

博士學位論文

内容の要旨
および
審査の結果の要旨

薬学研究科

第48号

令和6年11月

徳島文理大学

は し が き

この冊子は、学位規則（昭和28年4月1日文部省令第9号）第8条による公表を目的として、本学において博士の学位を授与した者の「論文内容の要旨および論文審査の結果の要旨」を収録したものである。

目 次

(学位記番号)	(氏 名)	(論 文 題 目)	(頁)
甲第62号	川 田 大 周	低分子量DNA塩基損傷に対する酵素反応解析	1
乙第51号	浅 井 遥	マスト細胞の細胞内情報伝達系を標的とした化合物による抗アレルギー機構の解明	7

氏名	かわだ たいしゅう 川田 大周
本籍	香川県
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	甲第 62 号
学位授与年月日	令和 6 年 9 月 19 日
学位授与の要件	学位規定第 4 条第 1 項該当（課程博士）
学位授与の題目	低分子量 DNA 塩基損傷に対する酵素反応解析

指導教員	教授	山口 健太郎
論文審査委員	（主査）教授	田中 好幸
	（副査）准教授	富永 昌英
	（副査）准教授	桐山 賀充
	（副査）名誉教授	杉山 弘（京都大学）

DNA の塩基損傷は環境中の化学物質や活性酸素、紫外線などの外的・内的要因により生じる。発生した DNA 塩基損傷は複製過程において元の塩基対とは異なる塩基対を形成し、点突然変異を引き起こす。リボフラビン存在下における紫外線やメチレンブルー存在下における可視光など、様々な異なった酸化条件において G:C→C:G transversion や G:C→T:A transversion の優先的な発生が共通して観測される。この 2 つの点突然変異においてどちらも G:C 塩基対が発生の起点になっていること、G:C 塩基対のうち酸化電位が低いグアニンが酸化されやすいことから G:C→C:G transversion や G:C→T:A transversion の発生にはグアニン酸化損傷が関与しているのではないかと考えられる。この G:C→T:A transversion は、8-oxoguanine (8oxoG) など多数の安定な DNA 損傷により引き起こすことが知られている。一方、G:C→C:G transversion を引き起こす可能性のあるものはいくつか知られているが、熱安定性を有し、かつ、平面性を有するといった 2 つの要素を満たす DNA 損傷はまだ知られていない。そこで、グアニンから生成する Urea (Ua) や新規 DNA 損傷といった低分子量 DNA 塩基損傷でも同じように G:C→C:G transversion や G:C→T:A transversion を引き起こしうるのか興味を持った。

第 1 章ではチミンおよびグアニンから生成する DNA 損傷 Ua について DNA ポリメラーゼを用いた塩基取り込みおよび損傷乗越え反応について解析を行った。Ua は古くに発見報告のあった DNA 損傷であるが、損傷の相補鎖への塩基取り込みおよび損傷乗り越えの解析が意外にも Klenow fragment exonuclease⁻ や DNA ポリメラーゼ β でしか行われていなかった。そこで複製中 DNA ポリメラーゼの DNA ポリメラーゼ α や δ、ε、損傷乗り越え DNA ポリメラーゼである DNA ポリメラーゼ η と ζ を用いて Ua に対する塩基取り込みおよび損傷乗り越えについて解析した。その結果、Ua の相補鎖側への塩基取り込みでは、DNA ポリメラーゼ α や δ、ζ ではアデニンが、DNA ポリメラーゼ η は 4 つの塩基すべてを取り込み、DNA ポリメラーゼ ε は塩基を取り込まなかった。また、損傷乗り越えでは DNA ポリメラーゼ α がコントロールと比較して低効率ながらも乗り越え伸長し、DNA ポリメラーゼ η はコントロールと同じ効率で乗り越え伸長した。しかし、DNA ポリメラーゼ δ や ε、ζ は乗り越えずに伸長反応を停止した。このことから、Ua は DNA ポリメラーゼによる伸長反応を停止する DNA 損傷であり、DNA ポリメラーゼ η

