持つ) および、対照としてC57BL/6マウスに、0.5 mM DGJ水溶液を飲水として1週間、自由摂取させた。各臓器のβ-Gal活性は人工基質4MU-β-galactosideを用いて測定し、3種類のマウスで投与の有無によるβ-Gal活性に対する効果を比較した。

## 3. 研究成果

### (1) β-GalKO コンジェニック系の系統維持と供給

コンジェニック系KOマウスは、ホモヘテロ系およびホモ系として維持し、N8由来の動物約120匹、N14由来の動物約50匹を生産し、供給することが出来た。ホモ系は、繁殖不良のものが見受けられるが、現在までに連続して繁殖維持することに成功している。またコンジェニック系マウスを、アメリカ1件、国内1件、分与することが出来た。

### (2) β-GalKOコンジェニック系の脂質分析

コンジェニック系はオリジナルの交雑系と比較して、GM1ガングリオシドーシスの発症、すわなち神経症状を呈し10か月齢までに死亡する点は、大まかには変わらない。ただし、コンジェニック系は交雑系に比べ、体重が少なく、平均寿命が若干伸びる傾向を示した。脳と肝臓の脂質分析では、脳のガングリオシドGM1はコンジェニック系、交雑系ともに、顕著な蓄積を示し、大差のない値を示したが、肝臓のGM1は、交雑系では顕著な蓄積を示したが、コンジェニック系では検出限度以下で蓄積は全く認められなかった (Fig. 1.)。一方、アジアロGM1については、脳において、交雑系ではGM1に匹敵する大量の蓄積を認めしたが、コンジェニック系では正常に比較して顕著な蓄積は明らかであるが、交雑系の2割程度の蓄積量に低下していた (Fig. 2.)。また、肝臓のアジアロGM1は、交雑系では顕著であるが、コンジェニック系では痕跡程度に低下していた (Fig. 2.)。

### (3) ヒト正常型β-Galトランスジーンによるβ-GalKOマウス治療実験

Tg マウスと $\beta$ -GalKO マウスを交配し、 $\beta$ -Gal KO マウスの遺伝的背景（マウス $\beta$ -Gal 遺伝子をホモで欠損する）にヒト正常型 $\beta$ -Gal トランスジーンをもつマウス（ $\beta$ -Gal KO/hGalTg マウス）が9匹（うちトランスジーンホモが3匹）得られた。 $\beta$ -Gal KO/hGalTg マウスは $\beta$ -Gal KO マウスに特徴的な神経症状は示さず、外見的に正常であり、繁殖能力も正常である。これらのマウスの尾の $\beta$ -Gal 活性（Fig. 3.）は、正常マウス（C57BL/6）の5倍（トランスジーン・ヘテロ）から10倍（トランスジーン・ホモ）に増大しており、脳、肝臓など調べた臓器ではすべて $\beta$ -Gal 活性の増大を認めた。また肝臓ホモジネートを電気泳動・活性染色したところ、マウスの $\beta$ -Gal は移動度が小さく、ヒト $\beta$ -Gal は移動度が大きいことから両者を区別することができた。その結果、 $\beta$ -Gal KO/hGalTg マウスでは、マウスの内在性 $\beta$ -Gal は発現しておらず、ヒト $\beta$ -Gal のみが発現していることが確かめられた（Fig. 4.）。病理学的な検索においては、7か月齢の $\beta$ -Gal KO マウスでは GM1 ガングリオシドーシスに特徴的な神経細胞（脳幹部、大脳皮質、視床、海馬）の膨化と空泡化が観察されたが、同月齢の $\beta$ -Gal KO/hGalTg マウスではこれらの異常は認められなかった。なお、検索した一般臓器については両者に明らかな異常は認めなかった。6か月齢マウスの脳の脂質分析では、 $\beta$ -Gal KO マウスはガングリオシド GM1 とアシアロ GM1 の顕著な増大を示したが、 $\beta$ -Gal KO/hGalTg マウスでは GM1 は正常コントロールマウスと同程度の量であり、アシアロ GM1 はコントロールマウスと同じく検出限界以下であった（Fig. 5.）。

