

平成13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1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

多剤耐性結核の診断と創薬探索技術としてのゲノム解析に関する研究

所 属 国立国際医療センター研究所
感染・熱帯病研究部
研究者 切替 照雄

分担研究者

- (1) ニッポンテクノクラスタ (株) 何 媛
- (2) 生化学工業(株)中央研究所 田中 重則

要 旨

最新のゲノム情報解析技術を用い感染症分野におけるポストゲノム創薬技術の応用開発を行なう。具体的には、DNA マイクロアレー法などを活用し、多剤耐性結核菌の迅速診断法を開発し、同時に新規の抗結核薬の標的となり得る菌体由来の分子種及び宿主側の分子種を探索する。本年度は、国立国際医療センター病院等から臨床分離株の薬剤耐性株を分離し、*rpoB*と *gyrA* 遺伝子変異を同定し、その情報を基に DNA マイクロアレーを作成した。また、リアルタイム PCR 用いた結核菌の早期薬剤耐性遺伝子診断法の新しい方法を開発する目的で、高感度検出が可能なプライマーの設計を実施した。結核菌の候補遺伝子として、全ゲノム解析の情報から、結核菌ゲノムに特異的にみられるトリプレットリピート配列をもつ PE 及び PE_PGRS ファミリーを同定した。また、宿主側の候補遺伝子として、CAP18、TACO、TLR4 及び TLR2 の遺伝子多型を検索した結果、アミノ酸置換を伴った遺伝子多型 4 個を見出した。

1. 研究目的

多剤耐性結核菌の出現は、21 世紀の医療にとって最も深刻な問題の一つである。多剤耐性結核は患者の治療を遅延させるばかりでなく、院内感染の原因ともなり、迅速な診断法の開発と新たな作用機序を持つ抗結核薬の開発が急務となっている。本研究では、DNA マイクロアレー法などのゲノム情報解析技術を駆使して多剤耐性結核の診断法を開発し、さらにこれらの技術をもとに新規の抗結核薬の標的となる分子の探索を行なう。幸い結核菌は全ゲノム配列が明らかにされており、またその薬剤耐性機構は比較的限定した遺伝子の変異であることが知られている。従って、多剤耐性遺伝子の迅速診断法の開発は大変有望な方法であると期待される。当センター病院とも共同で臨床応用を進め、本診断法の有用性を実証する。DNA チップを用いて新規の患者分離株を用いた迅速診断を試み、診察後少なくとも数日で判定が可能となった症例を報告できるようにする。この技術を応用して、抗結核薬の標的となる分子を結核菌と宿主細胞由来の両面から検索する。また、従来の結核菌薬剤感受性試験は長い日数を要するので、これに代わる迅速診断法をリアルタイム PCR を用いて確立させる。宿主側の因子としては、宿主細胞内抗菌物質である CAP18 蛋白遺伝子や結核感染と関連する宿主遺伝子群 (TACO、TLR2、TLR4) に関しても遺伝子多型を解析する。その結果を基に特定遺伝子の多型解析法を開発し、結核患者を含めた中規模の臨床研究を展開する。DNA チップ法はまた菌株間の遺伝子の比較に有用と考えられる。そこで弱毒と強毒株の遺伝子をこの方法で比較し結核の病原因子の探索を実施し、抗結核薬の標的分子を同定する。

2. 研究方法

1) 多剤耐性結核菌及び非結核抗酸菌臨床分離株の薬剤耐性遺伝子の同定：国立国際医療センター病院で分離される結核菌について、各種抗結核薬耐性に関与する遺伝子変異を調査した。本年度は、リファンピシン耐性遺伝子である RNA 合成酵素産生遺伝子である、*rpoB*、及びニューキノロン薬耐性遺伝子である DNA ジャイレース産生遺伝子 *gyrA* 変異を同定した。国立国際医療センター病院で分離された *M. tuberculosis* 19 株及び H37Rv 標準株を用いた。感受性試験は小川培地による試験と 7H9 broth を用いた微量液体希釈法による試験を行った。*rpoB* 遺伝子の塩基配列はその遺伝子変異の大半が見られる特定

