

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

若手研究者奨励研究報告書

# 目 次

## 課題番号

### 第1分野

20000	13001	アドレノメデュリン投与による重症心不全治療の臨床評価	永谷 憲歳	……	1
1009A	13002	子宮体癌に対するヒト型モノクローナル抗体の作製	福地 剛	……	5
1008A	13003	新しい変異導入法の開発による神経疾患モデルマウスの樹立	笹岡 俊邦	……	10
1010A	13004	病原細菌のコミュニケーションシステムを標的とした医薬品の開発	阿部 章夫	……	15
1006A	13005	糖部立体配座を固定した人工核酸によるアンチセンス医薬品の開発	小比賀 聡	……	20
1007A					

### 第2分野

1011A	23001	慢性C型肝炎に対するインターフェロン治療効果に関与する宿主因子の解析と医療への応用	土方美奈子	……	29
1012A	23002	ゲノム情報に基づいた移植免疫機構の解明と免疫抑制療法	梨井 康	……	35
1016A	23003	ヒトヘルペスウイルス8による悪性腫瘍発症機構の解明と医療への応用	片野 晴隆	……	42
1013A	23004	血管内造血機構の解明と臍腸間膜動脈より新規造血幹細胞因子の単離	高倉 伸幸	……	47
1014A	23005	BRS-3安定発現細胞系を用いた新規摂食調節ペプチドの同定と病態生理学的意義の解明	宮里 幹也	……	52
1015A	23006	ATP受容体を介した痛み情報伝達機序の解明と医療への応用	小泉 修一	……	57
1018A	23007	トリプトファンによる細胞性免疫の制御	五條 理志	……	61
1019A	23008	気管支喘息における気道リモデリングの制御についての検討	中尾 篤人	……	66
1017A	23009	顔面神経再生に際して発現制御を受ける遺伝子データベースの構築	赤澤 智宏	……	69

### 第3分野

1020A	33001	循環器病治療薬開発に不可欠な小動物における循環動態テレメトリシステムの開発	佐藤 隆幸	……	73
1022A	33002	有機アニオントランスポーターを介した小腸および腎臓における排出・分泌機構	崔 吉道	……	77
1021A	33003	組換えヒトP450酵素の代謝反応を利用した医薬品等の評価方法の開発	山崎 浩史	……	81

### 第4分野

1025A	43001	腹膜透析の重篤な合併症である硬化性被嚢性腹膜炎 (Sclerosing Encapsulating Peritonitis) の診断と治療に関する研究	平原 一郎	……	89
1023A	43002	多発性硬化症における病原性T細胞特異的抑制方法の検討	三宅 幸子	……	98
1024A	43003	熱帯病に対する新たな治療薬の開発に関する研究	小出 達夫	……	103

20000	第5分野		
1026A	53001	カルボシラン dendリマーを基本骨格としたペロ毒素中和剤の開発	西川喜代孝 …… 109
1027A	53002	新規抗酸化酵素ペルオキシレドキシンを標的とする抗マラリア薬の開発に関する研究	河津信一郎 …… 113
1028A	53003	Non-typable Haemophilus influenzae 由来リポオリゴ糖抗原に対するペプチドミミックのワクチン応用についての研究	橋本 雅仁 …… 119
1029A	53004	RNAヘリカーゼを標的とする抗ウイルス剤の開発	清水 博之 …… 124
1030A	53005	薬用植物の分子エンジニアリングによる抗酸化物質生産の改良	山崎 真巳 …… 132
	第6分野		
1031A	63001	分子間相互作用制御による高度安定型タンパク質製剤の設計	伊豆津健一 …… 137
1032A	63002	生分解性を有する新規な化学合成ハイドロゲルの開発と組織再建スキャホールドへの応用	山岡 哲二 …… 140
1033A	第7分野		
	73001	ヒト破骨細胞と骨芽細胞培養系を用いた薬物の有効性と安全性に関する検討	和田 誠基 …… 151

## 慢性C型肝炎に対するインターフェロン治療効果に関与する宿主因子の解析と医療への応用

所属 東芝病院 研究部

(平成12年4月1日～平成12年4月30日)

国立国際医療センター研究所 呼吸器疾患研究部

(平成12年5月1日～平成13年3月31日)