#### （4）多様なモデルマウスの作製

Tg マウスと $\beta$ -Gal KO マウスを交配することによって内在性のマウス $\beta$ -Gal 遺伝子を欠損しヒト変異 $\beta$ -Gal 遺伝子のみを持つモデルマウスの作出を進めたところ、GM1 ガングリオシドーシス成人型 I51T 変異遺伝子をもつ Tg/KO マウスが2系統、幼児型 R201C 変異遺伝子をもつ Tg/KO マウスが1系統得られた。これらのマウスの尻尾の酵素活性は、それぞれ正常マウスの7%、84%、125%を示し、各系統によって変異酵素の発現量に差が認められた（Fig. 6.）。

#### （5）低分子化合物による新たな治療法開発の試み

低分子化合物 DGJ および NB-DGJ を 0.5 mM の濃度で培養細胞培養液に直接添加した場合、モデル細胞の活性上昇がみられた。この条件下では GM1 ガングリオシドーシスに特有な遺伝子変異（R201C, I51T, R201H, R457Q）の発現酵素がモルキオ B 病に特有な変異（W273L, Y83H）の発現酵素よりもより高度の活性発現を示した。一方動物実験では、0.5mM DGJ、1週間の投与により、成人型 Tg マウスの一部の組織（とくに筋肉）において $\beta$ -Gal 活性が非投与群に比べ増加する傾向が認められたが、中枢神経系での活性増大は認められなかった。幼児型 Tg マウスについては、中枢神経系を含む全ての組織で DGJ による活性増大効果は認められなかった。

## 4. 考察

$\beta$ -GalKOマウスはGM1ガングリオシドーシスモデルとして大変有用であるが、いままで遺伝的背景が3種類の系統（C57BL/6、CBA、ICR）の交雑系であったため、免疫系など系統間差を考慮しなければならない形質については、詳細な検討が出来ない状態であった。本研究において、 $\beta$ -GalKOマウスのC57BL/6コンジュニク化に成功し、実験モデル動物としてより有用な系統として確立した。本年度は、海外1件、国内1件につき、このコンジュニク系を分与することが出来、より有効な利用が期待される。

本コンジュニク系の発症時期や繁殖能力などについては、いままでの交雑系と大差ないものと思われるが、詳細な検討がさらに必要であろう。脂質解析によると、コンジュニク系の肝臓においてGM1の蓄積の低下が認められた。肝臓についてはGM1の合成系にマウス系統間に差があるとの報告から、ある程度推測されたものであり、C57BL/6では肝臓のGM1合成が無いと考えられることと良く一致していると思われた。アシアロGM1はコンジュニク系で脳、肝臓ともに低下していた。アシアロGM1の合成系については系統差の報告が無く、今回の報告が初めてのケースであり、興味を持たれる。

ヒト $\beta$ -Gal トランスジーンを GM1 ガングリオシドーシスモデルマウスに導入して回復実験を行ったところ、神経症状を示さなくなり、中枢神経系の病理学的な異常および脂質蓄積も消失した。ヒト $\beta$ -Gal トランスジーンはモデルマウスで発現し、マウス $\beta$ -Gal の代わりにヒト $\beta$ -Gal が正常な酵素としてリソゾーム内で働き、基質を分解することにより酵素欠損を補い、治療効果を示したと考えられた。また、このマウスはヒト $\beta$ -Gal のみを発現する「ヒト型マウス」として、ヒト $\beta$ -Gal の生体での機能や動態の解明に役立つものと期待される。

マウスの内在性 $\beta$ -Galを持たず、GM1 ガングリオシドーシスの幼児型、成人型に対応した残存酵素活性の認められるヒト変異 $\beta$ -Galのみを発現するマウスが3系統得られた。これら3系統のマウスは、ヒト変異酵素の発現の程度に違いがあり、発症時期、重症度の異なる多様な病態を示す新たな疾患モデルとなるものと思われる。今後、これらのマウスの病態解析が待たれる。

低分子化合物による新たな治療法開発の試みとして、今回、低分子ガラクトース類似化合物を用いたところ、いくつかの変異 $\beta$ -Galの活性化に効果があることが、変異遺伝子導入マウス細胞について確認できた。さらにヒト変異型酵素を発現するTgマウスを用いた検定系において、DGJが一部の組織において成人型変異 $\beta$ -Galの活性上昇をもたらしたものと考えられ、治療薬としての可能性が示唆された。しかしDGJの活性化効果は $\alpha$ -ガラクトシダーゼに対する効果の10-50分の1であり、薬剤としてヒト患者に投与するためには、新しい化合物のスクリーニング・検索が必要であることがわかった。そこでさらに、遺伝性 $\beta$ -Gal欠損症の治療薬としてのガラクトース誘導体のスクリーニングを継続中である。今回のマウス検定系は、マウス正常 $\beta$ -Galとヒト変異酵素の両者を発現するTgマウスを用いたが、今後、すでに作出されたTg/KOマウスを用いることでより精細な検討が可能となるであろう。