領域をPCRで増幅し塩基配列を決定した。*gyrA*遺伝子の配列についても同様の特定領域について増幅を行い配列を決定した。

*Mycobacterium avium*は非結核性抗酸菌に属し、日和見感染症を引き起こす。また、循環式浴槽などの環境中から免疫正常者への感染も我々は報告した。本年度は、臨床で分離された*M. avium*のリファンピシン (RFP) に対する薬剤感受性を検討し、さらにRFPの作用点をコードする*rpoB*遺伝子の変異を同定した。菌株は、国立国際医療センター病院で分離された*M. avium* 19株及びATCC25291標準株を用いた。感受性試験と*rpoB*遺伝子の塩基配列は結核菌と同様な方法で実施した。

2) リアルタイム PCR を用いた結核菌の迅速薬剤感受性試験の開発：結核菌のゲノム DNA のうち、23 S リボソーム RNA 及び 16S リボソーム RNA をコードする DNA 配列から結核菌に特異的な遺伝子配列を選び、プライマーを設計した。これらのプライマーを用いたリアルタイム PCR で結核菌から抽出した DNA を定量化した。10⁶個の結核菌をリファンピシン (8μg/ml) 添加または非添加で2日、3日、4日、5日、7日、14日間培養後、それぞれのサンプルから DNA を抽出した。この DNA を用いてリファンピシンの結核菌増殖に対する効果をリアルタイム PCR で検出した。

3) 結核菌ゲノム DNA にみられるトリプレットリピート配列(TRS)の検索：マイクロサテライトの一種トリプレットリピート配列(TRS)は、ヒトでの神経変性疾患の原因である。本研究では、全ゲノム情報がわかっている *M. tuberculosis* H37Rv, *M. tuberculosis* CDC1551 及び *M. leprae* を始めとする 20 菌種 26 株に関して、ゲノム上の TRS の存在を調査した。TRS として可能性のある 10 配列(即ち CGG、GTC、GTG、CTG、AAG、GTT、CCT、GTA、GAT 及び TTA)で 5 回以上の繰返し配列を BLASTN アルゴリズムを用いて検索した。

4) 結核免疫に関与する遺伝子の多型検索：結核及び自然免疫関連分子における SNPs を解析した。菌体成分であるペプチドグリカンを認識する Toll-Like Receptor (TLR) 2、LPS を認識する TLR 4、塩基性抗菌タンパク質 CAP18、貪食細胞の食胞形成に関与するタンパク質 TACO の 4 分子を対象とした。これらの分子について、SNPs の検索をおこない、健常人と糖尿病患者、結核発症患者における変異の頻度についての検討を行った。これらの遺伝子の変異の有無と結核発症の関連を明らかにするために PCR-SSCP 法およびダイレクトシーケンシング法を用いて解析を行った。日本人より健常人サンプル 31 名、糖尿病患者 100 名、結核発症患者 70 名の血液サンプルよりゲノム DNA を回収し、各々の自然免疫関連遺伝子の SNPs の解析を行った。異なる 3 人の血液由来ゲノムを同一チューブにプールし、1 サンプルとして PCR-SSCP を行った。バンドの泳動距離の異なったバンドの現れたサンプルを SNPs 候補として選別し、個別に 5' 側、3' 側からそれぞれシーケンシングを行った。

3. 研究成果

1) 多剤耐性結核菌及び非結核抗酸菌臨床分離株の薬剤耐性遺伝子の同定：国立国際医療センター病院で分離された *M. tuberculosis* 19 株中、RFP 耐性株は 6 株でニューキノロン耐性株は 4 株であった。これらの RFP 耐性株の *rpoB* 特定領域配列を調べると、耐性株 6 株すべてにおいてアミノ酸変異を伴う遺伝子変異が存在していた。516 位のアスパラギン酸がバリン、及びグルタミン酸に。526 位のアミノ酸がアルギニン、アスパラギン酸またはスレオニンに。531 位のセリンがロイシンに変化する変異であった (Fig. 1)。これまでの報告では、リファンピシン耐性株において、531 位に変異があったもの 41%、526 位が 36%、そして 516 位に変異があったもの 9% であった。国立国際医療センターで分離された株においてもこれまでの報告と同様の部分に変異していることが明らかとなった。

