

平成15年度

エイズ医薬品等開発研究

重点研究報告書

国際研究グラント事業 研究報告書

目 次

重点研究

第2分野

課題番号

文献 No 20030989A KA21501	HIV-1ディフェンスワクチンの創製・開発研究	梅田 衛	……	1
KA21502 990A	潜伏HIV-1の再活性化に関わるアクセサリ-遺伝子を標的としたエイズ発症阻止技術の開発	間 陽子	……	6

第3分野

KA31503 2003991A	新規HIV感染価測定細胞株に基づく迅速簡便な実用的薬剤耐性試験法の確立	巽 正志	……	13
---------------------	-------------------------------------	------	----	----

国際研究グラント

SA14711	エイズ遺伝子治療法に関する研究：遺伝子治療臨床研究用ベクター製造およびEx vivo遺伝子導入プロトコールの開発に関する研究	加藤郁之進	……	21
SA14712	翻訳フレームシフトを標的とした抗HIV薬の開発	松 藤 千 弥	……	27
SA14718	新規デザインに基づいた次世代の核酸系逆転写酵素阻害薬の開発研究	馬 場 昌 範	……	32
SA14719	HIV感染動物モデルを用いた遺伝子治療用核酸の抗ウイルス機能と免疫応答に関する研究	山 本 博 一	……	37
SA14720	エイズ発症を抑制する宿主因子の遺伝的および免疫学的解析	横 田 恭 子	……	49
SA14721	HIV潜伏感染の維持と破綻の分子メカニズムに関する研究	岡 本 尚	……	57
SA24713	新しいエイズワクチン開発の研究	奥 田 研 爾	……	69
SA24714	エイズ発症防止ワクチン開発のための細胞性免疫因子の解明とその活性化に関する研究	滝 口 雅 文	……	74
SA24715	ゲノム改変サル・ヒト免疫不全キメラウイルスを用いた弱毒性ワクチンと半生ワクチンの開発	速 水 正 憲	……	82
SA24716	リコンビナントタイプHIVワクチンの標的集団の解析とパイロットプロダクションの可能性の検討	仲 宗 根 正	……	88
SA24717	HIV亜種解析によるHIVワクチンの開発	石 川 晃 一	……	100
SA24722	細胞性免疫誘導型プライムブーストエイズワクチンの臨床評価系の確立	山 本 直 樹	……	106
SA24723	HIV特異的免疫療法開発に関する基礎研究	岩 本 愛 吉	……	111
SA24724	HIV感染抵抗性を決定する新規宿主遺伝子の同定によるワクチン戦略の開発	宮 澤 正 顯	……	116

エイズ医薬品等開発研究

重点研究報告書

第3分野

抗エイズ薬開発のための基盤技術の開発等に関する研究

新規HIV感染価測定細胞株に基づく迅速簡便な実用的 薬剤耐性試験法の確立

所 属 国立感染症研究所獣医科学部
研究者 異 正志

研究要旨 CD8 陰性 PBMC の抗 CD3, CD28 抗体刺激により低ウイルス量患者検体からのウイルス分離効率を高めるレシピが確立し、併せて多検体処理工程の標準化が進展した。また薬剤耐性試験法 Genotype 法と Phenotype 法とを繋ぐ新規 GenoPhenotype 法を確立すべく、HIV-1 ウイルスゲノム全長からなる感染性クローン作成を試み、HIV-1 ゲノムの Vpr, Tat および Vif で保存されている領域に Primer を設定した Long PCR を用いて Half and Half Cloning Strategy によって効率的に感染性クローンが得られた。本法の新たな薬剤耐性試験法への応用が期待される。

分担研究者

- (1) 国立感染症研究所獣医科学部 異 正志
- (2) 国立国際医療センター エイズ治療研究開発センター 岡 慎一
- (3) (株) 三菱化学ピーシーエル 石古博昭

