

平成18年度

政策創薬総合研究
重点研究報告書（Ⅱ）

平成18年度

政策創薬総合研究

重点研究報告書（Ⅱ）

目 次

KH51039	臍帯血移植患者へのドナーリンパ球輸注療法 (DLI) の実用化	藤原成悦 ……	589
KH51041	C型肝炎ウイルスの感染・複製系の確立とその応用による抗ウイルス療法の開発	脇田隆字 ……	636
KH51042	個体特性に着目した食品成分の骨粗鬆症に対する予防効果に関する研究	石見佳子 ……	656
KH51043	食品からの食中毒起因菌の高感度迅速検出法の開発とリスクマネージメントへの応用	山本茂貴 ……	671
KH51044	食品添加物等の新機能性に関する研究	広瀬雅雄 ……	680
KH51045	新規ミスマッチDNA特異的修飾試薬を用いた全ゲノムからの既知および未知の生活習慣病関連遺伝子のSNPs検出システムの開発	池田康行 ……	691
KH51046	気管支喘息、慢性閉塞性肺疾患 (COPD) 重症化機序の分子細胞システムとしての理解に基づく新たな制御方法の確立に関する研究	松本健治 ……	707
KH51048	新しい粘膜アジュバントおよび粘膜ワクチンの開発に関する研究	長谷川秀樹 ……	720
KH51049	バイオテクノロジーによるワクチンの創製と改良技術の開発	松浦善治 ……	728
KH51050	可溶性ウイルス受容体等を利用した抗ウイルス剤の開発に関する研究	田口文広 ……	740
KH51051	ワクチン創生の新テクノロジーと新規ワクチンの開発	小島朝人 ……	761
KH51052	脂質輸送を制御する生活習慣病予防薬開発のための基礎的研究	最上知子 ……	772
KH51054	核酸封入ナノカプセルによるウイルス消毒薬、抗ウイルス薬の創薬に関する研究	武田直和 ……	783
KH51055	siRNA発現ライブラリーによる新興・再興感染症の原因ウイルスの複製に必須な遺伝子の検索および創薬への応用	森川 茂 ……	795
KH51057	血管新生の制御による虚血系疾患治療薬の開発に関する基礎的研究	新見伸吾 ……	814
KH51058	天然抗酸化剤を利用した創薬化学	福原 潔 ……	826
KH51102	内因性幹細胞の動員、生着、心筋分化による重症心不全・再生療法の確立	長谷川浩二 ……	836
KH61059	幹細胞等を用いた細胞組織医療機器の開発と評価技術の標準化	土屋利江 ……	839
KH61060	新しい修飾技術を用いた再生医療用生物由来素材の開発	岸田晶夫 ……	919
KH61061	霊長類ES細胞の無フィーダー、無血清培養を用いた新しい未分化維持増殖培養法と血液細胞分化制御系の開発	湯尾 明 ……	939
KH71063	臓器移植患者の小腸及び肝組織を用いた遺伝子機能解析に基づくテラーメイド免疫抑制療法の確立に関する研究	乾 賢一 ……	951
KH71064	ヒト細胞を供給源とした再生医療の早期実現化を目指す有効性、安全性の検証システムの確立	梅澤明弘 ……	966

KH71066	創薬基盤としての公共的ヒト組織バンクを中心とした肝組織・細胞の研究利用システムの構築	絵野沢 伸 ……	979
KH71068	ヒト型遺伝毒性試験系の開発とそのバリデーション	本間 正充 ……	1000
KH71069	高機能保持ヒト肝細胞組込型細胞チップとナノセンサーによる新薬開発における薬物動態・毒性を評価する新規バイオセンサーの開発	永森 静志 ……	1021
KH71070	ケミカルゲノミクスによる難治固形癌に有効な主要抗癌剤の薬効貢献分子の探索と発見された分子を標的とする次世代抗癌剤の開発	西尾 和人 ……	1042
KH71071	外科手術摘出ヒト組織を用いたオーダーメイド医療の研究と遺伝多型を考慮したヒト肝細胞の代謝研究への応用に関する研究	大野 泰雄 ……	1054
KH72077	ヒト胎盤組織を用いた薬物の胎児移行性及び胎児毒性の定量的評価	澤田 康文 ……	1070
KHB1201	タンパクリン酸化酵素SIKの糖・脂質代謝における役割と創薬標的評価系の開発	竹森 洋 ……	1080
KHB1202	家族性黄斑変性カニクイザルを用いた加齢黄斑変性の新規治療及び予防薬の開発	寺尾 恵治 ……	1086
KHC1203	弱毒性ウイルスワクチンの品質向上、生産性向上に関する研究	大隈 邦夫 ……	1090
KHC1204	チオレドキシシンなど抗酸化反応性活性酸素種処理分子の高発現を促す新しい健康増進医薬の開発	井上 達 ……	1096
KHC2206	腹膜癒着予防剤の開発と応用	土肥多恵子 ……	1106
KHD1205	ヒト乾燥羊膜の機能再生医療材料への実用化に関する研究	阿久津英憲 ……	1111
KHD2207	ヒト由来細胞・組織バンクの活用拡大のためのシステム構築と研究資源の高度化に関する研究	後藤 雄一 ……	1115