ニューキノロン系薬剤耐性に関与する *gyrA* の配列を調べた。ニューキノロン耐性株すべてにおいて *GyrA* の 94 位の変異 (アスパラギン酸がアラニン、アスパラギン、またはヒスチジンに置換) があつた。これまでの報告では、キノロン耐性株の 41% がアスパラギン酸 94 位に変異をもつことが報告されているが、今回調査した国立国際医療センターの分離株においても、同様に 94 位の変異が集中していることが明らかとなった。

M. avium ATCC 標準株は RFP に感受性であった。一方、全ての *M. avium* 臨床株は RFP 耐性であった。RFP 耐性結核菌の 98% で、*rpoB* 遺伝子の特定領域の変異が知られている。また、RFP 耐性 *M. avium* においても同領域における変異がみられたとの報告があるため ATCC 株及び臨床株 19 株について同領

域の塩基配列を比較した。しかし、ATCC 株と臨床株の配列には全く違いが見られなかった。そこで検討する領域を広げたところ、ATCC 株と比較して、臨床株 19 株すべてにおいて 625 位のアミノ酸の Gly(GGC)→Asp(GAC)への変異が見られ、その内 1 株では 625 位に加えて、さらに 4 箇所に変異が存在していた (Fig. 1)。今後は、頻度の高い 625 位に注目し、耐性に関与する部位かどうかについてさらに検討する。

2) リアルタイム PCR を用いた結核菌の迅速薬剤感受性試験の開発：結核菌のゲノム DNA のうち、23 S リボソーム RNA をコードする DNA 配列から結核菌に特異的な遺伝子配列を選び、プライマーを設計した。このプライマーを用いたリアルタイム PCR の場合、結核菌 H37Rv から抽出した DNA は 0.1ng~100µg/ml までの濃度範囲で定量できることがわかった。次に薬剤の存在、非存在下で結核菌を数日間培養し、リアルタイム PCR を用いてモニターした。10⁶ 個の結核菌をリファンピシン (8µg/ml) 添加または非添加し、2 日、3 日、4 日、5 日、7 日及び 14 日間培養後、それぞれのサンプルから DNA を抽出し新たに設計されたプライマーを用いてリファンピシンの結核菌増殖抑制効果をリアルタイム PCR で検討した。その結果、5 日目以降のサンプルについて薬剤添加の効果を検出可能であった。

この 23S リボソーム RNA をコードする DNA 配列から考案されたプライマーを用いたリアルタイム PCR では、少なくとも 10⁶ 個の結核菌が必要であったため、より高感度な新しいプライマーを設計する必要がでてきた。このため、16S リボソーム RNA をコードする DNA 配列からプライマーを新たに設計した。このプライマーでは結核菌だけでなく、他の抗酸菌の DNA も増幅されるので、結核菌に対して特異性は低下するものの、結核菌 H37Rv から抽出した DNA は 1pg~100µg/ml までの濃度範囲で定量できることがわかった (Fig. 2)。10⁶ 個の結核菌をリファンピシン (8µg/ml) 添加または非添加し 2 日、3 日、4 日、5 日、7 日、14 日間培養後、それぞれのサンプルから DNA を抽出し新たに設計されたプライマーを用いてリファンピシンの結核菌増殖抑制効果をリアルタイム PCR で検討した。その結果、3 日目以降のサンプルについて薬剤添加の効果を検出可能であった。