で停止を回避することができることを明らかにした。

第2章では第3章で述べる新規 DNA 損傷についての解析を効率的に行うため、前駆体である Iz の収率を改善するため青色 LED 光源を用いた解析を行った。これまではトランスイルミネーター(照射強度: 6.5 mW/cm^2)を用いて Iz の生成を行っていたが、Iz の最大生成率(30%)になるのが 60 分と時間がかかっていた。そこで、450 nm の青色 LED 光源を用いた Iz の生成を解析したところ、照射強度 27.5 mW/cm^2 と 68.8 mW/cm^2 、照射時間 2 分にて 35%という Iz の最高収率が得られた。しかし、照射強度が高くなると Iz の収率が下がることも明らかにした。そこで、照射強度を弱めた状態で照射時間における Iz の収率を解析することで適切な照射強度と照射時間を検討することにした。その結果、450 nm の LED 光源で照射強度 27.5 mW/cm^2 で 2 分照射した時が Iz を短時間で効率的に生成できる条件だと明らかにした。

第3章では新規 DNA 損傷についての解析を行った。高温条件下における Oz の熱分解を解析していたところ、Oz とは異なる生成物を見出した。この生成物が過去に報告された DNA 損傷とは異なる分子量であることを明らかにした。質量解析と ms/ms 解析の結果から生成物が新規 DNA 損傷であることを明らかにした。この新規 DNA 損傷は pH 条件によって生成率が変化し、pH 7-9 では新規 DNA 損傷の生成率は 30%を超え、pH 4-6 と pH 10 では 30%以下となる結果となった。

次に DNA ポリメラーゼを用いた塩基取り込みおよび損傷乗越えについての解析を行ったところ、新規 DNA 損傷の相補鎖側に対して主にグアニンが共通して取り込まれることが判明した。そして、損傷乗り越えでは損傷乗り越え DNA ポリメラーゼである DNA ポリメラーゼ η や ζ だけでなく複製中心の DNA ポリメラーゼ α や δ 、 ε でも新規 DNA 損傷を乗り越えた。このことから新規 DNA 損傷が DNA 複製において G:C→C:G transversion を引き起こしうる DNA 損傷の可能性が示唆される。

そこで、2 本鎖 DNA における新規 DNA 損傷:G の熱的安定性を解析したところ、新規 DNA 損傷と 4 つの塩基では新規 DNA 損傷:G の T_m 値が高かったが、天然の C:G 塩基対とそのミスマッチ(C:C、C:A、C:T)における T_m 値の差ほど優位な差はなかった。このことから標準的な B 型 2 本鎖 DNA において新規 DNA 損傷:G の組み合わせは安定性にそれほど寄与していないと考えられる。一方、DNA ポリメラーゼはグアニンを優先的に挿入したことから、複製時の特殊な構造が新規 DNA 損傷:G の安定化に繋がり、グアニンが優位に取り込まれたのかもしれないと考えている。

新規 DNA 損傷:G の特異的な安定性が 2 本鎖では見られなかったが、DNA ポリメラ

一ゼによる複製において、共通して新規 DNA 損傷に対してグアニンを優先的に挿入することは間違いない。そこで新規 DNA 損傷が修復される DNA 損傷なのか明らかにする必要がある。まずは、DNA 損傷の発見に用いられるホットピペリジン処理によって新規 DNA 損傷が切断されるのか解析した。その結果、ピペリジンに対して新規 DNA 損傷は、8oxoG と同程度に安定であることを明らかにした。

新規 DNA 損傷がピペリジンに対して安定であることから、似た切断メカニズムを持つ修復酵素に対しても安定である可能性がある。そこで Fpg や Nei、Nth を用いて新規 DNA 損傷に対する切断反応を解析した。Nei や Nth では新規 DNA 損傷に対する選択性は見られず、新規 DNA 損傷の除去に関わっていない可能性がある。しかし、Fpg は新規 DNA 損傷と 4 つの塩基の組み合わせの中で新規 DNA 損傷:C のみを選択的に、かつ高い切断活性を示した。このことから Fpg は G:C から新規 DNA 損傷:C が生成した時に速やかに新規 DNA 損傷を除去する役割を有している可能性が示唆される。

以上の結果から、生体内の条件に近い pH で生成する新規 DNA 損傷は DNA ポリメラーゼによる伸長反応をあまり阻害しない DNA 損傷であり、DNA ポリメラーゼの結果だけで判断すると主に G:C→C:G transversion を起こしうる突然変異性が高い損傷である可能性が示唆される。そして Fpg は新規 DNA 損傷 が発生した直後の 新規 DNA 損傷:C 塩基対の状態修復を行ない、遺伝子の変異が固定化されるのを防いでいるものと考えられ、Fpg は 8oxoG よりも新規 DNA 損傷をターゲットとした修復酵素である可能性が非常に高い。一方で、Nei は Oz と変わらない低い切断活性であったことから新規 DNA 損傷の修復には関与しておらず、Nth では Oz よりも切断活性が高いが、正確な修復には関わらないと考えられる。