高機能保持ヒト肝細胞組込型細胞チップとナノセンサーによる新薬開発における薬物動態・毒性を評価する新規バイオセンサーの開発

所属 杏林大学医学部 総合診療科学

研究者 永森 静志

研究期間 平成16年4月～平成19年3月

研究要旨 新バイオセンサー開発のためヒト肝細胞と新3次元バイオリアクターで新薬開発時薬物動態・毒性を評価。肝産生蛋白・薬物代謝能、抗HCV薬の評価に適したRFB/HCV実験、ヒト肝細胞特異的遺伝子発現の確認と利用ネット構築。

分担研究者

- (1) 杏林大学医学部 金井好克
- (2) 国立医薬品食品衛生研究所 本間正充
- (3) 筑波大学学際物質科学研究 長崎幸夫
- (4) 千葉大学大学院薬学研究院 千葉寛
- (5) 岡山大学大学院 宮崎正博
- (6) 国立感染症研究所 鈴木哲朗, 相崎英樹
- (7) 名古屋大学大学院 小田裕昭
- (8) 秋田大学医学部 杉山俊博
- (9) 中外製薬株式会社 木下春喜, 西宮一尋
- (10) 京都大学医学部 下遠野邦忠
- (11) 順天堂大学医学部 市田隆文
- (12) 岩手医科大学 鈴木一幸
- (13) 千葉科学大学 細川正清

A. 研究目的

薬物動態における種差や薬物相互作用は開発中の医薬品が臨床試験段階でドロップアウトする原因の第一位にあげられている。ヒトにおける代謝、毒性の予測は最も重要な課題である。正常ヒト肝細胞の恒常的あるいは広範な使用には限界がある。申請者が樹立したヒ

ト薬物代謝能を保持するヒト肝由来培養細胞株 FLC または JHH 系細胞を新薬開発の様々な段階で利用可能な新規バイオセンサーの開発を目的とする。

B. 研究方法

永森研究方法：ラジアルフロー型バイオリアクター (RFB) は、付着依存性動物細胞の高密度大量培養を目的として開発。培養液が円筒形のリアクター外周より充填された担体層を通り中心部に流れる3次元バイオリアクターである。装置の特徴は、3次元構造を有する多孔性の担体を用いることにより、グルコース消費量より積算した細胞密度が、 $1\sim 1.5 \times 10^8$ cells/ml-matrix という高密度培養が可能。使用した3次元担体シランは、球状の多孔質ガラスであり球径 0.4-0.6mm、気孔率 55-60% である。また、CELLYARD beads は、平均粒径 500um のナイロン粒子表面をハイドロキシアパタイトの微小粒子で被覆した微小球体。単層培養と3次元培養における肝細胞特異的遺伝子の発現量の比較を行う。機能発現を探索するために、肝細胞特異的遺

伝子の発現及び発現量の確認を行うことにした。

定量PCR (簡便法) : 単層培養と3次元培養の培養細胞からtotal RNAを抽出し、cDNAを合成する。合成したcDNAを鋳型として、PCRを行う。PCRには肝細胞特異的遺伝子の配列をもとに合成したプライマーを用いる。単層培養と3次元培養でのPCR産物のアガロース電気泳動を行い、エチジウムブロマイド染色によって発現量の比較を行う。内部標準遺伝子として、 β 2-microglobulin遺伝子及び β -actin遺伝子も同様にPCRを行う。