3) 結核菌ゲノム DNA にみられるトリプレットリピート配列 (TRS) の検索：マイクロサテライトの一種トリプレットリピート配列 (TRS) は、ヒトでの神経変性疾患の原因である。結核を含む細菌に関する TRS に関する情報はわかっていない。本研究では、全ゲノム情報がわかっている *M. tuberculosis* H37Rv, *M. tuberculosis* CDC1551 及び *M. leprae* を始めとする 20 菌種 26 株に関して、ゲノム上の TRS の存在を調査した。TRS として可能性のある 10 配列 (即ち CGG, GTC, GTG, CTG, AAG, GTT, CCT, GTA, GAT 及び TTA) で 5 回以上の繰返し配列を BLASTN アルゴリズムを用いて検索した (Table. 1)。その結果、*M. tuberculosis* H37Rv と *M. tuberculosis* CDC1551 の TRS は、ほぼ同じ頻度であったが、*M. leprae* では頻度や種類が *M. tuberculosis* とは大きく異なっていた。*M. tuberculosis* H37Rv では 34 個、*M. tuberculosis* CDC1551 では 37 個の TRS が存在した。一方、*M. leprae* は、わずかに 9 個の TRS があった。*M. tuberculosis* の TRS は、その 80% が (CGG) のリピートであったが、*M. leprae* では、(CGG) リピート配列はなく (AAG) リピートがあった。他の菌種と比較しても *M. tuberculosis* 以外 TRS が高頻度で出現している細菌はなかった。特に、*M. tuberculosis* で観察されるような 5 回以上の TRS (CGG) は DNA 中の GC 量から計算で予想される配列の確率の約 20 倍であり、結核菌に特異的な配列であると考えられる。また、これら TRS を含む遺伝子のほとんどは ORF 領域内に存在し、PE 及び PE_PGRS ファミリーとよばれるタンパク質をコードしていることがわかった。

4) 結核免疫に関与する遺伝子の多型検索：CAP18 における SNPs の有無を解析した。個々の Exon にプライマーを設定し、SNPs の検索を行った (Fig. 3)。解析の結果、結核発症患者において A2538G (Lys>Arg) に SNP が存在した。しかし、糖尿病患者、健常人においては SNP を見いだせなかった。次に TLR4 について SNPs の検索を行った。TLR4 については、SNPs のホットスポットが細胞内シグナルドメインに存在する。細胞内シグナルドメインにおいて健常人サンプルで一例 mutation が見られたが、疾病群では SNPs は見られなかった。TLR2 においてアルギニンからグリシンへの変換が起き、スタフィロコッカス感染性が増加することが報告されている。我々もこの領域にプライマーを設定し、同様に多型解析を行った。報告ではこの塩基において 3% の頻度で SNPs が存在するが、我々が用いたサンプルでは同一塩基における SNP は見られなかった、しかし近接部位において 3 カ所の SNP を見いだした。TACO のヒトホモログ、p57 において SNPs は見られなかった。

4. 考 察

1) 多剤耐性結核菌及び非結核抗酸菌臨床分離株の薬剤耐性遺伝子の同定：国立国際医療センター病院で分離された *M. tuberculosis* RFP 耐性株の *rpoB* 特定領域配列及びニューキノロン耐性株の *gyrA* の配列を調べ、夫々516位のアスパラギン酸及び94位アスパラギン酸変異を同定した。これらの変異は、これまで諸外国で報告されている変異と同様な部位であった。今後は、東京新宿の患者から分離された臨床株を用いて、他の薬剤に関する遺伝子部位の変異を検索する。とともに、*rpoB* と *gyrA* 遺伝子の変異部位周辺に標的を絞って、変異検出用の DNA チップを設計する。

調べた全ての *M. avium* 臨床株は RFP 耐性であった。その変異は、これまで報告がない625位のアミノ酸の Gly(GGC)→Asp(GAC)への変異であった。この変異が本当に耐性変異であるのか今後は、頻度の高い625位に注目し、耐性に関与する部位かどうかについてさらに検討が必要である。