最後に第 1 章から第 3 章までで得られた知見をまとめることで、本論文の総括とした。

論文審査結果の要旨

本論文では、新規の損傷塩基（酸化損傷塩基の分解物）Oxamic acid (Oxm) の発見と、Oxm を含む低分子量損傷塩基の遺伝子複製への影響、及び、修復酵素の応答性について研究が行われている。本研究により、塩基損傷とそれに関わる生物学的イベントの包括的な *in vitro* における検証がなされている。

第1章では、酸化損傷塩基の分解物（以下、低分子量損傷塩基）のうち、塩基部が Urea (Ua) となったものについて、複製過程における影響を調べている (Ua に対する取り込み塩基の検証)。この中で、DNA ポリメラーゼによる塩基取り込み、および、損傷乗り越えについて解析している。その結果、Ua の相補鎖側に対し、DNA ポリメラーゼ α や δ 、 ζ ではアデニンが優位に、DNA ポリメラーゼ η は4つすべて塩基が取り込まれた。このように、Ua に対する複製反応において、DNA ポリメラーゼごとにどのような応答性を示すかを明らかにしている。その結果、低分子量損傷塩基の複製系への影響を、*in vitro* の実験で示している。それと同時に、低分子量損傷塩基の複製系への影響を調べるための *in vitro* の手法を確立している。本研究内容は、論文 (Taishu Kawada et al. *Genes Environ.* 2022 15 44(1) 7.) にまとめられている。

第2章では、低分子量損傷塩基である Oxm の効率的なサンプル調製を目指して、その前駆体である imidazolone (Iz) を多く生成する条件を検討している。本実験系では、これまでのトランスイルミネーターやモノクロメーターに比べ光強度が高い LED 光源を用いることで、Iz の生成効率を上昇させることに成功している。本研究内容は、論文 (Taishu Kawada et al. *Reactions* 2023, 4, 801–810.) にまとめられている。

第3章では、Oxm について包括的な研究がなされている。まずはじめに、前駆体 oxazolone (Oz) から生成する Oxm の生成条件について検討し、その化学構造を質量分析により決定している。また、これらの研究に基づいて Oxm を含む DNA サンプルを調製している。次に本サンプルをもちいて、Oxm を含む DNA 鎖が鋳型鎖となる場合の複製反応を、各種 DNA ポリメラーゼを用いて検証している (Oxm に対する取り込み塩基の検証)。その結果、DNA ポリメラーゼ α 、 δ 、 ε 、 η 、 ζ を用いた塩基取り込みでは共通して Oxm に対しグアニンが優先的に取り込まれることを明らかにしている。さらに、損傷乗り越え反応では DNA ポリメラーゼ η と ζ は天然塩基と同程度に損傷を乗り越え、DNA ポリメラーゼ α 、 δ 、 ε は天然塩基に比べ損

傷乗り越え効率が低いことを明らかにしている。これらの事実に基づいて、Oxm が遺伝子上に生じた場合は、遺伝子の点変異として G:C→C:G transversion の発生に繋がる可能性があることを示している。Oxm については、さらに修復系に対する応答性についても調べられている。具体的には、endonucleaseVIII (Nei)、endonucleaseIII (Nth)、formamidopyrimidine-DNA glycosylase (Fpg) が、Oxm に対してどのような応答性を示すかを詳細に検討している。この中で、Nei、Nth については、二重らせん DNA 中における Oxm の対合塩基が A/G/C/T のいずれであっても Oxm の塩基除去反応が起きていることを明らかにしている。一方、Fpg については、Oxm:C 塩基対中の Oxm を選択的に除去していることを見出している。もともと Fpg は、8-oxoguanine (8oxoG) の修復酵素として知られていたが、8oxoG の対合塩基が C/G/T のいずれであっても 8oxoG 塩基除去反応が起きてしまうことを明らかにしている。ここで 8oxoG:C 塩基対以外の塩基対で 8oxoG を除去すると点変異が固定化される方に働くため、Fpg の活性は 8oxoG の修復には適しておらず、むしろ Oxm の修復に適した酵素であることを示している。この事実から、天然では Fpg が Oxm の修復酵素として働いている可能性を指摘している。