さらに本研究にて開発されたヒト細胞株を広く研究者に配布することにより細胞の多角的な保有機能研究を推進する。

木下・西宮 ; ラジアルフロー培養したFLC細胞に肝毒性を有するヒドラジンを添加。サンプリングとしNMR測定用試料とした。スペクトルを数値化して、主成分分析を行った。

FLC-4,5,7,JHH-5,7を6cmシャーレで培養した。それぞれの細胞にヒドラジンを2 mM (肝毒性群1)、4 mM (肝毒性群2)となるように添加して48時間暴露した。ヒドラジン非添加で48時間放置した群をコントロール群とした。

各群の培養上清1mLを採取し、上清液中のAlbumin,LDH,AST,ALT値の測定およびNMR測定を実施した。NMR用の試料は培養液上清150 microLに0.9% NaCl含有D₂O溶液350 microLを加え攪拌したものを測定試料とした。NMR測定はPre saturation 1D-NOESY測定を行った。得られたNMRスペクトルはパケット積分を実施後、Principal component analysis(PCA)にて解析を行った。

金井 : FLCの輸送系Lの機能解析。FLC4におけるトランスポーターの発現解析。RFBによるFLC4の肝臓特異的遺伝子の発現変化。

千葉班方法 : 1 平面培養。 2 細胞アレイを用いた培養。 3 ヒト初代肝細胞培養。

4 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) によるアルブミンの定量。 5. Real-time PCR。

宮崎方法 : 1. 骨髄細胞培養。 2. 免疫細胞化学染色。 3. RT-PCR

杉山方法 : グルクロン酸、硫酸抱合物の生成・排泄系。FLC4細胞が1-ナフトールをグルクロン酸化あるいは硫酸化。メルカプツール酸の生成・排泄系。S-benzylcysteineの代謝。FLC4細胞によるメタゾラミドの代謝。

下遠野方法 : (1) HCVゲノム自律複製細胞中のウイルスゲノム RNA の末端構造の解析。(2) HCVゲノム複製を制御する細胞側因子の解析。

長崎班研究方法 : ①ガラス表面のPEG化 ②スポットターによるアルカリエッチングパターニング ③解析電子スピン共鳴ゼータ電位測定とタンパク吸着試験。

鈴木相崎方法 : 化学合成高分子で温度感応性高分子 Thermo-reversible Gelatin Polymer (TGP) を用いヒト肝細胞癌株の三次元培養系を開発した。TGP 培養したヒト肝細胞株の形態学的解析及びチトクローム P450 CYP3A4 の機能発現解析。

下遠野方法 : (1) HCVゲノム自律複製細胞中のウイルスゲノム RNA の末端構造の解析。(2) HCVゲノム複製を制御する細胞側因子の解析。

(倫理面への配慮)

プロジェクト全般にわたり杏林大学医学部倫理委員会をはじめ各施設での審議を受ける。本プロジェクトで使用するヒト組織は既に樹

立した細胞株であり、使用方法も直接ヒトに作用させるものでないので、組織の入手や研究の目的での倫理面での問題性は低い。

C. 研究結果

永森：： 自己樹立した FLC および JHH 系のヒト肝由来細胞と新しく開発した 3 次元培養法である RFB の肝細胞特異的遺伝子発現及び発現量の確認。およびヒト肝細胞株機能の検討のため広く国内外の研究者に株細胞配布ネットワークを作成した。

木下春喜、西宮一尋：： ヒドラジンをラジアルフロー培養した FLC 細に添加し経時的に増加するピークを検出した。

金井： FLC4 のアミノ酸輸送特性の検討により、FLC4 で同定した肝細胞型新規アミノ酸トランスポーターLAT3 が、FLC4 の主要なアミノ酸トランスポーターであることが確認され FLC4 の高機能保持ヒト由来肝培養細胞株としての特性がアミノ酸トランスポーターの観点からも指示された。

