

平成18年度

若手研究者奨励研究報告書

目 次

政策創薬総合研究

課題番号

KH13302	再生医療を目的としたアデノウイルスベクターによるES細胞への効率的な遺伝子導入・発現系の開発	川端健二 …… 1
KH23303	腎不全の進展・増悪因子の解明と腎機能保護法の開発に関する研究	増田智先 …… 12
KH23304	Toll様受容体 (TLR3) を介したミクログリア活性化機序の解明と脳炎治療薬開発のためのハイスループット試験系への応用	中道一生 …… 26
KH23306	吸血昆虫唾液腺生理活性物質の特性解明と創薬への応用に関する研究	伊澤晴彦 …… 37
KH23307	アポトーシス関連分子EATの機能制御によるES細胞の増殖・分化培養法の開発	大喜多 肇 …… 50
KH23331	寄生性原虫の生育に必須な脂質成分の代謝と輸送ならびに創薬探索に関する基礎的研究	中野由美子 …… 60
KH33308	向精神薬のSNPs解析による有効性・安全性に関する研究	橋本亮太 …… 66
KH33309	ヒトの薬物体内動態の予測向上を目指した薬物代謝酵素および薬物トランスポーターの誘導に関するインシリコ予測	小林カオル …… 79
KH33310	薬剤排出トランスポーターの基質輸送メカニズムに関する研究	田辺公一 …… 92
KH33332	制癌分子標的療法の創薬と開発にかかわるブリッジングスタディーの基礎的および応用的研究	川上浩司 …… 101
KH53312	LEE遺伝子群非保有型腸管出血性大腸菌の疫学マーカーおよび新規治療薬の標的となる病原性遺伝子に関する基礎的研究	伊豫田 淳 …… 105
KH53313	遺伝子修飾による樹状細胞の機能強化に基づいた新規癌免疫療法の開発	岡田直貴 …… 116
KH53314	PET検査を用いた癌二次予防の診断アルゴリズムの開発、PET検診施設間のネットワーク構築および死亡率低下の検証研究	小島伸介 …… 126
KH53315	網羅的遺伝子破壊による真菌症病原性発現の分子機構の解明と新規抗真菌剤開発への応用に関する研究	梅山 隆 …… 136
KH53333	治療ターゲットとしてのFc γ 受容体を介した Dengue 出血熱の病態形成機序の解析	林 昌宏 …… 150
KHC3361	C型肝炎ウイルス粒子産生制御による新規治療法の萌芽的研究	村上恭子 …… 156
KHC3362	高齢化社会に適応する歯の延命化を目指した歯髄・象牙質再生による新しい抜髄治療法の開発	庵原耕一郎 …… 162
KHC3363	HDL形成責任タンパク質ABCA1の代謝制御をターゲットとした新規動脈硬化治療法に関する研究	奥平桂一郎 …… 167

エイズ医薬品等開発研究

KA13701	ヘルペスウイルス感染症の新規制御法の確立と潜伏感染機構の 解明	藤室雅弘 ……173
KAC3761	論理的創薬手法によるHIV-1プロテアーゼ二量体化を阻害す る低分子化合物の探索	中村寛則 ……186
KAC3762	HIV治療用合成siRNAの新規デリバリーシステムの開発	児玉耕太 ……191

Toll様受容体(TLR3)を介したミクログリア活性化機序の解明と脳炎治療薬開発のためのハイスループット試験系への応用

所属 国立感染症研究所 ウイルス第一部
研究者 中道 一生

研究要旨 病原性を減弱させた向神経性ウイルスがマウスの脳において効率よく炎症反応を誘導する性質を応用し、抗炎症物質の有効性を生体レベルで評価するための迅速かつ簡便な脳炎動物モデルを確立した。

A. 研究目的

血液脳関門は病原体や有害物質に対する物理的防壁として機能するだけでなく、末梢から脳実質への免疫細胞の移行さえも厳しく制限する。そのため、脳特有の閉鎖環境における免疫システムは極めてシンプルであり、常在型のマクロファージ系細胞であるミクログリアが中心的かつ多彩な役割を担っている。正常組織におけるミクログリアは静止型として存在し、微小環境の変化を常に監視している。脳局所に異常が生じた場合、ミクログリアは形態変化することで変性細胞を貪食除去する。また、サイトカインやケモカイン等の液性因子を分泌することで免疫応答を調節する。