以上のように、本論文では、新規の低分子量損傷塩基である Oxm を発見し、その Oxm が複製系及び修復系に及ぼす影響を詳細に明らかにした研究である。修復系における酵素 (Fpg) の天然の基質に対する示唆も含む重要な研究成果であり、業績としても充分である。したがって、本論文は博士（薬学）の学位に値するものと認める。

論文審査委員	主査（教授）	田中	好幸
	副査（准教授）	富永	昌英
	副査（准教授）	桐山	賀充
	副査（外部）	杉山	弘

氏名	あさ い はるか 浅井 遥	
本籍	愛知県	
学位の種類	博士（薬学）	
学位記番号	乙第 51 号	
学位授与年月日	令和 6 年 9 月 19 日	
学位授与の要件	学位規定第 4 条第 2 項該当（論文博士）	
学位授与の題目	マスト細胞の細胞内情報伝達系を標的とした化合物による 抗アレルギー機構の解明	
論文審査委員	（主査）教授	井上 正久
	（副査）教授	喜多 紗斗美
	（副査）教授	野路 征昭
	（副査）外部	坂梨 まゆ子（金城学院大学 薬学部）

マスト細胞は主に I 型アレルギーの中心となる細胞であり、抗原と抗原特異的 immunoglobulin E(IgE)の結合によって起こる high-affinity IgE receptor I(FcεRI)の架橋を発端として活性化する。活性化したマスト細胞から遊離するヒスタミンなどのメディエーターによって、種々のアレルギー症状が引き起こされる。そのため、I型アレルギーの治療には、各種メディエーターの受容体遮断薬やメディエーター遊離抑制薬が用いられてきた。中でも、ヒスタミン H₁ 受容体遮断作用を持つ薬剤が最も用いられるが、眠気などの副作用が依然として問題となる。また、既存の抗アレルギー薬で効果不十分な患者への新規機序の抗アレルギー薬として、IgE を標的とする抗体製剤や細胞内情報伝達を担うタンパク質を標的とする低分子化合物の分子標的薬の開発が進んでいる。特に、低分子化合物は抗体製剤と比べ安価であるが、サイトカイン受容体の細胞内情報伝達を担う Janus kinase を標的とする薬剤しか承認されていない。そこで著者は、アレルギー治療薬の候補となる低分子化合物の解析を行うことで、抗原によって活性化したマスト細胞の細胞内情報伝達の中で、アレルギー治療に有効な標的となりうるタンパク質を見出した。

化合物の探索を行うにあたり、候補化合物の抗原によって活性化したマスト細胞からのヒスタミン遊離に及ぼす影響を検討すべく、簡便かつ多量に培養できる IL-3 依存性骨髓由来マスト細胞 (BMMC) を用いた。しかし、BMMCs は他の方法で得るマスト細胞と比べてヒスタミン含有量が低く、一般的なヒスタミン定量法では感度不足となることもある。加えて、従来の定量法ではマスト細胞に含まれるヒスチジンを分離するための煩雑な前処理が必要である。そこで第一章では、より高感度かつヒスチジンの分離操作を必要としない didansyl histamine (DDH) を用いたヒスタミン定量法 (DDH 法) を抗原によって活性化した BMMCs からのヒスタミン遊離率の測定に最適化した。

まず、DDH 法で行うヒスタミンのダンシル誘導体化法が、ヒスチジンの共

存に関わらずヒスタミンを DDH に合成できることを明らかにした。次に、DDH 法が BMMCs からの微量の自発的なヒスタミン遊離と抗原によって活性化した BMMCs からの多量のヒスタミン遊離どちらも測定可能であることを明らかにした。また、このヒスタミン遊離の変化は脱顆粒の変化と同様であり、DDH 法は BMMCs からの脱顆粒に伴うヒスタミン遊離を測定できる方法であると考えられた。さらに、DDH 法の感度は一般的に用いられる *o*-phthalaldehyde 誘導体化ヒスタミンを用いた定量法よりも高感度であることを明らかにした。したがって、DDH 法はヒスチジンの前処理を必要とせず、抗原によって活性化した BMMCs からのヒスタミン遊離を高感度に測定可能な方法であると考えられた。以降の実験では、DDH 法を用いて抗原によって活性化した BMMCs からのヒスタミン遊離に及ぼす影響を検討した。