長崎：： 構造化した細胞アレイ表面を構築するために、機材表面の処理法およびパターン化に関して詳細に検討した。ガラス機材上に構築した PEG ブラシをアルカリエッチングでパターン化した場合、タンパク質のパターンは明確に作製できたが細胞アレイには至らなかった。フォトリソグラフィで作製されたものはきれいな内皮細胞パターンを与えその上に株細胞および初代細胞のパターンニングが達成された。

千葉：： ヒト肝由来細胞を用いた検討により、スタチンであるアトルバスタチン、フルバスタチン、セリバスタチンおよびシンバスタチンが hCAR を介した PBREM の転写活性化を起こすことが明らかとなった。その活性化のメカ

ニズムとして、これら 4 種のスタチンが hCAR のリガンドとなる可能性が示唆された。

宮崎： 骨髄細胞を HGF および EGF を添加した HGM 培地で培養。アルブミン, AFP, CK-8, CK-18 のほか肝細胞の最終分化マーカーである TO および TAT を発現する継代培養可能な成熟肝細胞類似の細胞を誘導できることが明らかとなった。

杉山： 肝細胞(FLC4)を用いて、自然界菌類のうち、放線菌新規産生物が肝細胞の維持、増殖を制御することが判明した。FLC4 に対する#675 の増殖促進効果について、アポトーシスの抑制を介して細胞が維持されているというメカニズムが考えられた。

下遠野： HCV ゲノム自律複製細胞を用いてウイルスゲノムの構造を明らかにした。本細胞においてはウイルスポリメラーゼによる転写開始におけるヌクレオチド選択の冗長性が明らかになった。この情報をもとにして転写開始機構については試験管内と生体内とはかなり異なる可能性が示唆され、ポリメラーゼによる RNA 合成開始を標的にする抗 HCV 剤の開発には慎重を要することが示唆される。

永森：： FLC および JHH 系のヒト肝由来細胞と新しく開発した 3 次元培養法である RFB のシステムにより、新薬開発時薬物動態・毒性を評価する新規バイオセンサー作製のため肝産生蛋白・薬物代謝能、抗 HCV 薬の薬効評価に適した RFB/HCV 実験、肝細胞特異的遺伝子発現及び発現量の確認をした。

金井： FLC4 のアミノ酸輸送特性の検討により、FLC4 で同定した肝細胞型新規アミノ酸トランスポーターLAT3 が、FLC4 の主要なアミノ酸トランスポーターであることが確認され、FLC4 の高機能保持ヒト由来肝培養細胞株とし

ての特性がアミノ酸トランスポーターの観点からも指示された。今後全トランスポーターの網羅的解析に基づき、特に薬物トランスポーターの観点からのFLC4の評価を行うとともに、FLC4の三次元培養における薬物トランスポーターの特性を明らかにした。

細川：ヒト肝由来細胞株より、ヒト肝に発現する2つのCES遺伝子の発現様式が肝の分化に伴っていることが推察され、2つのCES遺伝子の発現時期の違いが、異物代謝における役割の違いを反映するものと考えられた。

宮崎：骨髄細胞をHGFおよびEGFを添加したHGM培地で培養により、アルブミン、AFP、CK-8、CK-18のほか肝細胞の最終分化マーカーであるT0およびTATを発現する継代培養可能な成熟肝細胞類似の細胞を誘導できた。

鈴木：full-length dicistronic HCV-RNAを保持した細胞株のRFB培養系で、培養上清中1.18 g/mL分画にHCV-RNA、コア蛋白質のピークが認められ、直径30-60 nmのウイルス様粒子が観察された。

杉山：肝細胞(FLC4)を用いて、自然界菌類のうち放線菌新規産生物が肝細胞の維持、増殖を制御が判明した。

下遠野：HCVゲノム自律複製細胞を用いて、ウイルスゲノムの構造を明らかにした。その結果、本細胞においてはウイルスポリメラーゼによる転写開始におけるヌクレオチド選択の冗長性が明らかになった。自然免疫がHCVゲノム複製を強く制御することを示した。この成果は、HCV感染初期における樹状細胞の活性化の機構を考える上に重要な知見を与えると期待されるし、インターフェロン治療により効果が出にくい患者に対する治療法についても新たな知見を与えるものである。