近年、ミクログリアが脳の恒常性維持に必須である反面、慢性的かつ過剰な細胞応答は炎症反応による神経破壊を引き起こすことが知られている。ミクログリアの活性化が関与する疾患としては、アルツハイマー病やパーキンソン病、多発性硬化症、ウイルス性脳炎等が挙げられる。また、血管障害や頭部外傷における炎症においてもミクログリアの応答が深く関与する。これらの知見は、ミクログリアの活性化を一時的に抑制する薬剤が脳疾患治療薬として有効であることを意味する。以上の背景から、本研究は、ミクログリアの炎症応答の分子メカニズムを基盤として、細胞活性化を迅速かつ簡便に測定するための試験系を確立し、脳炎治療薬の探索技術として応用することを目的とする。

ミクログリアを指向する脳疾患治療薬の開発には、薬剤の作用機序を解析するための大規模な細胞供給が必要となる。しかしながら、開発コストや技術面での問題ならびに倫理的な配慮から、大

量の初代培養ミクログリアを用いた薬剤スクリーニングは極めて困難である。前年度までの研究では、初代培養ミクログリアの性質を保持しながらも、自立増殖が可能な不死化細胞株(MG6-1細胞)の培養系を確立した。また、MG6-1細胞がToll様受容体3(TLR3)リガンドである二本鎖RNAに対して鋭敏に応答する性質を応用し、ミクログリアの活性化に対する抗炎症物質の影響を多面的に解析するための試験系を開発した。さらに、本試験系を用いて実際にミクログリアの活性化を抑制する化合物を特定し、その有用性を確認した。

これら一連の研究から、ミクログリアを標的とした創薬における基盤的技術はすでに確立されており、研究目的に到達しつつある。しかしながら、MG6-1細胞培養系を用いて得られる情報はミクログリア自体に対する薬剤の影響についてのみであり、脳への浸透性や毒性等によっては薬剤が有効に作用しない可能性がある。したがって、細胞レベルで得られた抗炎症物質の有効性を生体レベルで評価する必要がある。現在、炎症性脳疾患のモデルとなる様々な動物実験系が考案されており、個々の疾患を対象とした研究において高い有用性を発揮している。しかしながら、①脳炎を誘導する際に煩雑な外科的手術を要する、②カテーテルの挿入等によって組織破壊が生じる、③炎症が脳の特定位位に限局される、等の理由から試験系のハイスループット化が困難である場合が多い。

最終年度では、病原性を減弱させた狂犬病ウイルス固定毒株がマウスの脳において効率よく炎症を誘導する性質を応用し、脳炎治療薬の有効性を評価するための簡便な脳炎動物モデルを確立することを目標として研究を行った。

B. 研究方法

1. 炎症誘導物質の脳定位投与：

C57BL/6J系統のマウス(メス、7週齢)をペントバルビタールナトリウム注射液にて深麻酔処置し、脳定位固定装置に頭部を設置した。頭皮を切開した後、脳座標に従って頭蓋骨に直径1 mmの孔を形成し、脳室内に微小カテーテルを挿入した。マイクロインジェクターを微小カテーテルに接続し、炎症誘導物質であるpolyinosinic-polycytidylic acid [poly(I:C)] (10 μ g/2 μ L)を低流速で注入した。比較対照群には等量の生理的食塩水のみを投与した。切開部を縫合した後、2日を経過した時点で各群4匹を安楽殺し、脳を採取した。

2. ウイルスの調製：

ウイルス感染実験には challenge virus standard-11 (CVS-11)株の狂犬病ウイルスを用いた。CVS-11株は病原性を減弱させた固定毒株であり、一般的なバイオハザード対策施設(レベル2)において取り扱いが可能である。本ウイルスの安全性については「D. 考察」において詳述した。マウス神経芽種由来細胞(NA細胞)にウイルスを接種し増幅させた。接種72時間以降に細胞培養上清を回収した。培養液中のウイルス粒子を超遠心処理により沈殿させた後、0.2%牛血清アルブミンを添加したリン酸緩衝生理食塩水(0.2%BSA-PBS)に浮遊させ、ウイルス液として用いた。