A. 研究目的

HIV 感染症の治療において今や耐性発現という問題は臨床・基礎医学の分野で避けて通る事の出来ない基本的な課題であり、耐性発現はこれからの HIV-1 に対する新規の治療薬開発で最重要課題と掲げられるようになった。現在多種多様な薬剤を用いて多様化する HIV 治療法における有効な薬剤選択の判定基準の一つとして Genotyping と Phenotyping の薬剤耐性試験があげられる。Genotyping は既に Kit が販売され実用化しているが、実際の患者ウイルスの耐性を反映してないなどの問題がある。一方 Phenotyping は患者ウイルスの耐性度を反映しているものの、現在推奨されている PBMC を用いる標準法は手技的に複雑で、費用がかさみ結果が得られるのに時間がかかる。なにより多検体処理は困難であることから一般に行われていない。しかしながら実際の患者ウイルスの生物学的耐性を表現することからその必要性は認められている。本研究はウイルス分離増殖を PBMC ではなく、発想を転換し、新規の感染価測定細胞株に基づいて測定する。すなわち HIV のレセプター及びコ

レセプターを発現し、汎用性のあるレポーター遺伝子を組み込み、HIV-1 感染によりレポーター遺伝子が駆動する迅速簡便な HIV-1 感染価測定細胞株を樹立し、それを用いた迅速簡便で実用的な薬剤耐性試験 Phenotypic Assay の確立をめざす。

本年度は低ウイルス量 (10^3 >copies/ml) 患者検体からのウイルス分離効率を高めるレシピを検索し、MAGIC-5A と MAGIC-5/SEAP 細胞株を用いた多検体処理工程の標準化を検討した。また新たに薬剤耐性試験法として用いられている Genotype 法と我々が開発した MAGIC-5A および MAGIC-5/SEAP 細胞を用いた迅速 Phenotype 法の間隙を埋め、患者ウイルス HIV-1 ゲノムとその生物学的性状を、ウイルスゲノム全長にわたる遺伝的解析に基づいたより進化した薬剤耐性試験法 (GenoPhenotype 法) 開発を目的に、HIV-1 ウイルスゲノム全長からなる感染性クローン作成を試みた。

B. 研究方法

1. Dyna Beads を用いた CD4 陽性細胞の分離：継代が進んだ MAGIC5A 細胞、 5×10^6 /ml に Dyna Beads CD4 を加える。4℃、20分反応させ、Dyna Beads 専用磁石を用いて、CD4 陽性細胞を分離した。その後分離した細胞から Dyna Beads CD4 を取り外す為、DETACHaBEAD を加え、室温60分反応させた。Dyna Beads 専用磁石を用いて、上清を採取した。

2. MACS を用いた CD4 陽性細胞の分離：継代が進んだ MAGIC5A 細胞、 5×10^6 /ml に CD4 Beads を加え、 4°C 15 分反応させ、MACS 専用磁石にカラムをセット、細胞をカラムに通し、ポジティブセレクションにて CD4 陽性細胞を分離した。その後分離した細胞からマイクロビーズを取り外す為、MACS multisort release reagent を加え、 4°C 10 分反応後、Stop reagent を加え、CD4 陽性細胞を分離した。

3. フローサイトメトリー解析：MAGIC5A 細胞を 1×10^5 /tube に調整、Cy-crome 標識抗ヒト CD4 抗体、FITC 標識抗ヒト CCR5 抗体、FITC 標識抗ヒト CXCR4 抗体で染色し、フローサイトメトリーを用いて各表面抗原の発現量を解析した。

4. 患者 CD8 (一) PBMC からのウイルス分離：リンホセパールを用いて患者末梢血単核球 (PBMC) を分離、CD8 Beads を加え、 4°C 15 分反応させた。その後 MACS 専用磁石にカラムをセット、細胞をカラムに通し、CD8 非標識細胞を分離した。(ネガティブセレクション) この CD8 非標識細胞は、抗 CD3 抗体、抗 CD28 抗体で刺激、IL-2 を加えた RPMI 培地で培養し、上清中にウイルスが検出された時点で MAGIC5A 細胞に感染させ、高濃度のウイルスを得た。

