

多摩川河口域に飛来する野鳥の保護に向けた 寄生虫感染状況の調査

2018年

彦坂 健児

千葉大学大学院 医学研究院 感染生体防御学

共同研究者

野呂瀬 一美

千葉大学・准教授

李 可歆

千葉大学・大学院生

馮 雪

千葉大学・大学院生

篠田 渉平

千葉大学・大学院生

田中 咲帆

千葉大学・研修生

LiLi

千葉大学・研究生

1. 緒言

1.1. 多摩川河口周辺の生態系

多摩川河口には自然が残っていないと多くの市民が考えているのではないだろうか。多摩川は山梨県、東京都、神奈川県を流れる多摩川水系の本流で、全長 138 km、流域面積 124 km² の一級河川である。首都圏に位置する多摩川は、高度経済成長期を通して植物の伐採と水質汚染が進み、環境が劣悪化した。しかし、その後、多摩川流域の環境改善・保全運動が盛んになり、本来の水環境や生物種が戻り始めている。実際、エビやカニなどの甲殻類、魚類¹⁾や河川に生息する植物²⁾の生態調査では生物の多様性が確認されている。そして、これら多摩川河口域の植物や動物の多様性が河口域の浄化に役立っており、生態系のバランスを維持していることが示されている。また、多摩川河口域は野鳥にとっても重要な湿地である。水鳥の生息地として国際的に重要な湿地に関する条約（ラムサール条約）に定められた個体数 1%を超える種が生息し、さらに、年間 20,000 羽以上の水鳥が飛来する条件を満たしている³⁾。以上の背景より、多摩川河口域は、野鳥観察愛好家の観察地・探索地として国内で重要な位置付けとなっているのみならず、国際的な野鳥保護の観点からも貴重な湿地と言える。

1.2. 野鳥の寄生虫感染

野鳥には様々な寄生虫の感染が報告されている。蠕虫類では回虫や吸虫、原虫類では住肉胞子虫、トキソプラズマ、トリコモナス、トリマラリア原虫、ジアルジア、クリプトスポリジウム、コクシジウムといった寄生虫感染の報告がある^{5,6)}。中でもコクシジウム(主に *Eimeria* 及び *Isospora* 属原虫)の寄生虫感染例が多く、死亡個体からの検出例も少なくない⁵⁾。

コクシジウムとは、アピコンプレクサ生物群のコクシジウム目に分類される原生生物の一群である。コクシジウムはトリやウサギ、モモンガなどによく感染しており、宿主特異性が高いため、一般的に特定の種のコクシジウムが特定の宿主以外の動物に

感染することは稀であると言われている。感染経路は、感染個体が排出する糞便を摂取することによって感染する経口感染である。トリコキシジウム症の症状としては、食欲不振や下痢、発熱、血便であり、最悪の場合、死に至ることもある。幼鳥や病弱時では、致命的な症状を引き起こすことも多く、下痢が始まってから半日で死に至ることもある。また、糞便中に排出される発育ステージであるオーシストは消毒液に対して非常に強い耐性をもつため、その防除は難しいとされている。

2. 目的

野鳥には様々な寄生虫の感染例が多く報告されている。なかでもコクシジウム症（主に *Eimeria* および *Isospora* 属原虫によって引き起こされる感染症）は、感染個体糞便の経口摂取によって感染が拡大し、著しい数の野鳥が死に至ることが知られていることから、野鳥保護の観点から重要な疾病と考えられる。多摩川の河口付近の干潟に飛来する野鳥は年間 20,000 羽を超え、その種も多様である。また、この中には絶滅・準絶滅危惧種に指定されている鳥類も多く含まれる。これまでに本干潟における野鳥の個体数の推移が調査され、生息数の減少が観察される野鳥種の存在が報告されている³⁾。そこで本研究では、多摩川河口域に生息する野鳥の糞便試料を用いて寄生虫保有率を調査し、寄生虫感染と野鳥数の増減の関係性を解明するための基盤情報を得ることを目的とした。