3. ウイルスの接種：

上記系統のマウスを麻酔処置した後、インスリン用注射器を用いて約50 LD₅₀のウイルスを右大腿部筋肉内に接種した。比較対照群のマウスには、0.2%BSA-PBSを筋肉内に投与した。接種直後(0日)から14日後まで、1日毎に体重の測定、ならびに病態の観察を行った。また、接種0日、および1、3、5、7日後に各群4頭のマウスを安楽殺し、脳を採取した。

4. 脳の採取：

比較対照群およびウイルス接種群、もしくはpoly(I:C)投与群のマウスを深麻酔処置した後、胸部を切開し、シリコンチューブを接続した注射針を左心室に留置した。右心耳を切開した後、ペリスタポンプを用いてシリコン

チューブ内にPBSを送液し、血管内灌流による脱血処置を施した。全脳を摘出した後、拡大スコープを用いて大脳および間脳、脳幹、小脳を分離し、RNA抽出に供した。

5. ウイルスゲノムコピー数の測定：

脳の各部位から全RNAを抽出した後、狂犬病ウイルスのマイナス鎖ゲノムRNAに特異的なDNAプライマーを用いた逆転写反応を行い、cDNAを合成した。逆転写産物に含まれるウイルスcDNA断片をヌクレオプロテイン(N)遺伝子領域に対するプライマーを用いたリアルタイムPCRによって増幅した。その際、既知濃度の標的DNAを基準としてウイルスゲノムcDNAのコピー数を定量した。

6. 遺伝子発現様式の解析：

脳の各部位から全RNAを抽出した後、オリゴdTプライマーを用いた逆転写反応を行い、cDNAを合成した。予備実験においてあらかじめ解析した炎症関連遺伝子の発現プロファイルに基づき、サイトカインinterferon- β (IFN- β)、interleukin-1 β (IL-1 β)、IL-6、IL-12、tumor necrosis factor- α (TNF- α)、およびケモカインCC chemokine ligand 2 (CCL2)/MCP-1、CCL3/MIP-1 α 、CCL5/RANTES、CXC chemokine ligand 2 (CXCL2)/MIP-2、CXCL10/IP-10のcDNA量をリアルタイムPCR法により測定した。ウイルス接種による遺伝子発現量の変動を比較対照群(投与0日)との相対値として算出した。また、内部標準としてglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)のcDNA量を測定し、各サンプルのRNA回収率およびcDNA合成効率を補正した。

(倫理面への配慮)

本研究はマウスを用いた実験を主体としている。各実験の遂行に際しては、国立感染症研究所実験動物委員会において倫理面での審査を受け、承認を得ている。また、「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」等を遵守し、①飼育環境の維持、ならびに②適切な麻酔処置、③速やかな安楽殺、等の動物愛護を最大限配慮した上で研究を実施した。

C. 研究結果

1. 炎症誘導物質の脳内定位投与：

脳炎マウスモデルを作製するため、炎症誘導物質を脳室内に微量投与する実験系を検討した。誘導物質としては、①安価でロット差が少ない、②水溶性で調製や保存が容易である、③LPSと比較して細胞毒性が低く、汚染のリスクが少ない、④脳内における潜在的なミクログリア刺激因子である、等の利点から合成二本鎖RNAである poly(I:C)を用いた。poly(I:C)を投与したマウスの脳内では、IFN- β やCXCL10といった遺伝子の発現量が増加した。しかしながら、①発現誘導レベルは脳の部位において相違が大きく、脳幹等では顕著な応答は観察されなかった。また、②脳実質に液体を直接投与する場合、組織損傷の可能性がある、③外科手術において1匹あたり30分間～1時間程度の作業時間を要する、等の問題点から、実験系の迅速化や簡便化には限界があることが分かった。多検体を処理するためには、炎症誘導物質を末梢部位(筋肉や皮下等)へ注射するだけで効率的に脳炎を誘導する実験系が望ましい。そこで、炎症誘導物質を直接脳内に投与するのではなく、弱毒化した向神経性ウイルスを脳内に移行させることで炎症を誘導するモデルを着想した。