第二章では、マスト細胞の細胞内情報伝達系を標的とした抗アレルギー薬の候補化合物として、様々な生理活性が報告されるビベンジル化合物の一つである perrottetin D (PerD) が抗原によって活性化したマスト細胞からのメディエーター遊離に及ぼす影響と標的となるタンパク質を検討した。

毒性を示さない濃度の PerD は、FcεRI と IgE の結合量に影響せずに、BMMCs の細胞内情報伝達を担うタンパク質の spleen tyrosine kinase (Syk) のリン酸化を抑制すること、そして脱顆粒に伴うヒスタミン遊離を抑制することが明らかとなった。また、PerD は Syk のリン酸化につながる src family kinase のうち、Fyn を阻害すると推定された。したがって、PerD は Fyn の阻害によって、BMMCs の細胞内情報伝達を担う Syk のリン酸化を抑制することで、脱顆粒に伴うヒスタミン遊離を部分的に抑制すると考えられた。一方で、抗原によって活性化した BMMCs からの IL-4 や LTB₄ の遊離を PerD は抑制しなかった。IL-4 や LTB₄ もヒスタミンと同様にアレルギー症状を引き起こすメディエーターであり、これらのメディエーター遊離を一様に抑制する化合物の探索が必要であると考えられた。

そこで第三章では、抗アレルギー・抗炎症作用を目的に用いられてきた薬用植物の成分である kamebakaurin (KA) について抗原によって活性化したマス

ト細胞からのメディエーター遊離に及ぼす影響と標的となるタンパク質を検討した。

毒性を示さない濃度の KA は、抗原によって活性化した BMMC のからの脱顆粒に伴うヒスタミン遊離だけでなく、IL-4、LTB₄ および Cys-LTs の遊離を抑制した。また、KA は FcεRI と IgE の結合量や IgE と抗原の結合に影響せず、BMMC の細胞内情報伝達を担う Syk のリン酸化の抑制だけでなく、Syk の下流に存在するタンパク質のリン酸化も抑制した。また、KA は Syk 自身に結合することで、Syk の自己リン酸化を阻害すると推定された。以上の結果から、KA は Syk に結合することで、抗原によって活性化するマスト細胞の Syk 自身を含む細胞内情報伝達を抑制し、メディエーター遊離を抑制すると推定された。さらに、KA は抗原感作マウスに抗原を添加することで惹起される抗原抗体反応を抑制し、KA は抗アレルギー活性を示すことが明らかとなった。一方で、KA はヒスタミン投与によって惹起される血管透過性の亢進を抑制しなかったことから、KA はヒスタミン H₁ 受容体を遮断しないことも明らかとなった。したがって、KA はヒスタミン H₁ 受容体を遮断することなく、マスト細胞のメディエーター遊離を抑制することで、抗原抗体反応を抑制し、抗アレルギー活性を示すことが明らかとなった。

以上本研究では、化合物の抗アレルギー活性を検討するにあたり必要不可欠なマスト細胞から遊離したヒスタミンの定量に、高感度かつ煩雑な前処理を必要としない DDH 法を最適化した。最適化によってマスト細胞以外の生体内の微量なヒスタミンの定量も可能とし、この結果は、アレルギー研究の活性化に寄与するものであると考えられた。

また、検討した PerD と KA はどちらも抗原によって活性化するマスト細胞の Syk のリン酸化を抑制するとともに、脱顆粒に伴うヒスタミン遊離を抑制した。これらの結果は、少なくとも、脱顆粒に伴うヒスタミン遊離を抑制するための標的は Syk のリン酸化であることを示しており、アレルギー治療に有効なマスト細胞の細胞内情報伝達系の標的は Syk のリン酸化であると考えられた。

さらに、KA は Syk 自身とその下流の細胞内情報伝達の抑制により、マスト細胞からのメディエーター遊離を抑制することで、抗アレルギー作用を示した。加えて、KA はヒスタミン H₁ 受容体遮断しなかった。これらの結果から、KA がマスト細胞の細胞内情報伝達系を標的とし、ヒスタミン H₁ 受容体遮断による副作用を示す可能性の低い分子標的薬の有力な候補であることを示した。