3. 材料と方法

3.1. 野鳥糞便試料の採取

2016年11月から2018年1月にかけて計7回の野鳥糞便の採取を行った。調査は、神奈川県川崎市の殿町第2公園から多摩運河にかけて広がる多摩川河口の干潟および河辺で実施した（図1-A）。調査地の風景を図1-B、C、D、Eに示す。野鳥糞便は、落下しているものを100 μ lの生理食塩水の入った1.5 mlチューブに回収した。採取

後の糞便試料は実験に供するまで 4°C で保存した。

3.2. ショ糖浮遊法による野鳥糞便試料の検査

4°C で保存されている糞便試料を半量ずつに分けた。半量の試料を糞便検査に供し、残りの試料は DNA の抽出を行うまで 4°C で保存した。糞便検査用試料は、4°C、8000 rpm で 5 分間遠心分離後、上清を除去した。遠心後の沈渣試料に比重 1.2 のショ糖溶液を加え懸濁後、試験管に懸濁液を移し、再び比重 1.2 のショ糖溶液を用いて試験管を満たした。懸濁液の入った試験管を室温で 1 時間静置後、液表面をカバーグラスで採取し検鏡した (図 2)。

3.3. DNA の抽出

上述した 3.2 で得られた半量の糞便試料より DNA を抽出した。DNA 抽出は、QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (QIAGEN 社、Hilden, Germany) の手順に従って行った。抽出した DNA は使用するまで -80°C で保存した。

3.4. ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)

PCR は nested-PCR 法を用い、ミトコンドリアゲノムにコードされているシトクロム *c* 酸化酵素サブユニット I 遺伝子 (*cox1*) を標的としたプライマーを用いた^{7,8)}。用いたプライマーの *cox1* 上の位置関係の概略を図 3 に、塩基配列を表 1 にそれぞれ示す。1 回目および 2 回目の PCR は、それぞれ AWCF1-AWCR6 および AWCF1-AWCintR6 のプライマーの組み合わせで行った。DNA 断片の増幅には、AmpliTaq®360 DNA ポリメラーゼ (ABI 3730XL ; Thermo Fisher Scientific 社、Waltham, MA, USA) を用いた。PCR 溶液の組成を次に示す。反応液 20 μl 中 : 10×AmpliTaq®360 バッファー、2 μl ; DNA ポリメラーゼ、0.5 Units ; MgCl₂、4.0 mM (最終濃度) ; dNTPs mix、200 μM each (最終濃度) ; プライマー (AWCF1)、

0.25 μ M (最終濃度) ; プライマー (AWCR6)、0.25 μ M (最終濃度) ; ウシ血清アルブミン (BSA)、1 mg/ml (最終濃度) ; DNA 溶液、2 μ l ; 精製水を用いて 20 μ l に調整した。PCR 条件は、95 $^{\circ}$ C 10 分を 1 サイクル、95 $^{\circ}$ C 30 秒、45 $^{\circ}$ C 30 秒、72 $^{\circ}$ C 90 秒を 5 サイクル、95 $^{\circ}$ C 30 秒、51 $^{\circ}$ C 30 秒、72 $^{\circ}$ C 90 秒を 30 サイクル、72 $^{\circ}$ C 7 分を 1 サイクルで行った。2 回目の PCR は、1 回目の PCR 後の反応液を精製水で 5 倍希釈し、鋳型 DNA として用いた。PCR 溶液の組成を次に示す。反応液 20 μ l 中 : 10 \times AmpliTaq[®]360 バッファー、2 μ l ; DNA ポリメラーゼ、0.5 Units ; MgCl₂、4.0 mM (最終濃度) ; dNTPs mix、200 μ M each (最終濃度) ; プライマー (AWCF1)、0.25 μ M (最終濃度) ; プライマー (AWCR6)、0.25 μ M (最終濃度) ; DNA 溶液、2 μ l ; 精製水を用いて 20 μ l に調整。PCR 条件は、95 $^{\circ}$ C 10 分を 1 サイクル、95 $^{\circ}$ C 30 秒、55 $^{\circ}$ C 30 秒、72 $^{\circ}$ C 1 分を 10 サイクル、95 $^{\circ}$ C 30 秒、50 $^{\circ}$ C 30 秒、72 $^{\circ}$ C 1 分を 30 サイクル、72 $^{\circ}$ C 7 分を 1 サイクルで行った。PCR 産物は電気泳動により増幅の有無を確認した。1 回目および 2 回目の PCR 電気泳動の結果例を、それぞれ図 4-A および図 4-B に示す。