## 5. まとめ

GM1 ガングリオシドーシスの有用なモデルである $\beta$ -GalKOマウスのコンジュニック系を生産供給することが出来た。コンジュニック系は、神経症状を呈し10か月齢までに死亡するなどの点は、交雑系と同様であるが、脳および肝臓においてアシアロ GM1 の蓄積の低下が認められ、脂質合成系の系統差が推測された。ヒト $\beta$ -GalトランスジーンをGM1 ガングリオシドーシスモデルマウスに導入して回復実験を行ったところ、神経症状を示さなくなり、中枢神経系の病理学的な異常および脂質蓄積も消失し、治療効果が得られた。多様な臨床型に対応するモデル動物となることを期待し、GM1 ガングリオシドーシス成人型、幼児型に認められるヒト変異 $\beta$ -Galを発現するヒト型モデルであるTg/KOマウスを作製した。GM1 ガングリオシドーシスの新たな治療法開発を開始し、モデル細胞/動物系において低分子化合物の有効性を示した。

## 6. 研究発表

- 1) Ishii S, Suzuki Y, Fan J-Q: Role of Ser-65 in the activity of  $\alpha$ -galactosidase A: Characterization of a point mutation (S65T) detected in a patient with Fabry disease. *Arch Biochem Biophys* 377: 228-233, 2000.
- 2) 長瀬裕美、持田慶司、中平美穂、野口章、山本美江、高野薫、野口洋子、鈴木治、大島章弘、小倉淳郎、松田潤一郎、鈴木義之、ヒト変異型 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子導入による $\beta$ -ガラクトシドーシスモデルマウス作成の試み。日本疾患モデル学会記録、16: 25(abstr), 2000.
- 3) Suzuki Y, Oshima A, Nanba E:  $\beta$ -Galactosidase deficiency ( $\beta$ -galactosidosis): GM<sub>1</sub>-Gangliosidosis and Morquio B disease. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Vogelstein B (eds): *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th ed, McGraw-Hill, New York, 2001.
- 4) 山本美江、長瀬裕美、野口章、持田慶司、中平美穂、高野薫、野口洋子、鈴木治、大島章弘、小倉淳郎、松田潤一郎、滝本一広、伊藤雅之、鈴木義之、GM1ガングリオシドーシスモデルマウスへのヒト正常型 $\beta$ -ガラクトシダーゼトランスジーン導入と解析。日本疾患モデル学会記録、印刷中、2001.
- 5) Itoh M, Matsuda J, Suzuki O, Ogura A, Oshima A, Tai T, Suzuki Y, Takashima S: Developmental pathology of mice with targeted disruption of the  $\beta$ -galactosidase gene: a model of human GM<sub>1</sub>-gangliosidosis. *Brain Dev*, in press, 2001.
- 6) Tominaga L, Ogawa Y, Taniguchi M, Ohno K, Matsuda J, Oshima A, Suzuki Y, Nanba E: Galactonojirimycin derivatives restore mutant human  $\beta$ -galactosidase activities expressed in fibroblasts from enzyme-deficient knockout mouse. *Brain Dev*, in press, 2001.

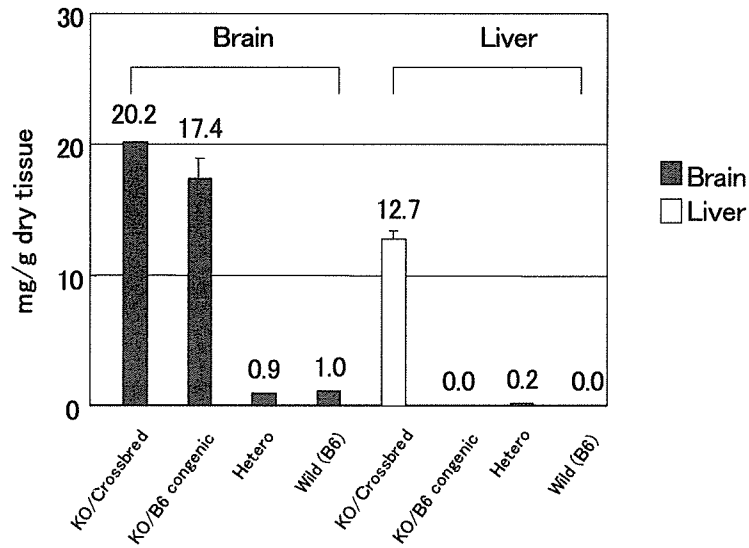


Fig.1 Effects of genetical background on ganglioside GM1 content in  $\beta$ -Gal KO mice.