研究者 土方 美奈子

### 要旨

慢性C型肝炎患者に対するインターフェロン治療効果に関連する因子を検討したところ、HCV 遺伝子型が1bの場合はウイルス側の因子である ISDR アミノ酸変異数が治療効果と関連していたが、2a, 2bの場合はMxAとの関連がみられた。

### 研究目的

C型肝炎ウイルス(hepatitis C virus, HCV)持続感染による慢性肝炎患者は、慢性肝炎の進行とともに次第に肝硬変及び肝細胞癌を発病し、死に至る場合が多い。C型慢性活動性肝炎に対する治療としては、先進諸国ではインターフェロンの投与が一般的に行われているが、HCV が完全に排除されて著効が得られる患者は全体の3割程度にすぎない。特に日本で感染者の7割以上を占める HCV 遺伝子型が1bであるケースでは、インターフェロンによる著効率が更に低い。インターフェロン治療は費用が高額である上に、重篤な副作用が起こる場合もあり、インターフェロンがききやすいタイプの患者を選別する方法を開発し、治療効果の高いと予測される患者に対して重点的に治療を行う体制の確立は医療上の急務である。現在のところ日常の臨床現場では血中HCV ウイルス量の定量及びHCV セロタイプの判定などウイルス側因子の検査が治療前に行われているが、それだけでは治療効果の予測は不十分であり、当然の事ながら、宿主側にもインターフェロン治療のききやすさを規定する因子が存在する事がされる。この宿主側因子を解明し、ウイルス側因子とあわせて個々の患者のインターフェロン治療効果予測を行えば、無益な治療を行う事による医療経済的損失及び患者の負担を回避する事につながると考えられる。

インターフェロン治療効果を予測するウイルス側因子としては、HCV の血中ウイルス量 (少ない方が効きやすい) 及び遺伝子型 (1b 型より 2a・2b 型の方が効きやすい)、また HCV 遺伝子型が1b の場合では HCV の NS5A 蛋白上に存在する interferon sensitivity determining region (ISDR) のアミノ酸変異数 (変異数の多い方が効きやすい) の三つがよく知られている。宿主側因子としては、近年のヒトゲノム研究の急激な進展から宿主遺伝子の単塩基多型 (single nucleotide polymorphism, SNP) の解析による検討が注目される場所である。我々は1998年にマンノース結合レクチン(mannose binding lectin, MBL)の遺伝子多型とインターフェロン治療効果の関連を検討して報告した。MBLはinnate immunity (自然免疫) を代表する血清レクチンの一つで、細菌・ウイルス等の表面糖鎖を認識後、補体系を活性化することで生体防御に働いているが、ヒトのMBL遺伝子には多型性があり、MBL欠損・低下を来す遺伝子型を持つ場合には種々の病原体に易感染傾向がみられる事が報告されている。我々が健常者とインターフェロン治療歴のあるC型肝炎患者を対象としてMBL遺伝子型を決定したところ、インターフェロン治療著効群では欠損・低下型のMBL遺伝子を持つ者が有意に少ない事を見いだした(J. Hepatol. 29, 695-700, 1998)。更に我々はインターフェロンにより誘導される蛋白の一つでインフルエンザウイルスなどに抗ウイルス効果を持つ事で知られるMxA蛋白に注目し、MxA遺伝子のプロモーター領域の遺伝子解析からSNPを発見し、インターフェロン治療効果との関連を検討して報告した(Intervirology 43:124-127, 2000)。このG/T SNPはISRE (interferon stimulated response element) consensus sequence内に存在し、Tの方がconsensus

sequence に一致するのでプロモーター活性が強いのではないかと予想されている。

今回の研究では、上記の結果をふまえて慢性C型肝炎に対するインターフェロン治療効果に関与する宿主側因子・ウイルス側因子を検討した。

## 研究方法

### <材料>

解析の対象は、既報 (J. Hepatol. 29, 695-700, 1998, Intervirology 43:124-127, 2000) の患者群および健常対象者群で、A 群の既提供試料にあたる。インターフェロン治療を受けた慢性C型肝炎患者 159 名と検診受診者で肝機能異常がないと判定された健常者 104 名、計 263 名である。インターフェロン治療はすべて投与総量 300MU 以上であり、治療後 6 カ月以上血清ウイルス陰性かつ肝機能が正常であったものを著効と判定した。これらはいずれも東芝病院受診者で、倫理面への配慮としては DNA 解析を目的とした血液の提供を受ける場合には使用目的など必要事項を伝え同意を得た上で提供を受けてあり、また研究の倫理に関しては東芝病院遺伝子解析研究倫理委員会の審査を受け院長の承認を得たものである。