上述した方法で PCR 産物が確認されなかった DNA 試料については (図 4-B、レーン 1-5 など)、DNA 濃度が低いことが考えられたため、Ethachinmate (ニッポン・ジーン社、富山) を用いて DNA の 5 倍濃縮を行い PCR に供した。さらに PCR 産物が得られなかった DNA 試料については、ポリメラーゼを Q5 High-Fidelity DNA polymerase (New England BioLabs 社、Ipswich、MA、USA) に変更し PCR を行った。PCR 溶液の組成を次に示す。25 μ l 中 : 5 \times Q5 Reaction Buffer、5 μ l ; dNTPs mix、200 μ M each (最終濃度) ; プライマー (AWCF1)、0.25 μ M (最終濃度) ; プライマー (AWCR6)、0.25 μ M (最終濃度) ; BSA、400 μ g/ml (最終濃度) ; DNA 溶液、2 μ l ; 精製水を用いて 25 μ l に調整。PCR 条件は、95 $^{\circ}$ C 30 秒を 1 サイクル、98 $^{\circ}$ C 10 秒、55 $^{\circ}$ C 30 秒、72 $^{\circ}$ C 30 秒を 35 サイクル、72 $^{\circ}$ C 2 分を 1 サイクルで行った。PCR 条件の検討の結果、nested PCR で使用した 1 回目の PCR のプライマーの組み

合わせ(AWCF1-AWCintR6)のPCRのみでDNA断片の増幅が確認された(図4-C)。

3.5. PCR産物の塩基配列の決定

野鳥の種を同定するために、トリ *cox1* を標的として得られたPCR産物の塩基配列を決定した。PCR産物の精製はQIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN社)を用い、操作は添付の手順に従った。PCR産物のシーケンス反応は、PCRで使用した5'-3'、3'-5'の両方向のプライマー(AWCF1およびAWCintR6)およびBigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific社)を用いて行った。それぞれのPCR産物の塩基配列はABI 3730XLシーケンサー(Thermo Fisher Scientific社)を用いて決定した。最終的なPCR産物の塩基配列は、ここで得られた逆方向の2つの塩基配列を解析ソフトMEGA (Version7.0.21)⁹⁾のアライメントツール(ClustalW)¹⁰⁾によって合わせ、確定した。

3.6. 塩基配列による鳥類種の推定

上述した3.5で確定した塩基配列を用いてBLAST検索¹¹⁾を行い、塩基配列の一致率の高い鳥類種を検索した。

4. 結果

4.1. 採取試料

多摩川河口域で調査期間中に得ることのできた野鳥の糞便試料は401検体であった(表2)。採取地の特性を湿地と乾燥地に分けたところ、湿地より採取できた試料は287検体、乾燥地より採取できた試料は106検体、その他8検体となった。

4.2. 寄生虫の検出

採取できた401検体の糞便検査を行ったところ、38検体(9.5%)から原虫オーシ

ストが、13 検体 (3.2%) から蠕虫卵が検出された (表 2 および図 5)。原虫オーシストはオーシスト中のスポロシストの数で種のカテゴリがなされるが、未成熟なオーシストが多かったため分類は困難であった。また、野鳥の蠕虫感染については未解明な部分が多く、今回検出された蠕虫卵についての形態学的な分類は行なっていない。湿地および乾燥地で比較したところ、原虫オーシストの検出率はそれぞれ 12.2% および 2.8%、蠕虫卵の検出率はそれぞれ 4.2% および 0.9% と、湿地の方が寄生虫の検出率が高い傾向がみられた (表 2)。