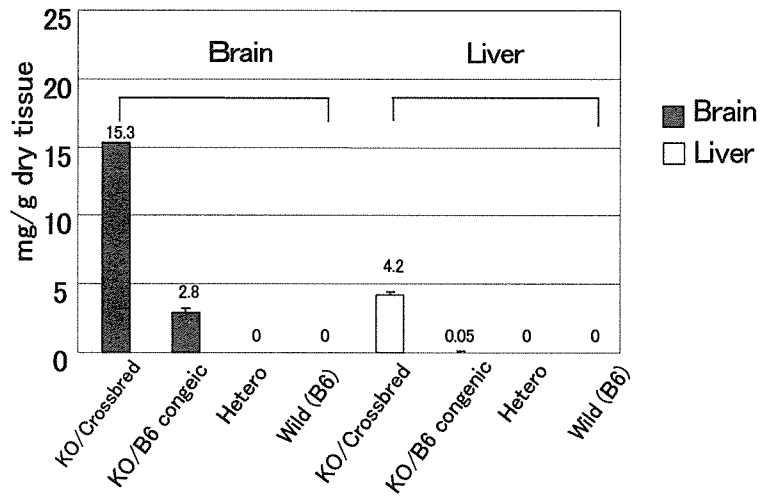
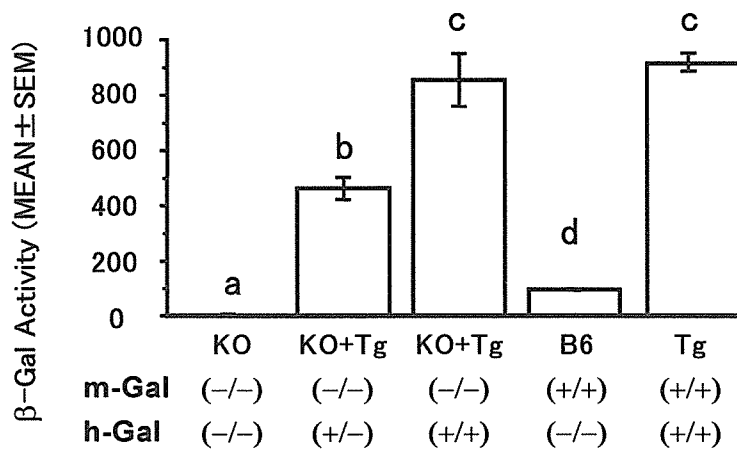


Fig.2 Effects of genetical background on asialo GM1 content in  $\beta$ -Gal KO mice.





Different labels are significantly different by ANOVA ( $p < 0.01$ )

Fig.3  $\beta$ -Gal activity in tails from  $\beta$ -Gal KO/TG(wild-type human  $\beta$ -Gal) mice.