5. HIV-1 ウイルスのクローニングおよび Long PCR と全長ゲノム Plasmid 構築：HIV 感染価測定系 Indicator 細胞 MAGIC-5/HeLa4.5 nEGFP 細胞株を用いた HIV ウイルスクローニングと感染性クローニングの構築系(HIV Trapping System ; HIV 捕捉実験系)により行った。対象としたウイルスは Zambia Lusaka で分離された subtype C15 検体 (山梨大、照沼博士から入手) および本年 8 月に Ghana Accura で採取し空輸された血液から分離した 18 検体 (国立感染症研究所佐多博士から入手) である。まず Ghana25 検体を Donor PBMC あるいは MAGIC5A 細胞との Coculture でウイルス分離した。得られたウイルスを感染させた MAGIC-5A 細胞からゲノム DNA を抽出し、それを鋳型として、Long PCR を行い 5'-および 3'-側のプロウイルスゲノムを増幅、それらを連結することによって完全長の DNA クローニングを得た。完全長 DNA クローニング作製の戦略は当初先に報告した 5'-LTR から PBS までを予め pBR322 ベースの Cloning Vector pMT1 に組み込み、その Kas I 部位から 3'-LTR の PolyA signal 下流までを Not I 部位を付け加えた Primer で増幅した 9.0 Kbp に及ぶ Long Amplicon を制限酵素処理精

製後組み込む方法と HIV Database から Vpr および Vif 領域における Rare cutter の制限酵素を選定し、その塩基配列を含む Primer で HIV-1 genome Vpr および Vif 下流領域を増幅し pMT1 に組み込み、しかる後に Vpr および Vif 上流領域を増幅した断片を酵素処理後組込む Half & Half 戦略を用いて全長クローニングを得た。得られたクローニングは HeLa4.5nEGFP 細胞に Transfection しその培養上澄を MAGIC-5A 細胞にかけ感染性を確認した。この Half & Half Strategy の効率を確認するため、NL4-3 株感染 MAGIC-5A ゲノムを鋳型に Vpr 領域の EcoR I site を用いた Primer で再構築した NL4-3 クローニング感染性クローニング樹立効率を確かめた。

(倫理面への配慮)

該当患者から臨床研究のための血液保存に関し、同意は文書で得た。また本研究にて行われるカルテ解析は、臨床経過を把握するものであって、個人を特定出来る情報は使用していない。

C. 研究成果

細胞側の改善：培養 3 週目を過ぎた MAGIC5A 細胞から MACS、Dyna Beads を用いて CD4 陽性細胞を採取した。処理前の細胞に比べ、Dyna Beads 法では発現量 ($0.2 \uparrow$)、強度 ($95 \uparrow$) とともに高いものが分離されたが、しかし MACS 法では、発現量 ($0.4 \downarrow$)、強度 ($102 \downarrow$) が低いものが分離された。再び 4 週目を過ぎた時点で、Dyna Beads を用いた方法を行ったところ、処理前の細胞に比べ、発現量 ($6.0 \uparrow$)、強度 ($100 \uparrow$) の高い細胞が分離された。この発現量、強度の高い細胞を用いて、患者 plasma からのウイルス分離を行った。これまでの細胞では、培養 3 週目を過ぎるとウイルス分離が出来ない傾向がある。処理前の細胞では 10^5 copies/ml 以上で分離効率が 20%と低く、今回 Dyna Beads を用いてセレクションを行った細胞の分離効率は同じ 20%であった。唯一分離できた検体のウイルス量は 10^6 copies/ml と非常に高く、つまりこの方法によるウイルス分離効率の改善は全く見られなかった。また処理前の細胞では、ウイルス分離は出来なかったものの巨細胞形成が見られた検体が 2 件あったため、処理前の細胞が感染効率の点で良い傾向がみられた。

患者サンプル側の改善：これまでの患者 plasma を用いたウイルス分離法では、ウイルス量が 10^4 copies/ml 以下の場合、分離が不可能であった。そのため PBMC、CD8 を除いた PBMC (以下、

CD8 (-) PBMC)、抗 CD3、CD28 抗体で刺激した CD8(-)PBMC を用いて、ウイルス分離を行った (Table 3)。PBMC を用いた方法では、ウイルス量が 10^4 copies/ml で 62%、 10^4 copies/ml 未満では 0% と、これまでの plasma を用いた方法 (10^4 copies/ml 71%、 10^3 copies/ml 7%) とほぼ同様の結果であった。しかし抗 CD3、CD28 抗体で刺激した CD8(-)PBMC による方法では、ウイルス量が 10^3 copies/ml 100%、 10^2 copies/ml 66% と、ウイルス量が少なくても分離が可能であった。