2. 弱毒化した向神経性ウイルスを用いた脳炎マウスモデルの作製：

狂犬病ウイルス固定毒株は、野生型のウイルスを多数回の継代によって弱毒化させた実験用のウイルス株である。このウイルスをマウスの末梢部位に接種した後、神経症状の推移を経時的に観察した。マウス系統としては、免疫学や神経科学、ウイルス学等の学問分野において広くに使用され、基礎的な知見が集積されているC57BL/6J系統を用いた。大腿部筋肉内に致死量のウイルス(約50LD₅₀、10⁷ FFU相当)を接種したマウスでは、接種後約5日を起点として体重が減少した。また、接種7日以降において神経症状(下肢の麻痺等)が認められた。その後、約7日間生存し、接種から約14日後に死亡した。これらの結果から、狂犬病ウイルス固定毒株を用いた場合、末梢部位へのウイルス接種のみによって容易に神経症状を誘導できることが分かった。

3. 脳内へのウイルス伝播様式：

ウイルスを接種したマウスでは、接種5日以降において体重減少が観察されることから、この時点においてすでにウイルスが中枢神経系に侵入している可能性が考えられる。脳内への時間的かつ空間的なウイルス伝播様式を調べるため、マウスから経時的に脳を採取し、大脳および間脳、脳幹、小脳におけるウイルスゲノム量を測定した(図1)。ウイルスを接種したマウスの脳幹では、接種3日後において全RNA 1 μ gあたり約10⁴コピーのウイルスゲノムが検出された。また、体重減少が生じる5日後および麻痺が生じる7日後では、脳幹だけでなく大脳や間脳、小脳においても全RNA 1 μ gあたり約10⁷コピーのウイルス遺伝子が検出された。この時点で、各部位におけるウイルス量には統計学的有意差は認められなかった。これらの結果から、大腿部筋肉内に接種したウイルスは、接種3日後には脳幹に侵入し、5日後には脳の各領域へと効率よく伝播することが分かった(図1)。また、マウスにおける病態の発現は、脳全体へのウイルス伝播と同じタイミングで生じることが分かった。

4. ウイルス感染脳におけるサイトカイン応答：

ウイルスに感染した脳では、炎症性サイトカインや抗ウイルス性サイトカインが産生され、ウイルス増殖の抑制や感染細胞の除去に働く。また、これらのサイトカインはグリア細胞等に作用し、多様な炎症性遺伝子群の発現を相乗的に誘導する。狂犬病ウイルス固定毒株を接種したマウスにおける脳内のサイトカイン応答が「いつ」「どこで」誘導されるのかを調べた。予備実験としてウイルスに感染したマウス脳における遺伝子発現プロファイルを解析した後、発現が増大する遺伝子に焦点を絞り、それらの時間的かつ空間的な発現誘導様式を解析した。ウイルスを接種したマウスでは、接種5日以降から間脳と脳幹および小脳において炎症性サイトカインであるIL-1 β とIL-6、IL-12、ならびに抗ウイルスサイトカインであるIFN- β の発現が顕著に増大した(図3から図5)。他の領域と比較した場合、大脳におけるサイトカインの発現誘導は緩やかであり、接種5日後において軽微な変動を示した後、7日以降において急激に増大した(図2)。これら

の結果から、狂犬病ウイルス固定毒株を接種したマウスでは、脳の全領域において効率的にサイトカイン応答が誘導されることが分かった。また、ウイルス感染脳におけるサイトカイン応答は、脳全体へのウイルス伝播や病態発現と同じタイミングで誘導されることが分かった。

5. ウイルス感染脳におけるケモカイン応答：

ケモカインは白血球の走化性を制御する低分子の分泌性蛋白質であり、システインモチーフによってCCおよびCXC等のサブファミリーに分類される。また、局所で産生された炎症性サイトカインやインターフェロンによってケモカインの発現が間接的に誘導されることが分かっている。脳におけるケモカイン産生は末梢の白血球を実質へと動員し、免疫応答や炎症反応を促進する。ウイルスを接種したマウスでは、接種5日以降から間脳と脳幹および小脳においてCCケモカイン(CCL2/MCP-1、CCL3/MIP-1 α 、CCL5/RANTES)ならびにCXCケモカイン(CXCL2/MIP-2、CXCL10/IP-10)の発現が顕著に増加した。とりわけ、CXCL10の発現はウイルス未接種の場合と比較して1,000倍以上増加することが分かった(図3から図5)。また、ウイルスを接種したマウスの大脳においては、接種5日後にケモカインの発現量が有意に増加し、7日後に他の領域(脳幹および小脳、間脳)と同程度のレベルにまで達した(図2)。これらの結果から、ウイルスを接種したマウス脳では、サイトカインの場合と同様にケモカインの発現が増大することが分かった。