H18：成果と考察＝薬物動態・毒性を評価する新規バイオセンサー作製。肝産生蛋白・薬物代謝能、抗HCV薬の薬効評価に適したRFB/HCV実験。肝特異的遺伝子発現及び発現量の確認。細胞アレイプレートによる活性状態傾向を確認。FLC4細胞利用ではalbuminやP450分子種のmRNA発現量、遺伝子発現に関する肝転写因子のmRNA発現量が大きく上昇を確認。アミノ酸輸送特性の検討し肝細胞型新規アミノ酸トランスポーター-LAT3が、FLC4の主要アミノ酸トランスポーターであると確認、高機能保持細胞株特性がアミノ酸トランスポーターの観点からも確認。今後全トランスポーターの網羅的解析、当該チップでのFLC4の薬物トランスポーターの特性を明らかにする。ヒト肝に発現する2つのCES遺伝子の発現様式で肝の分化が推察され、このCES遺伝子の発現時期の違いが、異物代謝における役割の違いと考えた。HCVゲノム自律複製細胞を用いウイルスゲノムの構造を明らかにしウイルスポリメラーゼによる転写開始におけるヌクレオチド選択の冗長性を確認。転写開始機構が試験管内と生体内とで異なることが示唆され、ポリメラーゼによるRNA合成開始を標的にする抗HCV剤の開発には慎重を要する。自然免疫がHCVゲノム複製を強く制御し、成果HCV感染初期における樹状細胞の活性化の機構を考える上に重要な知見を与えると期待され、IFN治療で効果が少ない治療に新たな知見を与えた。

D. 考察

金井；今後さらに全トランスポーターの網羅的解析に基づき、特に薬物トランスポーターの観点からのFLC4の評価を行うとともに、FLC4の三次元培養における薬物トランスポーターの特性を明らかにする。

千葉考察：4種のスタチンがhCARのリガンドとなる可能性が示唆された。

細川考察：ヒト肝由来細胞株を用いることにより、ヒト肝に発現する2つのCES遺伝子の発現様式が肝の分化に伴っていることが推察され、2つのCES遺伝子の発現時期の違いが、異物代謝における役割の違いを反映するものと考えられた。

宮崎考察：これらの経験を基盤として、ヒト骨髄より肝前駆細胞を分画し、培養基質、培地、培養法などの工夫によって、増殖可能な前駆細胞を高い効率で肝細胞に分化誘導できれば、生体内移植による肝不全治療に直接使用し得る理想的な細胞になるだけでなく、体外設置型人工肝臓や薬品開発研究のためのヒト肝細胞を潤沢に供給するソースとなるであろう。

杉山考察：FLC4に対する#675の増殖促進効果について、アポトーシスの抑制を介して細胞が維持されているというメカニズムが考えられた。今後ペプチド性因子を培養系において検索し、その薬理作用、安全性評価を確立する。

下遠野考察：これらの情報をもとにして転写開始機構については試験管内と生体内とはかなり異なる可能性が示唆され、ポリメラーゼによるRNA合成開始を標的にする抗HCV剤の開発には慎重を要することが示唆される。自然免疫がHCVゲノム複製を強く制御することを示した。これは、HCV感染初期における樹状細胞の活性化の機構を考える上に重要な知見を与えると期待されるし、インターフェロン治療により効果が出にくい患者に対する治療法についても新たな知見を与えるものである。

長崎考察：肝細胞のスフェロイドアレイ構築

の技術により、肝細胞の活性を向上させることが示された。薬効検査などに利用可能なセンサチップとしての応用が期待される。

E. 結論

高機能保持ヒト肝細胞と新3次元バイオリアクターで新薬開発時薬物動態・毒性を評価する新規バイオセンサー作製。肝産生蛋白・薬物代謝能、抗HCV薬の薬効評価に適したRFB/HCV実験系と肝細胞特異的遺伝子発現の確認をした。

ことにより、研究者たちの多角的な分析結果はFLC-4をはじめとする細胞の安定した利用の道と発展が期待される。

F. 研究発表

論文発表

*Takehiko Ishii, Masayoshi Yamada, Takumi Hirase and Yukio Nagasaki, New Synthesis of Heterobifunctional Poly(ethylene glycol) Possessing a Pyridyl disulfide at One End and a Carboxylic Acid at the Other End, *Polymer Journal*, 37(3), 221-228 (2005)

Kawashima S, Kobayashi K, Takama K, Higuchi T, Furihata T, Hosokawa M, Chiba K. (2006)

"Involvement of hepatocyte nuclear factor 4{alpha} in the different expression level between CYP2C9 and CYP2C19 in the human liver." *Drug Metab. Dispos.* 34: 1012-8.