2) リアルタイム PCR を用いた結核菌の迅速薬剤感受性試験法の開発：本年度は結核菌の迅速薬剤感受性試験法として新たにリアルタイム PCR を用いた方法の開発に着手した。従来の方法では、結核菌の分離から薬剤感受性の診断まで速くて6週間場合によって2ヶ月以上を要していた。それと比較すると、数日で薬剤感受性が判定できるようになる可能性が見えてきた。特異性の克服、DNA 抽出方法の改善など技術的などところを今後は解決し、できるだけ早急に臨床応用を実施していきたい。

3) 結核菌ゲノム DNA にみられるトリプレットリピート配列(TRS)の検索：マイクロサテライトの一種トリプレットリピート配列(TRS)は、ヒトでの神経変性疾患の原因である。結核を含む細菌に関する TRS に関する情報はわかっていなかった。本研究では、結核菌に特異的な配列である TRS (CGG) が多数存在することが明らかとなった。これら TRS を含む遺伝子のほとんどは ORF 領域内に存在し、PE 及び PE_PGRS ファミリーとよばれるタンパク質をコードしていることがわかった。PE 及び PE_PGRS ファミリーは結核のゲノム解析でその存在が明らかになってきた結核菌抗原で、最近では結核免疫及び結核による肉芽腫形成に関与している病原因子であろうとの報告もされている。また、細菌由来の CpG は TLR9 を介して宿主細胞を活性化することがわかってきた。今後は、PE 及び PE_PGRS ファミリーの産物もしくは遺伝子本体がどのように病原性に関与しているのか明らかにしたい。

4) 結核免疫に関与する遺伝子の多型検索：CAP18、TLR4、TLR2 及び TACO における SNPs の有無を解析した。個々の Exon にプライマーを設定し、SNPs の検索を行った。解析の結果、結核発症患者において A2538G(Lys>Arg)に SNP が存在した。エクソン領域において CAP18 で1つ、TLR2 で3つの変異を同定した。特に CAP18 は、活性部位の変異であった。今後は、合成ペプチドを用いて CAP18 の抗菌活性の変化を検討する予定である。

5. まとめ

本研究では、ゲノム情報解析技術を駆使し、感染症分野におけるポストゲノム創薬技術の応用開発を行なうことである。具体的には、DNA マイクロアレー法やリアルタイム PCR 等の方法を導入し、さらにゲノム情報などを活用した研究を展開してきた。その結果、1) 多剤耐性結核菌及び非結核抗酸菌臨床分離株の薬剤耐性遺伝子の同定、2)リアルタイム PCR を用いた結核菌の迅速薬剤感受性試験法の開発、3)結核菌ゲノム DNA にみられるトリプレットリピート配列(TRS)の検索、4) 結核免疫に関与する遺伝子の多型検索、等の分野で研究が進展した。今後はこれらの結果を発展させ、応用研究を目指していく。

6. 研究発表

Watando, A., Toyota, E., Mori, N., Kaneko, A., Kuratsuji, T., Kirikae, T. & Kudo, K. Pulmonary *Mycobacterium avium* infection in an immunocompetent young adult related to use of home bath with a circulating water system. *Jpn. J. Infect. Dis.* **54**, 151-152(2001).

7. 知的所有権の取得状況

- | | |
|-----------|----|
| 1) 特許取得 | なし |
| 2) 実用新案登録 | なし |
| 3) その他 | なし |

Fig.1

rpoB gene mutations of Rifampicin-resistant *M.tuberculosis*

rpoB (3.3Kb) 81bp region

GGC ACC AGC CAG CTG AGC CAA	TCC ATG GAC CAG AAC AAC	CCG CTG TCG GGG TTG ACC	CAC AAG CCGGGA CTG TGG GGG CTG
907 Gly Thr Ser Gln Leu Ser Gln	Phe Met Asp Gln Asn Asn	Pro Leu Ser Gly Leu Thr	His Lys Arg Arg Leu Ser Ala Leu 923
GGC ACC AGC CAG CTG AGC CAA	TCC ATG GAC CAG AAC AAC	CCG CTG TCG GGG TTG ACC	CAC AAG CCGGGA CTG TGG GGG CTG
His Pro Thr Leu	Asp Val	Met Leu	Phe Pro Gln Phe
Arg Arg Leu	Phe		Gln Phe
Pro	Glu		Arg Glu
	Gly		Leu Asn
			Thr
			43%
			36%