HIV-1 Full-genome 感染性クローンの樹立: まず Ghana25 検体からの樹立概要を述べる。昨年 7 月 28 日から 29 日にかけて首都 Accra 近郊で採取した患者 EDTA 附加血液はおよそ 2 日間の空輸のうえ搬入され直ちにリンパ球分離の上 Donor PBMC あるいは MAGIC5A 細胞との Coculture でウイルス分離した。その分離効率は Donor PBMC との Coculture で 12/25、MAGIC-5A 細胞との Coculture で 16/25 であった。分離ウイルス株感染 MAGIC-5A 細胞ゲノムを鋳型に簡易 subtyping 法である gag 領域を標的とした Heteroduplex Mobility Analysis (HMA; Heyndrickx L et al. J.Viol. 74:363 - 370, 2000)によりその subtype を推測したところ、subtype A 7/18, AG Recombinant 6/18, subtype G 2/18, 判定不能 3/18 であった。分離ウイルス感染 MAGIC-5A 細胞ゲノムを鋳型に HIV genome 右半分を Nco I site を含む Vpr Forward Primer あるいは Cla I site を含む Vif Forward Primer と 3' LTR poly A signal 下流領域に Not I site を附加した Reverse Primer で約 4.5Kbp の Amplicon を増幅し電気泳動後精製し制限酵素処理後該当酵素で切断されないことを確認後 HIV-1 Cloning Vector pMT1 へ組み込み、LacZ 発現選択により組み込み陽性クローンを 5 クローン選別した。同じ Primer の Complementary な Reverse Primer と各 subtype consensus 5' LTR 領域上流に Sal I site を附加した Forward Primer で HIV genome 左半分を増幅後精製し該当酵素にて処理後精製し、酵素処理した先の右半分を組み込んだクローンに組み込み全長クローンを得た。

得られたクローンは HeLa4.5nEGFP 細胞に Transfection しその Tat 活性と Syncytium 形成を確認後、その培養上澄を MAGIC-5A 細胞にかけその感染性を確認した。分離ウイルスにより異なるがそれぞれ 32 から 40 クローンを分離し、その感染性を検討した。多くのウイルス株では 60%以上のクローンが Syncytium 陽性であるが、

さらに感染性を示すクローンは限られることが判明した。総計 52 クローンが分離されたが、subtype A は 4 検体から 6 クローン、AG recombinant は 5 検体から 7 クローンおよび subtype G は 1 検体から 2 クローンの感染性クローンを選定し、現在全長塩基配列を決定の途上であるが、得られた配列ではそれぞれの clone は HMA で推測された subtype であることが確認された。対照比較として構築した NL4-3 株の Syncytium 形成率は 65%、感染性陽性クローン樹立率は 4/40 即ち 10%となった。現時点で Ghana 検体のクローン樹立率は 5%内外である。現在得られたクローンの全長塩基配列を決定の途上である。また Subsahara の Zambia Lusaka で一昨年从去年にかけて分離された subtype C ウイルスについても同様の戦略を用いて感染性クローンの樹立を試みたところ 7 検体から 14 クローンの感染性クローンが得られ、既に 5 クローンの全塩基配列解析が終了し、全長を対象とした系統樹解析でアフリカ型 subtype C に Cluster を形成することが判明した。

D. 考察

現在、薬剤耐性変異ウイルスを検出するためには、(1)薬剤作用領域の塩基配列の変異を調べる遺伝子型 (genotype 法) と(2)直接 HIV を薬剤存在下で培養し、増殖を抑えることのできる濃度 (IC₅₀、IC₉₀) を求めて評価する表現型 (phenotype 法) があげられる。phenotype 法では耐性度として評価できるため、理解しやすく、genotype 法で解析が進んでいない新規薬剤でも判定が可能である。しかしその反面、抗 HIV 薬を服用している患者からのウイルスの分離や取り扱いが難しいことが指摘されている。今回使用している MAGIC5 は、培養開始 3 週目を過ぎた頃から plasma からのウイルス分離が不可能となる。この時 CD4 レセプターは、一定量発現しているものの、蛍光強度が著しく低下してくるため、分離が出来なくなる原因の一つとして考えられていた。そのため Dyna Beads を用いた方法で CD4 を強発現している細胞だけを選び、その後ウイルス分離を試みたが、ウイルス分離率はこれまでと変わらない傾向であった。さらに 3 週目から 4 週目で蛍光強度が大幅に減少したが、Dyna Beads 法では 3 週目の状態まで蛍光強度を回復することは不可能であった。すでに 98%もの細胞で CD4 を発現しているため、その中から強度の高いものだけを選ぶというのは困