これらの対象について、既報の結果を以下にまとめる。

#### (1) *MBL* 遺伝子型 (J. Hepatol. 29, 695-700, 1998)

*MBL* の遺伝子型を決定し、*MBL* の低下・欠損をきたすハプロタイプ *LXPA* と *LYPB* を持たないもの (*HYPA/HYPA*, *HYPA/LYPA*, *HYPA/LYQA*, *LYPA/LYPA*, *LYPA/LYQA*, *LYQA/LYQA*) を YA タイプ、少なくともヘテロで持つもの (*HYPA/LXPA*, *LYPA/LXPA*, *LYQA/LXPA*, *HYPA/LYPB*, *LYPA/LYPB*, *LYQA/LYPB*, *LXPA/LXPA*, *LYPB/LXPA*, *LYPB/LYPB*) を XB タイプと分類した時に、以下のようにインターフェロン治療著効患者では無効患者に比べて XB タイプが有意に少なかった (Table 1)。

Table 1. *MBL* genotype frequencies compared between interferon-responders, nonresponders, and controls

<i>MBL</i>	著効患者 (n=52)	無効患者 (n=107)	健常コントロール (n=218)	p 著効 vs. 無効
XB タイプ	20 (39%)	65 (61%)	125 (57%)	0.0082
YA タイプ	32 (61%)	42 (39%)	93 (43%)	

#### (2) *MxA* プロモーター遺伝子-88 の G/T SNP (Intervirology 43:124-127, 2000)

この G/T SNP では、T は ISRE consensus sequence に合致するが G はしないので、G のほうが T よりインターフェロンによる *MxA* 蛋白の誘導が劣る事が予想される。G/G のホモ接合を持つものと G/T ヘテロ・T/T ホモを持つものの 2 グループに分けて検討したところ、インターフェロン治療著効患者では無効患者に比べて G/G が有意に少ない結果が得られた (Table 2)。

Table 2. *MxA* promoter genotype frequencies compared between interferon-responders, nonresponders, and controls

<i>MxA</i> promoter nt -88	著効患者 (n=52)	無効患者 (n=107)	健常コントロール (n=104)	p 著効 vs. 無効
G/G	16 (31%)	59 (55%)	54 (52%)	0.0039
G/T, T/T	36 (70%)	48 (45%)	50 (58%)	

### <方法>

*MxA* プロモーター-88 が G/G であるものと T/T であるもの各 7 例について、プロモーター領域から翻訳開始コドンの存在する exon5 まで約 6.5 kbp の増幅を行った。用いたプライマーは、*MxAPf*: 5' -ACA CAC CCG TTT CCA CCC TGG AGA GGC CAG-3' 及び *MxATGr*: 5' -TTT TGC GAT GTC CAC TTC GGAA AAC AAC CAT-3' で、TaKaRa LA Taq にて (98°C10 秒+72°C7 分) x35 サイクルの条件で行った。各増幅産物につき、プロモーター領域、exon1, 2, 3, 4 そして exon5 に含まれる開始コドンまで塩基配列の確認を行った。

*MxA* 遺伝子のプロモーター領域に発見した新たな SNP(C/A-123)について、263 名の対象について PCR

産物の RFLP(restriction fragment length polymorphism)にて決定した。具体的には、既報 (Intervirolgy 43:124-127, 2000) の 599bp の PCR 増幅産物を制限酵素 PstI で消化してエチジウムブロマイド染色アガロースゲル電気泳動を行い、-123 が C であれば 293bp, 155bp, 151bp に切断されるのに対し、-123 が A であれば 444bp, 155bp である事を利用して判定した。

ウイルス側の因子として、HCV 遺伝子型は既に決定されていたが、HCV 遺伝子型 1b の症例についてはインターフェロン治療前の血清を用いて ISDR 領域のアミノ酸変異数を決定した。血清 50μl から核酸を抽出し、既報(Hijikata et al Hepatology Research 11, 19-25, 1998)の方法で RT/nested PCR で HCV 遺伝子の ISDR を含む領域を増幅し、PCR 産物のダイレクトシーケンスにて塩基配列を決定した。