D. 考察

前年度までの本研究では、初代培養ミクログリアと酷似した性質もつ不死化細胞株の新規培養系を確立した。また、TLR3リガンド(合成二本鎖RNA)に対するミクログリアの炎症応答を基盤として、抗炎症剤の作用を多面的に解析するためのcell-based assay系を構築した。さらに、本試験系を用いて実際に薬剤スクリーニングを行い、その実用性を確認した。本年度では、抗炎症剤の有効性を生体レベルで評価するための脳炎動物モデルの開発に着手した。

本研究では、脳炎マウスモデルを作製するため

の第一段階として、免疫刺激物質であるTLR3リガンドを脳室もしくは実質に微量投与する実験系を検討した。しかしながら、この方法には、①外科手術において煩雑かつ長時間の作業を要する、②カテーテルの挿入や液体の注入によって組織破壊を生じる危険性がある、③炎症範囲が脳の特定位に限定される、等の欠点があり、試験系のハイスループット化が困難であると判断した。また、現在までに考案されている脳炎モデルは個々の疾患の研究において高い有用性を発揮する反面、これらの課題を克服していない場合が多い。TLR3はウイルスの複製段階において産生される二本鎖RNA構造を認識することが知られている。本研究では、生体内において潜在的にTLR3リガンドを産生するウイルスを用いた脳炎動物モデルに注目した。

ウイルスを用いた動物モデルでは、安全性が最大の課題となる。ウエストナイルウイルスやヒト免疫不全ウイルス等の病原体の場合、その取り扱いにはバイオセーフティレベル(BSL)3の施設が必要となる。また、単純ヘルペスウイルスといったBSL2の病原体であっても、ワクチンが実用化されていない場合には感染事故の危険性を伴う。この課題を解決するため、本研究では狂犬病ウイルス固定毒株を用いた。本株は野生型ウイルスを高度に継代することで弱毒化させた実験室株であり、一般的なバイオセーフティ実験室(BSL2)において作業が可能である。また、実験動物を用いた解析から、固定毒株によるヒトへの病原性は極めて低いと考えられるが、ワクチン接種による十分な安全対策を講じることが可能である。

二段針を用いて固定毒株をマウス脳内に接種する病態モデルは高い再現性と迅速性を有するため、企業における狂犬病ワクチンの品質評価において実際に使用されている。固定毒株を脳ではなく末梢部位に接種した場合にも脳炎の誘導は可能であるが、多数の個体群において発症までのタイミングを同調させることは極めて難しい。本研究では、濃縮したウイルスを筋肉内に接種することで安定して脳炎を誘導できることが分かった。この実験系の場合、接種はマウス1頭当たり数十秒で完了するため、外科的手術等による煩雑かつ長時間の作業を必要としない。加えて、末梢部位に接種したウイルスは神経接続を介して脳特異的に伝播するため、脳の部分的損傷や他臓器への感染による副次的な影響を生じない。また、固定毒株がマウス

の脳に炎症反応を誘導することは古くから知られているが、それらの知見は脳等における断片的な情報が多く、詳細な炎症応答機序は解析されていなかった。本研究の結果、固定毒株を接種したマウスの脳では、脳幹や小脳を含む全領域において分子レベルの炎症応答が誘導されることを示した。これらの応答は体重減少や神経症状と連動して生じることから、脳の内部における炎症反応を容易に把握することが可能である。

ウイルスを用いた脳炎動物モデルにおける安全性以外の課題としては、ウイルス増殖による個体へのダメージが挙げられる。本研究では、安全面での条件を充たすウイルスとして、日本脳炎ウイルスを用いた脳炎動物モデルについても検討した。しかしながら、発症までの期間に個体差があるだけでなく、発症から死亡までの日数が約1~3日と短いため、創薬への応用性は低いとの結論に至った。他のウイルスと比較した場合、狂犬病ウイルスによる毒性は極めて小さいことが知られており、感染組織における細胞溶解等はほとんど観察されない。そのため、薬剤の作用を安定して解析することが可能である。また、脳における標的は神経細胞であるため、ミクログリアやアストロサイト等のグリア細胞の炎症応答においては、ウイルス由来成分による直接的な影響をほとんど受けない。今後の展開としては、補液等の改善による生存期間の延長、ならびに炎症を誘導した後に脳から排除される変異ウイルス株の開発等、試験系の利便性の向上、ならびに動物の負担軽減を目的としたモデルの改良を行う必要がある。