難で、この方法での限界と考えられた。

患者由来の plasma を用いた場合、中和抗体が作用してしまうことから、検体処理までの時間が問題視され、これまでの検討からウイルス量 10^4 copies/ml 未満では分離が不可能であった。そのため今回の検討において、患者サンプルは PBMC を用いた。また PBMC 中の CD8 から産生される水溶性因子やケモカインはウイルス増殖を妨げることが知られているため、CD8 を除去した。PBMC からウイルスを分離する際に用いられる細胞分裂誘導物質 PHA に比べ、抗 CD3、CD28 抗体による細胞刺激は、CD45RO+からの HIV の増殖を強力に促し、ウイルス量が検出限界以下にまで低下した感染患者からウイルスの分離が可能という報告があるため、この方法についても検討を行った。確かに MAGIC5A 細胞を用いたこれまでの方法と比べ、新しい方法では 10^3 copies/ml、 10^2 copies/ml のウイルス量の患者からのウイルス分離が可能となった。しかし抗 CD28 抗体の刺激は休止期 T 細胞の活性化を伴い、またこの細胞中のウイルスは増殖が出来ず、薬剤投与前の感受性ウイルスが存続していることが、知られている。つまり休止期 T 細胞中からの分離されたウイルスは、HAART によって耐性を獲得し活発に増殖しているウイルスではないため、臨床を反映出来ない可能性がある。そのため今後、抗 CD3 抗体のみの刺激を行い、このウイルス分離効率を保ったまま活性化 CD4 陽性細胞からウイルス分離出来るかどうか検討する必要がある。また genotype 法は plasma 中のウイルス遺伝子を解析し、phenotype 法では PBMC 中のウイルスを用いることは、耐性ウイルスの出現の差がデータの乖離に繋がることを考慮し、注意を払わねばならないことが考えられた。

本年度は、新たに現在臨床で薬剤耐性試験法として用いられている Genotype 法と我々が開発した MAGIC-5A および MAGIC-5/SEAP 細胞を用いた迅速 Phenotype 法の間隙を埋め、患者ウイルス HIV-1 ゲノムとその生物学的性状を、ウイルスゲノム全長にわたる遺伝的解析に基づいたより進化した薬剤耐性試験法開発を目的に、現在まで樹立した感染標的細胞 MAGIC-5A、HeLa 4.5-nEGFP 細胞と新規に開発した pBR322 を基本骨格により HIV-1 genome を安定に保持する Cloning vector pMT1 を駆使し、Long PCR を用いた「HIV Trapping System」でパイロット実験としていまだ感染性クローンが得られていない

non-B subtype の HIV-1 感染性クローンの樹立を検討した。Half & Half Strategy により「HIV Trapping System」のさらなる効率化を実現し多くの non-B subtype 感染性クローンを樹立し、塩基配列決定の途上ではあるが subtype G の感染性クローンを世界に先駆けての樹立に成功した。このクローンと同一時期地域で流行している subtype A および AG Recombinant クローンを樹立できたことは組換え体生成の機序を解析する重要なクローンを取得したことを意味し、今後の意義ある課題になりうるものと考えられる。

また今回比較対照とした NL4-3 株の検討から現時点の Long PCR 法による HIV genome の増幅における合成酵素の Fidelity では感染性クローンの取得率はほぼ極限までできていることが推測された。しかしながら今後も PCR DNA Polymerase の Fidelity の向上は期待できることから、この戦略がさらに有効になるものと考えられる、