## 研究成果

*MxA* プロモーター-88 が G/G であるものと T/T であるもの各 7 例について、プロモーター領域から exon1, 2, 3, 4 そして exon5 は開始コドンまでの範囲で塩基配列の確認を行った結果、exon1 の+20 の塩基が G/G では C であるのに対して T/T では A である他に各 exon 内には SNP はなかった。しかし、*MxA* プロモーター領域内の-123 に新たな SNP を発見した (図1)。これは-88SNP が含まれる ISRE よりやや上流にあたる。

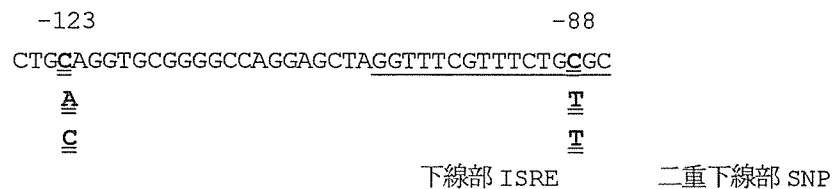


Figure.1 The SNPs in the promoter region of the *MxA* gene.

263 名全員について PCR 産物の PstI による RFLP にて-123 塩基について検討したところ、-88SNP が G である場合にはすべて-123SNP は C であったが、-88SNP が T である場合の 73%で-123SNP が A で 27%で C であった。-123SNP について著効・無効群で解析したが、-88SNP とほぼ同様な結果が得られた (Table 3)。

Table 3. *MxA* promoter genotype frequencies compared between interferon-responders, nonresponders, and controls

<i>MxA</i> promoter -123	著効患者 (n=52)	無効患者 (n=107)	健常コントロール (n=104)	p 著効 vs.無効
C/C	21 (40%)	70 (65%)	69 (65%)	0.0028
C/A, A/A	31 (60%)	37 (35%)	36 (35%)	

慢性C型肝炎に対するインターフェロン治療効果は、HCV の遺伝子型によって異なる事が知られている。今回の対象症例でも HCV 遺伝子型 1b では 103 例中著効例は 18 例と効きにくく、反対に HCV 遺伝子型 2a,2b では 45 例中 34 例が著効であった。そこで、HCV 遺伝子型により 1b と 2a,2b に対象を分けて検討した。(Table 4, 6)

Table 4. *MBL* and *MxA* promoter genotype frequencies compared between interferon-responders, nonresponders with HCV genotype 1b

<i>MBL</i>	著効患者 (n=18)	無効患者 (n=85)	p
XB タイプ	6 (33%)	52 (61%)	0.031
YA タイプ	12 (67%)	33 (39%)	

<i>MxA</i> promoter -88	著効患者 (n=18)	無効患者 (n=85)	p
G/G	5 (28%)	45 (53%)	0.093* *Yates' adjustment
G/T, T/T	13 (72%)	40 (47%)	

<i>MxA</i> promoter -123	著効患者 (n=18)	無効患者 (n=85)	p
C/C	9 (50%)	54 (64%)	0.28
C/A, A/A	9 (50%)	31 (36%)	

このように 1b では C 型慢性肝炎全体で比べた場合より p 値が高くなり *MxA* に関しては有意差が得られなかった。HCV 遺伝子型が 1b の場合には、インターフェロン治療効果を規定するウイルス側の因子として ISDR のアミノ酸変異数が知られているので、103 例のうち治療前の血清が得られなかった 12 例（著効例 1 例、無効例 11 例）を除き、ISDR 領域の遺伝子配列を決定した。すると著効例 18 例ではその殆どが ISDR に多くのアミノ酸変異を持つ治療が効きやすいと考えられるタイプであり、著効例と無効例ではウイルス側の因子が大きく異なる事があきらかになった (Table 5)。

Table 5. Numbers of amino acid substitutions in the ISDR compared between responders and nonresponders.