4.3. 糞便試料より抽出した DNA による鳥類種の推定

今回採取できた糞便試料 401 検体のうち 221 検体で PCR 産物の塩基配列の決定が可能であった。決定された塩基配列を用いて BLAST 検索を行ったところ、それぞれの塩基配列の一致率は 97%~100% であった。221 検体のうち、推定された鳥類種はアメリカタヒバリ (*Anthus rubecens*) 82 検体、キジバト (*Streptopelia orientalis*) 43 検体、タイリクハクセキレイ (*Motacilla alba*) 38 検体、イソシギ (*Actitis hypoleucos*) 15 検体、コサギ (*Egretta garzetta*) 12 検体、ユリカモメ (*Chroicocephalus ridibundus*) 12 検体、ヒバリ (*Alanda arvensis*) 4 検体、ツグミ (*Turdus naumanni*) 3 検体、ホクオウハクセキレイ (*Motacilla yarrelli*) 3 検体、ムクドリ (*Sturnus cineraceus*) 2 検体、スズメ (*Passer montanus*) 2 検体、マキバタヒバリ (*Anthus pratensis*) 2 検体、セッカ (*Cisticola juncidis*) 1 検体、ヒヨドリ (*Microscelis amanrotis*) 1 検体、カモメ (*Larus canus*) 1 検体であった (表 3)。このうち、原虫オーシストが検出された糞便試料は 18 検体で、その内訳はアメリカタヒバリ 11 検体、タイリクハクセキレイ 3 検体、キジバト 2 検体、コサギ 1 検体、スズメ 1 検体であった。一方、蠕虫卵が検出されていたのは 6 検体で、タイリクハクセキレイ 2 検体、イソシギ 2 検体、スズメ 2 検体であった (表 3)。

5. 考察

多摩川の河口域の干潟には絶滅危惧種を含む貴重な野鳥が数多く飛来している。本研究において 401 検体の野鳥糞便試料を検査した結果、原虫オーシストおよび蠕虫卵がそれぞれ 9.5%および 3.2%の検体で検出された。我が国における野生ツルの糞便中原虫オーシストの調査では、多いところで 90%以上、他の場所でも 18%~30%の感染が確認されている¹²⁾。これはツルが群生する性質をもっているためと考えられている。今回の調査で鳥類種が推定できたもののうち、アメリカタヒバリに近縁なトリは群生することが知られており、原虫オーシストが比較的多く検出された要因であることが考えられた。多摩川河口域に生息する鳥類の糞便中の寄生虫調査は本研究が初めてであり、今後の継続的な調査によって鳥類の生態系と寄生虫感染の関係性が明らかになることが期待される。多摩川河口域では今回調査した野鳥の他に、河川の水¹³⁾、貝類¹⁴⁾、甲殻類¹⁵⁾などからヒトに感染性をもつ寄生虫が検出されている。本研究のみでは野鳥に感染している寄生虫がヒトに感染する危険性があるかどうかは判断できないが、湿地より採取した野鳥糞便により多くの寄生虫が検出されたことから干潟や河川が汚染されていることも考えられ、注意が必要である。また、多摩川の河口域では自然豊かな干潟が存在するため潮干狩りなどでヒトが集まる機会も多く、公衆衛生面からみても継続的な寄生虫感染状況のモニタリングが重要である。

今回、野鳥の糞便試料を採取して調査を実施した。しかし、野鳥に感染する寄生虫は糞便のみならず血液中¹⁶⁾や臓器⁵⁾に寄生するものも我が国で報告されている。このため検査対象を拡張した調査も必要と思われる。また、血液中に存在する寄生虫はカやブユなどの媒介節足動物もよく知られているので、これらの生物を調査することも重要であると考えられる。

糞便検査では、乾燥地で採取した糞便試料よりも湿地で採取した試料の方が原虫オーシストおよび蠕虫卵の検出率が高かった。一般的に、オーシストおよび蠕虫卵は乾燥すると感染性が低下することが知られている。感染しているトリが糞便を排泄する