現在、既存の標的分子以外にも新規抗 HIV-1 薬剤が開発されつつあるが、Phenotyping 法はその原理上 HIV-1 ウイルス増殖阻害を指標に全ての薬剤に対する耐性度を測定できるものと考えられる。また薬剤耐性 HIV-1 が既に日本社会に浸淫していることから新規感染者における薬剤耐性試験は治療方針を策定する上で必須の事項になってきている。また様々な薬剤の組み合わせで服薬される抗 HIV-1 薬の相乗効果で今後多様なパターンの Genotype が耐性ウイルスのゲノム上に見いだされる可能性が高い。そのゲノム上の変異は該当標的分子をコードする遺伝子領域のみならず、ウイルスの Fitness 回復のうえで他の領域の変異を伴う共進化も視野に入れなければならない。この観点からもウイルスゲノム全長にわたるクローニングを視野に入れた今回の感染性クローン樹立法は将来に向けた薬剤耐性ウイルスゲノムの情報バンクの立ち上げに資するものと考えられ、薬剤投与期間における個々の患者体内のウイルス進化と耐性度の変化をダイナミックに検索できる可能性があり、迅速な薬剤耐性 Phenotype 法の確立とともに有益な情報を与えると期待される。

E. 結論

選択した抗 HIV 療法が不十分で、新たな薬剤を決定する際、残された薬剤の中から最も効果の高い薬剤を選択する判断材料の一つとして薬剤耐性検査があげられている。近年、新規感

染者に薬剤耐性ウイルスが伝播していることが判明し、今後薬剤耐性検査の必要性がさらに高まることが予測される。臨床側からの検査依頼に対応するためにも、ウイルス分離効率をあげなければならない。CD8除去患者PBMCに抗CD3、抗CD28抗体を用いて刺激を行い、ウイルス量の低い検体からもウイルス分離が可能となった。分離ウイルスが、臨床像を反映しているか今後さらなる検討が必要であると思われた。

ウイルスゲノム全長にわたる遺伝的解析に基づいたより進化した薬剤耐性試験法開発を目的に、Long PCRを駆使した「HIV Trapping System」でHalf and Half Strategyによって格段に効率化された感染性クローン樹立法を確立した。この方法は今後より精緻な薬剤耐性ウイルス検査に応用できるものと考えられる。

F. 研究発表

Matsuoka S, Sato H, Hachiya A, Tsuchiya K, Takebe Y, Gatanaga H, Kimura S, and Oka S. Isolation and Molecular Characterization of a Nelfinavir(NFV)-Resistant Human Immunodeficiency Virus Type 1 That Exhibits NFV-Dependent Enhancement of Replication. *J Virol* 77: 318-327 2003.

The HIV Lipodystrophy Case Definition Study Group (Oka et al.) An objective case definition of lipodystrophy in HIV-infected adults. *Lancet* 361: 726-735, 2003.

Hachiya A, Matsuoka-Aizawa S, Tsuchiya K, Gatanaga H, Kimura S, Tatsumi M, and Oka S. "ALL-in-One Assay", a direct phenotypic anti-human Immunodeficiency virus type 1 drug resistance assay for three-drug combination therapies that takes into consideration in vivo drug concentrations. *J Virol Methods* 111: 43-53, 2003.

Tsuchiya K, Matsuoka-Aizawa S, Yasuoka A, Kikuchi Y, Tachikawa N, Genka I, Teruya K, Kimura S, and Oka S. Primary nelfinavir (NFV)-associated resistance mutations during a follow-up period of 108 weeks in protease inhibitor naïve patients treated with NFV-containing regimens in an HIV clinic cohort. *J Clin Virol* 27: 252-262, 2003.

Bi X, Gatanaga H, Ida S, Tsuchiya K, Matsuoka-

Aizawa S, Kimura S, and Oka S. Emergence of Protease inhibitor Resistance- Associated Mutations in Plasma HIV-1 Precedes That in Proviruses of Peripheral Blood Mononuclear Cells by More Than a Year. *JAIDS* 34:1-6, 2003.

Hachiya A., Matsuoka-Aizawa S., Tsuchiya K., Gatanaga H., Kimura S., Tatsumi M. and Oka S. "All-in-One Assay", a direct phenotypic anti-human immunodeficiency virus type 1 drug resistance assay for three-drug combination therapies that takes into consideration in vivo drug concentrations. *J Virol Methods*. 2003, 111:43-53.

Takebe Y., Motomura K., Tatsumi M., Lwin H.H., Zaw M. and Kusagawa S. High prevalence of diverse forms of HIV-1 intersubtype recombinants in Central Myanmar: geographical hot spot of extensive recombination. *AIDS*. 2003, 17:2077-87.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

平成15年度

エイズ医薬品等開発研究
重点研究報告書
国際研究グラント事業 研究報告書

平成16年9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