Genetic polymorphisms associated with resistance to fluoroquinolones in *M. tuberculosis*

81	84	105
Gly Thr Ser Gln Leu Ser Gln Phe	Met Asp Gln Asn Asn Pro Leu Ser Gly Leu Thr His Lys Arg Arg Leu Ser Ala Leu	
	Val	
	Glu	

Genetic polymorphisms associated with RFP resistance in *M. tuberculosis* 507

526	531	516
Gly Thr Ser Gln Leu Ser Gln Phe	Met Asp Gln Asn Asn Pro Leu Ser Gly Leu Thr His Lys Arg Arg	
Leu Ser Ala Leu	Val	Arg Leu
	Glu	Asp
		Thr

Fig. 2

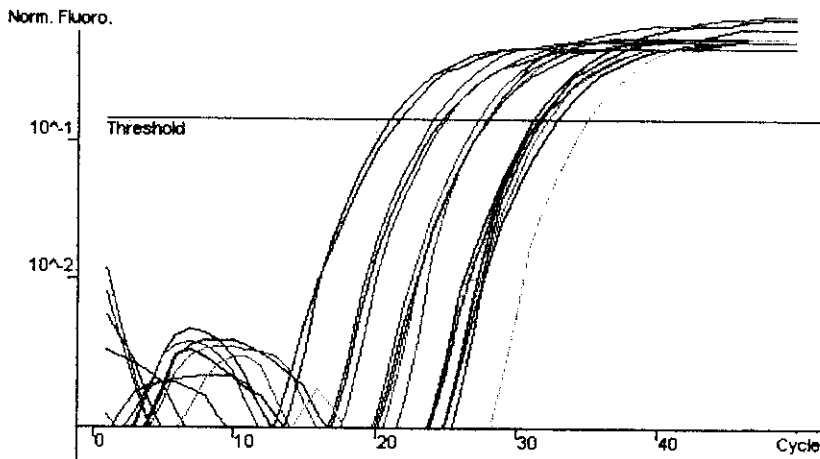
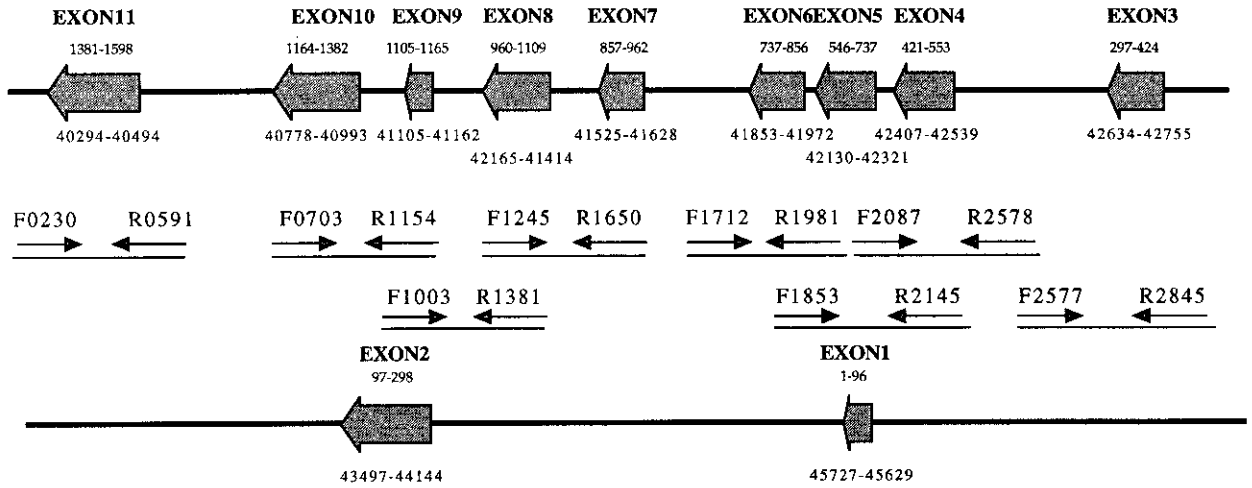
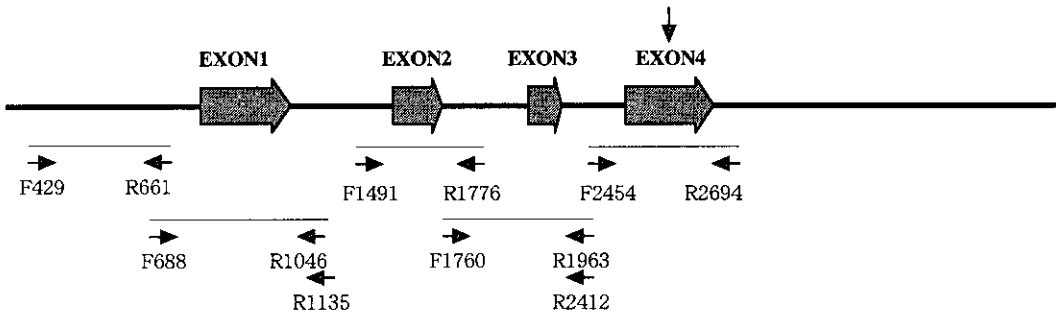