論文審査結果の要旨

本論文は、三つの章で構成され、天然物より抽出された化合物による抗アレルギー機構の解明を行った研究について論じている。

I 型アレルギー治療薬として、抗原抗体反応によって活性化したマスト細胞から遊離するメディエーターを阻害する薬剤が多く開発されてきた。しかし、副作用が依然として問題となるうえ、効果不十分な患者も存在する。そのため、抗アレルギー活性をもつ分子標的薬の開発が進んでおり、中でも安価で投与経路も豊富な細胞内情報伝達系を標的とする低分子化合物が注目されている。そこで著者は、天然物より抽出された化合物の抗アレルギー機構を明らかにし、抗原抗体反応によって活性化したマスト細胞の細胞内情報伝達の中で、アレルギーの治療に有効な標的となるタンパク質を見出した。

本研究を行うにあたり、抗原抗体反応により活性化したマスト細胞から遊離するヒスタミンを定量する必要があるが、一般的に用いられる手法では、煩雑な前処理が必要となるうえ、感度が不十分な場合もある。第一章では、*didansyl histamine* を用いた手法 (DDH 法) を用いることで、骨髓由来マスト細胞 (BMMC) から遊離する微量のヒスタミンを、煩雑な前処理なく高感度に定量できることを示している。DDH 法は、BMMCs に含まれ、ヒスタミンの定量に問題となるヒスチジンが共存する場合でも、培養液中のヒスタミンを定量できることを明らかにしている。また、DDH 法は、一般的に用いられる *o*-phthalaldehyde 誘導体化ヒスタミンを用いた手法よりも高感度であり、BMMCs から遊離する微量なヒスタミンも測定できることが明らかにしている。これにより、以降の章で行っている、抗原抗体反応による BMMCs からのヒスタミン遊離に対する化合物の影響を容易に検討可能としている。

続いて、第二章では、様々な生理活性が報告されるビベンジル化合物の一つである *perrottetin D* (PerD) の抗原抗体反応によるマスト細胞からの脱顆粒に伴うヒスタミンの遊離を抑制する機構を明らかにしている。さらに、第三章では、抗アレルギー・抗炎症作用を示す薬用植物の成分である *kamebakaurin* (KA) が抗原抗体反応によるマスト細胞からのメディエーター遊離を抑制する機構を明らかにしている。この PerD および KA の抑制機構の解明により、細胞内情報伝達を担うタンパク質の *spleen tyrosine kinase* (Syk) のリン酸化が、抗原抗体反応によるマスト細胞の脱顆粒に伴うヒスタミンの遊離に重要であることが明らかとなっている。さらに、第三章で検討した KA はヒスタミン H₁ 受容体を遮断せずに、マスト細胞からのメディエーター遊離を抑制することで抗アレルギー活性を示すことを明らかにしている。この結果は、KA がマスト細胞の細胞内情報伝達系を標的とする抗アレルギー薬の有力な候補であることを示している。

以上、これらの研究結果は、抗原抗体反応によるマスト細胞からのヒスタミン遊離に対する化合物の影響を検討するのに有用な定量法を示している。それだけでなく、既存薬で問題となる副作用を示す可能性が低く、今まで開発されていないマスト細胞の細胞内情報伝達系を抑制する抗アレルギー薬となりうる化合物を明らかにしている。本研究で得られた結果は、安価で投与経路も豊富な新しい抗アレルギー薬の開発に貢献できる。また、筆頭著者として査読付きの学術論文 3 報を既に発表しており、業績としても十分である。したがって、本論文は博士（薬学）の学位に値するものと認める。

論文審査委員	主査（教授）	井上 正久
	副査（教授）	喜多 紗斗美
	副査（教授）	野路 征昭
	副査（外部）	坂梨 まゆ子

博士学位論文 内容の要旨および審査の結果の要旨(第48号)

令和6年11月 発行

編集・発行

徳島文理大学大学院薬学研究科
徳島市山城町西浜傍示180
〒770-8514 TEL 088-602-8210

印刷

原田印刷株式会社
徳島市西大工町4丁目5
〒770-0903 TEL 088-622-2356
FAX 088-622-2357
E-mail : haradapp@khf.biglobe.ne.jp