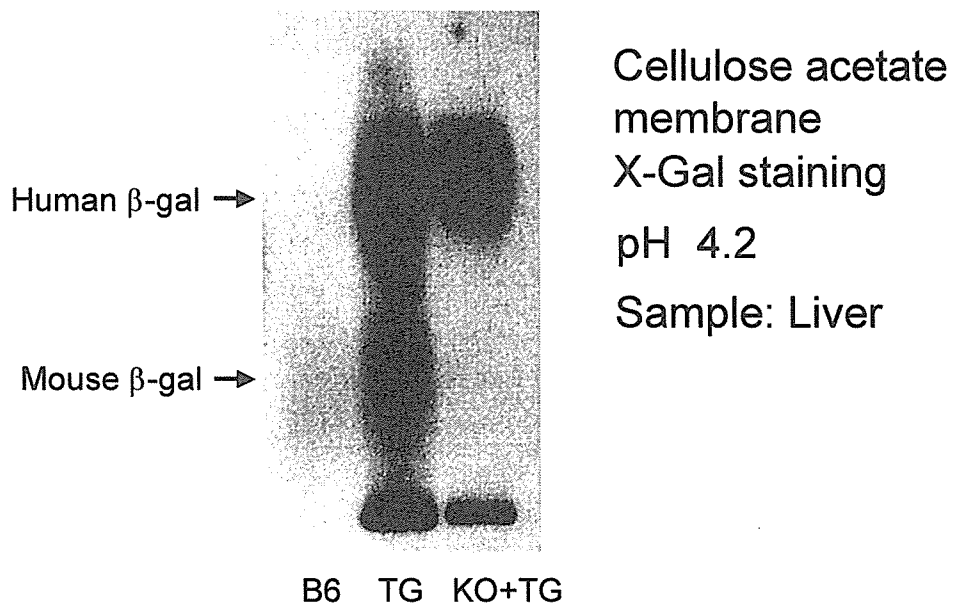


Fig.4 Electrophoresis of  $\beta$ -Gal from  $\beta$ -Gal KO/TG(wild-type human  $\beta$ -Gal)mice.

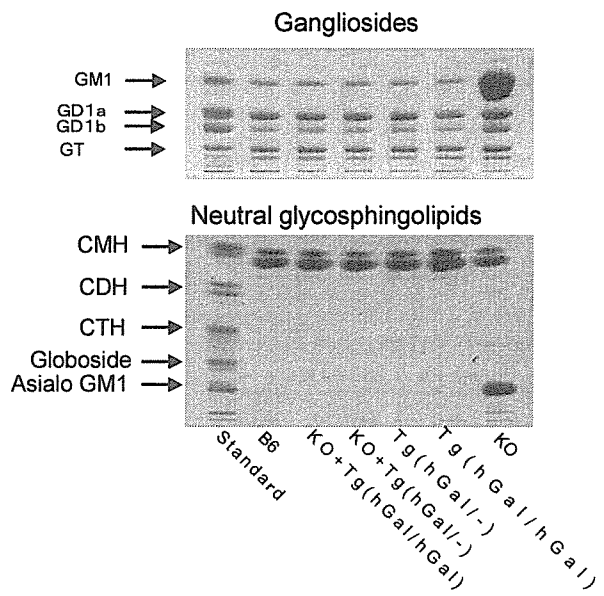


Fig.5 HPTLC of brain lipids from  $\beta$ -Gal KO/TG(wild-type human  $\beta$ -Gal)mice.

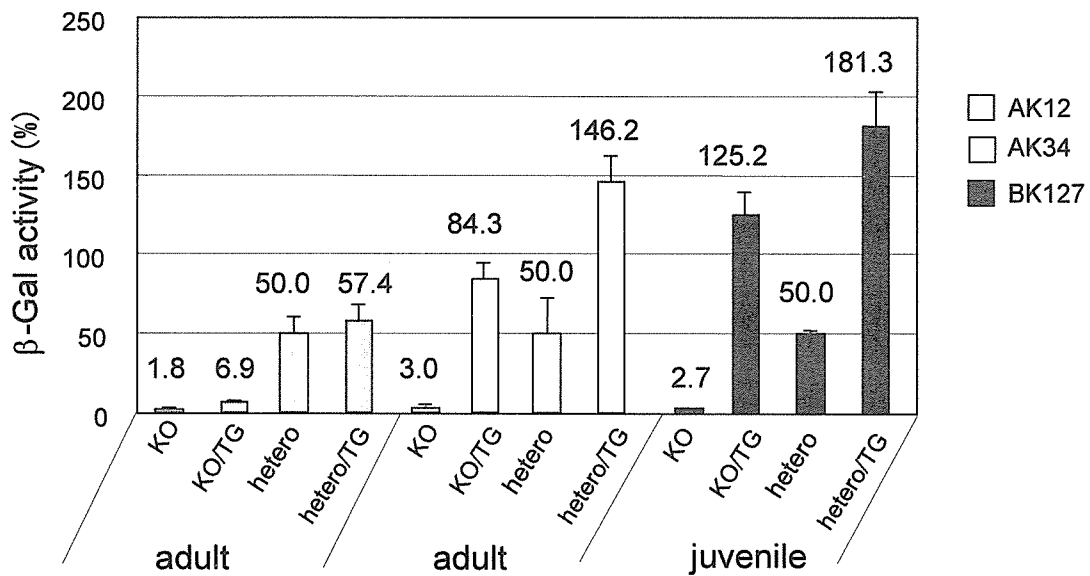


Fig.6  $\beta$ -Gal activity in tails from  $\beta$ -Gal KO/TG(mutant human  $\beta$ -Gal) mice.

---

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究  
重点研究報告書

第2分野

生体機能調節等の解明に関する研究

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社