Shimizu T, Akimoto K, Yoshimura T, Niwa T, Kobayashi K, Tsunoo M, Chiba K. (2006)

"Autoinduction of MKC-963 metabolism in healthy volunteers and its retrospective evaluation using primary human hepatocytes and cDNA-expressed enzymes." *Drug Metab. Dispos.* 34: 950-4.

Miyazaki M, Yamashita T, Hosokawa M, Taira

- H and Suzuki A Species-, sex-, and age-dependent urinary excretion of cauxin, a mammalian carboxylesterase. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 145, 270-277, 2006
- Kawashima S, Kobayashi K, Takama K, Higuchi T, Furihata T, Hosokawa M and Chiba K Involvement of hepatocyte nuclear factor 4alpha in the different expression level between CYP2C9 and CYP2C19 in the human liver. *Drug Metab Dispos* 34:1012-1018, 2006
- Oka, H., Ikeda, K., Yoshimura, H., Ohuchida, A., Honma, M. Relationship between p53 status and 5-fluorouracil sensitivity in 3 cell lines. *Mutat. Res.*, 606, 52-60 (2006)
- Hamazaki H, Ujino S, Miyano-Kurosaki N, Shimotohno K, Takaku H. Inhibition of hepatitis C virus RNA replication by short hairpin RNA synthesized by T7 RNA polymerase in hepatitis C virus subgenomic replicons. *Biochem Biophys Res Commun.* 343 : 988-994, 2006.
- Ishii N, Watashi K, Hishiki T, Goto K, Inoue D, Hijikata M, Wakita T, Kato N, Shimotohno K. Diverse effects of cyclosporine on hepatitis C virus strain replication. *J Virol.* 80 : 4510-4520, 2006.
- aka K, Abe K, Takemoto K, Dansako H, Ikeda M, Shimotohno K, Kato N. Epigenetic silencing of interferon-inducible genes is implicated in interferon resistance of hepatitis C virus replicon-harboring cells. *J Hepatol.* 44 :869-878, 2006
- amazaki H, Takahashi H, Shimotohno K, Miyano-Kurosaki N, Takaku H. Inhibition of hcv replication in HCV replicon by shRNAs. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 25(7):801-805, 2006.
- Aly HH, Watashi K, Hijikata M, Kaneko H, Takada Y, Egawa H, Uemoto S, Shimotohno K. Serum-derived hepatitis C virus infectivity in interferon regulatory factor-7-suppressed human primary hepatocytes. *J Hepatol.* 46(1):26-36, 2007.
- Medina RJ, Kataoka K, Takaishi M, Miyazaki M, Huh NH. Isolation of epithelial stem cells from dermis by a three-dimensional culture system. *Journal of Cellular Biochemistry*, 98 (1), 174-184, 2006.
- Medina RJ, Kataoka K, Miyazaki M, Huh NH. Efficient differentiation into skin cells of bone marrow cells recovered in a pellet after density gradient fractionation. *International Journal of Molecular Medicine*, 17(5), 721-727, 2006.
- Takikawa Y, Endo R, Suzuki K, et al. Prediction of hepatic encephalopathy development in patients with severe acute hepatitis. *Dig Dis Sci* 2006;51:359-364.
- G. 知的財産権の出願・登録状況
 1N 特許取得
 特許取得
 発明の名称：高機能保持ヒト肝由来細胞樹立
 発明者：Nagamori et al.
 特許取得日：1995.
 特許番号：U.S.A. Patent No.5.804.441)
 特許出願
 発明の名称：肝炎ウイルスの増殖方法及び装

置

発明者 : 永森静志

出願人 : 科学技術振興事業団

特許出願日 : 2002 年 8 月 21 日

国際出願番号 : PCT/JP00/05582

特許出願

発明の名称 : ハイブリッド型人工肝臓

発明者 : 永森静志、旭メディカル株式会社

特願平 9-58650

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

平成18年度

政策創薬総合研究
重点研究報告書(Ⅱ)

平成19年7月31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