Fig.3

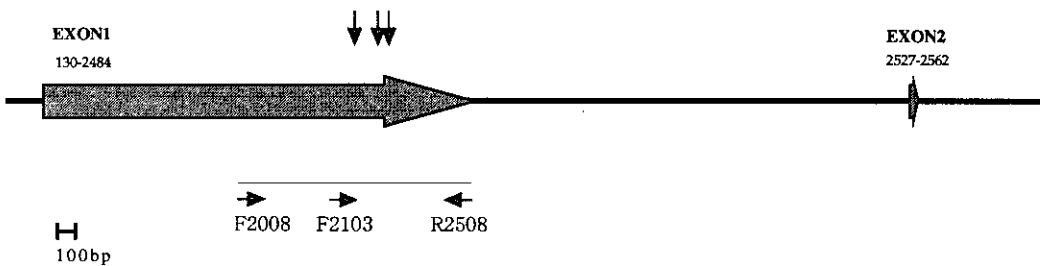
P57 hTACO



CAP18



TLR2



TLR4

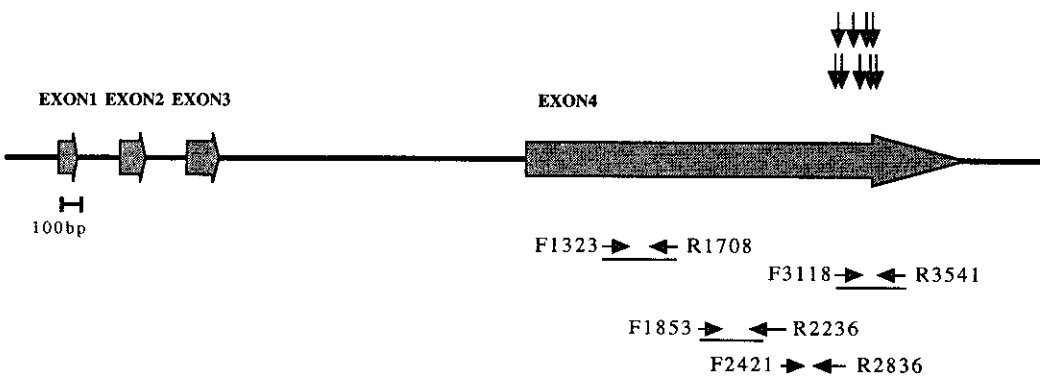


Table 1. Distribution of trinucleotide repeats among bacterial genomes

Microorganism	Type of repeat									
	CGG	CTG	GTC	CCT	GTG	GAA	GAT	GTA	GTT	TAT
	No of repeats in a single tract/occurrence per genome									
<i>Clostridium acetobutylicum</i> 3940880 bp	--	5/1	--	--	--	5/1	--	--	5/1	5/2
<i>Clostridium perfringens</i> 3031430 bp	--	--	--	--	--	--	--	--	--	5/3
										6/1
<i>E. coli</i> K12 4639221 bp	5/2	--	--	--	--	--	--	--	--	--
<i>E. coli</i> O157:EDL933 5528445 bp	5/1	--	--	--	--	--	--	--	5/1	--
<i>E. coli</i> O157:EDL933 5528445 bp	5/1	--	--	--	--	--	--	--	5/1	--
<i>H. pylori</i> 26695 1667867 bp	--	--	--	--	--	--	--	8/1	5/1	--
<i>H. pylori</i> J99 1643831 bp	--	--	--	--	5/1	5/1	--	8/1	5/1	--
<i>Listeria innocua</i> 3011208 bp	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
<i>Listeria monocytogenes</i> 2944528 bp	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
<i>Mycoplasma genitalium</i> 580074 bp	--	--	--	--	--	5/1	--	5/1	11/1	--
						6/1		7/1		
						16/1		8/1		
								9/1		
								10/1		
								11/1		
								16/1		
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> 816394 bp	--	--	--	--	--	--	--	5/1	--	--
								7/1		
<i>Mycoplasma pulmonis</i> 963879 bp	--	--	--	--	--	--	--	--	5/2	6/1
<i>Mycobacterium leprae</i> 3268203 bp	--	--	--	--	5/1	21/1	5/2	5/3	--	--
					6/1			9/1		
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv 4411529 bp	5/27	--	5/1	--	5/3	--	5/1	--	--	--