ISDR	著効患者 (n=17)	無効患者 (n=74)	p
アミノ酸変異数 4 以上	12 (71%)	7 (9%)	<0.001* *Yates' adjustment
” 3 以下	5 (29%)	67 (91%)	

各症例別に検討すると、ISDR の変異数が 3 以下でも著効に至った 5 症例は、

YA かつ T/T : 1 例

YA かつ G/T : 4 例

LB かつ G/G : 1 例

であり、MBL、*MxA* とともに機能が良好と予想される症例が 5 例中 4 例と多いのに対し、ISDR の変異数が 4 以上でも無効であった 6 症例では、

LB かつ G/G : 4 例

LB かつ G/T : 2 例

YA かつ G/G : 1 例

と両方とも機能が劣ると予想される症例が 6 例中 4 例と多かった。

しかし、この ISDR の変異数が 4 以上でも無効であった 6 症例のうち 3 症例 (LB かつ G/G : 2 例、LB かつ G/T : 1 例) は、インターフェロン治療後の HCV の ISDR の変異数が 3 以下であった。治療前の変異型の ISDR の塩基配列に一致させた specific primers を 3 症例についてそれぞれ設定して治療後の血清から変異型のシーケンスの増幅を試みたが、いずれも陰性であったので、ISDR 変異型の HCV についてはインターフェロン治療で排除されたと考えられた。

次に HCV 遺伝子型 2a,2b の場合について検討した。

Table 6. MBL and *MxA* promoter genotype frequencies compared between interferon-responders, nonresponders with HCV genotype 2a/2b.

<i>MBL</i>	著効患者 (n=34)	無効患者 (n=21)	p
XB タイプ	14 (41%)	13 (62%)	0.14
YA タイプ	20 (59%)	8 (38%)	

<i>MxA</i> promoter -88	著効患者 (n=34)	無効患者 (n=21)	p
G/G	11 (32%)	14 (67%)	0.013
G/T, T/T	23 (68%)	7 (33%)	

<i>MxA</i> promoter -123	著効患者 (n=34)	無効患者 (n=21)	p
C/C	12 (35%)	15 (71%)	0.0092
C/A, A/A	22 (65%)	6 (29%)	

2a,2b 症例では *MxA* では有意差があるが、*MBL* では有意でなかった。これは 1b の場合とは逆の傾向である。

更に *MBL* と *MxA*-88 の各タイプを組み合わせで検討した。(表 7)

Table 7. Combinations of *MBL* genotypes and *MxA* promoter genotypes among the 3 groups.

MBL	<i>MxA</i> -88	健常コントロール n=104	HCV 遺伝子型 1b		HCV 遺伝子型 2a,2b	
			著効 n=18	無効 n=85	著効 n=34	無効 n=21
XB	G/G	31 (30%)	3 (17%)	24 (28%)	2 (6%)	10 (48%)
	G/T, T/T	50 (48%)	5 (28%)	49 (58%)	21 (61%)	7 (33%)
YA	G/G	23 (22%)	10 (56%)	12 (14%)	11 (32%)	4 (19%)
	G/T, T/T	23 (22%)	10 (56%)	12 (14%)	11 (32%)	4 (19%)
p		0.84	0.27*	0.13	0.076*	0.35*

\*With Yate' adjustment

HCV 遺伝子型 2a,2b の著効群で p 値が低い傾向があり、*MBL* が XB タイプでかつ *MxA*-88 が G/G であるものが非常に少ない事が注目される。

Table. 8 のように、2a,2b の著効・無効を *MBL* が XB タイプでかつ *MxA*-88 が G/G である群・それ以外の群に分けてオッズ比を算出すると、14.545 (信頼区間 3.397-62.288) となり、*MBL* 単独の場合のオッズ比 2.321 (信頼区間 0.761-7.080)、*MxA* 単独の場合のオッズ比 4.182 (信頼区間 1.338-13.073) と比べて高い値が得られた。

Table 8. Genotype frequencies of "XB and G/G" compared between responders and nonresponders of HCV genotype 2a/2b.

	著効患者 (n=34)	無効患者 (n=21)	p	オッズ比 信頼区間
XB かつ G/G	2 (6%)	10 (48%)	0.00095*	14.545 (3.397-62.288)
それ以外	32 (94%)	11 (52%)		

\*With Yate' adjustment

#### 考察

HCV 感染は内因性インターフェロンを誘導するので、HCV 感染時には肝組織での *MxA* の発現量が非感染に比べて増えている事が報告されている。慢性 C 型肝炎に対して治療目的にインターフェロンを投与した時には *MxA* 発現レベルは更に大きく増加する。1999 年に、慢性 C 型肝炎に対するインターフェロン治療を行った時に著効群と無効群を比較すると、著効群の方が *MxA* の発現量が有意に多いという結果が蛋白量及び mRNA 量で比較した実験から報告された。我々はこのようなインターフェロン投与時の *MxA* 発現量の違いが *MxA* 遺伝子のプロモーター領域の SNP に起因する可能性を考え検討したところ、ISRE 内にその機能が劣る可能性のある SNP を見だし、それをホモ接合(G/G)で持つものが著効患者には有意に少ない事を明らかにした。