E. 結論

病原性を減弱させた向神経性ウイルスがマウスの脳において効率よく炎症を誘導する性質を応用し、抗炎症剤の有効性を生体レベルで評価するための迅速かつ簡便な脳炎動物モデルを確立した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakamichi K, Saiki M, Kitani H, Kuboyama Y, Morimoto K, Takayama-Ito M, Kurane I. Suppressive effect of simvastatin on interferon- β -induced expression of CC chemokine ligand 5 in microglia. *Neuroscience Letters* (2006) 407(3):205-210.

- 2) Nakamichi K, Saiki M, Kitani H, Kuboyama Y, Morimoto K, Takayama-Ito M, Kurane I. Roles of NF- κ B and MAPK signaling pathways in morphological and cytoskeletal responses of microglia to double-stranded RNA. *Neuroscience Letters* (2007) 414(3):222-227.

2. 学会発表

- 1) 中道一生・伊藤睦代・久保山有紀・齋木めぐみ・倉根一郎
狂犬病ウイルス侵襲に対する脳のケモカイン応答.
第54回日本ウイルス学会学術集会・総会.
2006年11月(愛知).

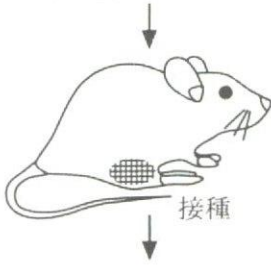
G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

図1: 研究の流れ

①弱毒化ウイルスを用いた脳炎動物モデルの作製

狂犬病ウイルス固定毒株

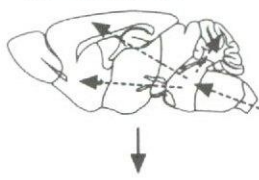


病態

5日後: 体重減少
7日後: 神経症状

②ウイルス伝播様式の解析

脳の縦断面図



感染様式

3日後: 脳幹へ侵入
5日後: 全域へ伝播

③時間・空間的な炎症応答の解析

図2:

大脳における
炎症関連遺伝子
の発現応答



相対値(倍)

	接種前	5日後	7日後
IFN- β	1	73	1000
IL-1 β	1	5	19
IL-6	1	12	111
IL-12	1	21	583
TNF- α	1	19	526
CCL2	1	55	421
CCL3	1	6	175
CCL5	1	29	773
CXCL2	1	39	137
CXCL10	1	148	1137

図3:

間脳における
炎症関連遺伝子
の発現応答



相対値(倍)

	接種前	5日後	7日後
IFN- β	1	418	811
IL-1 β	1	66	40
IL-6	1	68	98
IL-12	1	192	301
TNF- α	1	110	235
CCL2	1	181	309
CCL3	1	43	138
CCL5	1	93	752
CXCL2	1	39	24
CXCL10	1	1007	1132

図4:

脳幹における
炎症関連遺伝子
の発現応答



相対値(倍)

	接種前	5日後	7日後
IFN- β	1	2363	359
IL-1 β	1	101	15
IL-6	1	203	79
IL-12	1	764	74
TNF- α	1	2409	366
CCL2	1	428	343
CCL3	1	226	86
CCL5	1	489	822
CXCL2	1	235	37
CXCL10	1	1501	982

図5:

小脳における
炎症関連遺伝子
の発現応答



相対値(倍)

	接種前	5日後	7日後
IFN- β	1	216	629
IL-1 β	1	424	89
IL-6	1	278	441
IL-12	1	171	27
TNF- α	1	753	875
CCL2	1	502	787
CCL3	1	235	118
CCL5	1	461	1144
CXCL2	1	606	177
CXCL10	1	1286	1819

平成18年度

政策創薬総合研究事業
若手研究者奨励研究報告書

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