	6/1									
	7/1									
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> CDC1551 4403836 bp	5/32	--	5/1	--	5/3	--	5/1	--	--	--
	6/1									
<i>Neisseria meningitidis</i> MC58 2272351 bp	5/6	--	--	--	--	--	--	--	--	--
<i>Neisseria meningitidis</i> Z2491 2184406 bp	5/2	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	6/1									
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 6264403 bp	5/5	--	--	--	5/2	--	--	--	--	--
					14/1					
<i>Rickettsia conorii</i> Malish 7 1268755 bp	--	--	--	--	--	--	--	--	--	5/1
<i>Rickettsia prowazekii</i> 1111523 bp	--	--	--	--	5/1	--	--	--	--	5/1
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi 4809987 bp	5/4	10/1	--	--	5/1	--	--	--	--	--
<i>Salmonella typhi</i> 4809037 bp	5/2	10/1	--	--	5/1	--	--	--	--	--
	6/1									
<i>Salmonella typhimurium</i> LT2 4857432 bp	5/4	5/2	--	--	--	--	--	--	--	--
<i>Staphylococcus aureus</i> Mu50 2878040 bp	--	4/4	--	--	4/3	4/8	4/8	4/1	4/6	4/24
								5/1		
<i>Staphylococcus aureus</i> N315 2160837 bp	--	4/4	--	--	4/2	4/2	4/6	--	4/2	4/7
<i>Thermoplasma acidophilum</i> 1564906	--	--	--	4/1	--	4/4	4/4	--	4/1	4/5
<i>Thermoplasma volcanicum</i> 1584804 bp	--	4/2	--	--	--	4/5	4/4	4/2	--	4/5
<i>Yersinia pestis</i> 4653728 bp	4/9	4/14	4/1	--	4/13	4/5	4/8	--	4/3	4/10
		5/1			5/2					
		6/1								

平成13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1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

平成14年9月10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