しかし今回の検討で HCV 遺伝子型が 1b の場合にはウイルス側の因子が著効例と無効例で異なる事が明



らかになり、治療効果に強く関連するのは ISDR のアミノ酸変異数である事が判明した。1b 患者群については MxA の SNP の有意差が得られなかったのは、このようなウイルス側の因子の違いである可能性が高く、今後更に症例数を増やしてウイルス側の因子をそろえて比較できるようにする必要がある。ただ、治療前の ISDR 変異数が 4 以上で治療後が 3 以下であったケースでは、変異型 ISDR については著効が得られたと解釈できるので、ISDR の変異数を検討するには治療前・治療後両方のサンプルの解析を要する事も明らかになった。しかし、ウイルス側の因子が 1b に比べて比較的均一であると考えられる 2a,2b 群で有意差が得られているので、この SNP がインターフェロン治療効果に関わっている可能性は高いのではないかと考えられる。

この SNP が実際にプロモーター活性に違いをもたらすのかどうかを明らかにするため、各 genotype でインターフェロン投与時の MxA 発現量を定量比較する実験およびルシフェラーゼレポーターによるプロモーター活性の比較実験を開始した。今回得られたデータでは C/A で判定した場合と G/T で判定した場合で大きな違いがなかったが、-123 の C/A SNP と -88 の G/T SNP とどちらが実際にプロモーター活性に関わるのかも検討する予定である。

また、MxA が HCV に対して抗ウイルス効果を持つかどうかはわかっていない。ヒト MxA は *Orthomyxoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Bunyaviridae* のマイナス一本鎖 RNA ウイルスおよびプラス一本鎖 RNA ウイルスの *Togaviridae* に対してウイルス増殖の抑制効果がある事が知られている。ごく最近 DNA ウイルスとしては初めて B 型肝炎ウイルスの複製を MxA が阻害する事も報告された。HCV に対する効果が注目される場所であるが、HCV の培養細胞系は現在のところ HCV の複製レベルが低く、MxA の発現による阻害をみる系を組むのは困難である。培養系の改良とともに MxA の HCV に対する機能も解明する必要がある。

MBL 遺伝子型については、MxA の場合と逆に 1b では有意差が得られたが、2a,2b では有意差が得られていない。上述のような 1b におけるウイルス背景の相違を考えると既報のデータは再検討を要する。しかし、2a,2b において MBL の欠損・低下をきたす XB タイプと MxA-88SNP を併せて「G/G かつ XB」とすると MxA 単独の場合よりオッズ比が高くなったので、MBL の役割が否定されたわけではないと考えられる。これについても今後症例を増やした検討が必要である。

今回の検討では ISDR と治療効果には強い関連が認められたが、宿主因子に関しては「この症例については再治療を含め積極的に治療すべき」「この症例はインターフェロン治療は無益」などと臨床現場で指標となる程の予測効果をもったものはなかった。しかし、HCV に対してインターフェロンを投与した場合の効ウイルス効果に関連すると報告された宿主側の因子はこの 2 つの他にも存在し（文献的にはハプトグロビン遺伝子の SNP とインターフェロン治療効果の検討、インターフェロンレセプター遺伝子の発現量と治療効果の関連、low molecular mass polypeptides (LMP) 遺伝子の SNP との関連などが報告されている）、今後はウイルス側の因子及びこれらの宿主側の多因子を組み合わせた解析を行っていく必要があると考えられる。

## 結論

MBL 遺伝子型、MxA プロモーター遺伝子型と慢性 C 型肝炎に対するインターフェロン治療効果の関連を検討したところ、HCV 遺伝子型が 1b の場合はウイルス側の因子である ISDR アミノ酸変異数が治療効果と関連しているために宿主遺伝子型との関連が検討できなかったが、HCV 遺伝子型が 2a, 2b の場合は MxA との関連がみられた。

## 研究発表

なし

---

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究  
若手研究者奨励研究報告書

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