と原虫オーシストおよび蠕虫卵が含まれた糞便になる。その糞便が日光や風により乾燥し、それを未感染なトリが経口摂取しても原虫オーシストおよび蠕虫卵は感染性が低下しているので感染しないことがある。反対に湿った状態が保たれると原虫オーシストおよび蠕虫卵にとって生存環境が良い為、感染力が維持され、それを経口摂取することにより、新たに感染したトリが増えることになる。すなわち、湿地を好むトリに感染率が高くなるサイクルが形成される為、乾燥地よりも湿地で検出率が高いという今回の結果につながったものと考えられた。また、湿潤な環境では寄生虫による環境の汚染が広がりやすいことも示唆された。一方で、乾燥した糞便と水分を含んだ糞便からのシヨ糖浮遊法による検出能の違いについては十分な検討がなされておらず、試料の水分量によって検出率が変化した可能性も否定できないため、今後、詳細な検討が必要であると考えられた。

本研究では、形態学的な観察からは検出された原虫オーシストおよび蠕虫卵の種の同定にまでは至らなかった。本研究で得られた野鳥糞便由来 DNA には、糞便検査において検出された寄生虫の DNA も混在していることが推測される。今後は、これらの DNA を用いて、寄生虫がもつ特異的遺伝子を標的とした PCR を行い、シーケンスにより寄生虫の種の同定を進めていきたいと考えている。

6. 参考文献

- 1) 安田陽一、多摩川におけるエビ・イカ・カニ類の遡上に配慮した魚道の研究、とうきゅう環境財団 学術研究成果リスト、234、2003
- 2) 中村幸人、大和量、島田沢彦、原田敦子、国忠高広、中村菜美、篠塚幸子、多摩川の植生と植生図ー30年間の変化ー、とうきゅう環境財団 学術研究成果リスト、270、2007
- 3) 桑原和幸、高木武、嶋田哲郎、三沢博志、多摩川河口域の鳥類の長期的変遷と保護に関する研究、とうきゅう環境財団 学術研究成果リスト、286、2010

- 4) 吉田幸雄、有菌直樹、図説人体寄生虫学 改訂 9 版、南山堂、東京、2016
- 5) 久保正法、谷村信彦、後藤義之、野鳥の病理、動衛研研究報告、第 111 号 : 9—20、2004
- 6) 平山琢朗、牛山喜偉、長雄一、浅川満彦、最近記録させた日本における野性鳥類の感染症あるいはその病原体概要、Bird Research、10 : V1-V13、2014
- 7) Hebert PDN, Stoeckle MY, Zemplak TS and Francis CM, Identification of birds through DNA barcodes, PLoS Biology, 2 : 1657—1663,2004
- 8) Patel S, Waugh J, Millar CD and Lambert DM, Conserved primers for DNA barcoding historical and modern samples from New Zealand and Antarctic birds, Molecular Ecology Resources, 10 : 431—438, 2010
- 9) Kumar S, Stecher G and Tamura K, MEGA7 ; molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets, Molecular Biology and Evolution : 2870-2874, 2016
- 10) Thompson JD, Higgins DG and Gibson TJ, ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, Nucleic acids research, 22:4673-4680, 1994
- 11) Altschul SF, Gish W, Eugene WM, Myers W and Lipman DJ, Basic local alignment search tool, Journal of Molecular Biology, 215 : 403—410, 1990
- 12) Honma H, Suyama Y, Watanabe Y, Matsumoto F and Nakai Y, Accurate analysis of prevalence of coccidiosis in individually identified wild cranes in inhabiting and migrating populations in Japan, Environmental Microbiology, 13 : 2876—2887, 2011
- 13) 原本英司、多摩川流域における親水活動を介した健康関連微生物の水系感染リスクの評価、とうきゅう環境財団 学術研究成果リスト、299、2012

- 14) 笹原武志、中村健、佐藤義則、青木正人、多摩川水系の貝類からみたクリプトスポリジウム汚染実態と感染防止対策に関する調査・実験研究、とうきゅう環境財団 学術研究成果リスト、252、2005
- 15) 杉山広、森嶋康之、多摩川における生態系多様性の評価；寄生虫を指標とし、地理情報システムを活用した方法の開発、とうきゅう環境財団 学術研究成果リスト、279、2009
- 16) Murata K, Prevalence of blood parasite in Japanese wild birds, *The Journal of Veterinary Medical Science*, 64 : 785–790, 2002

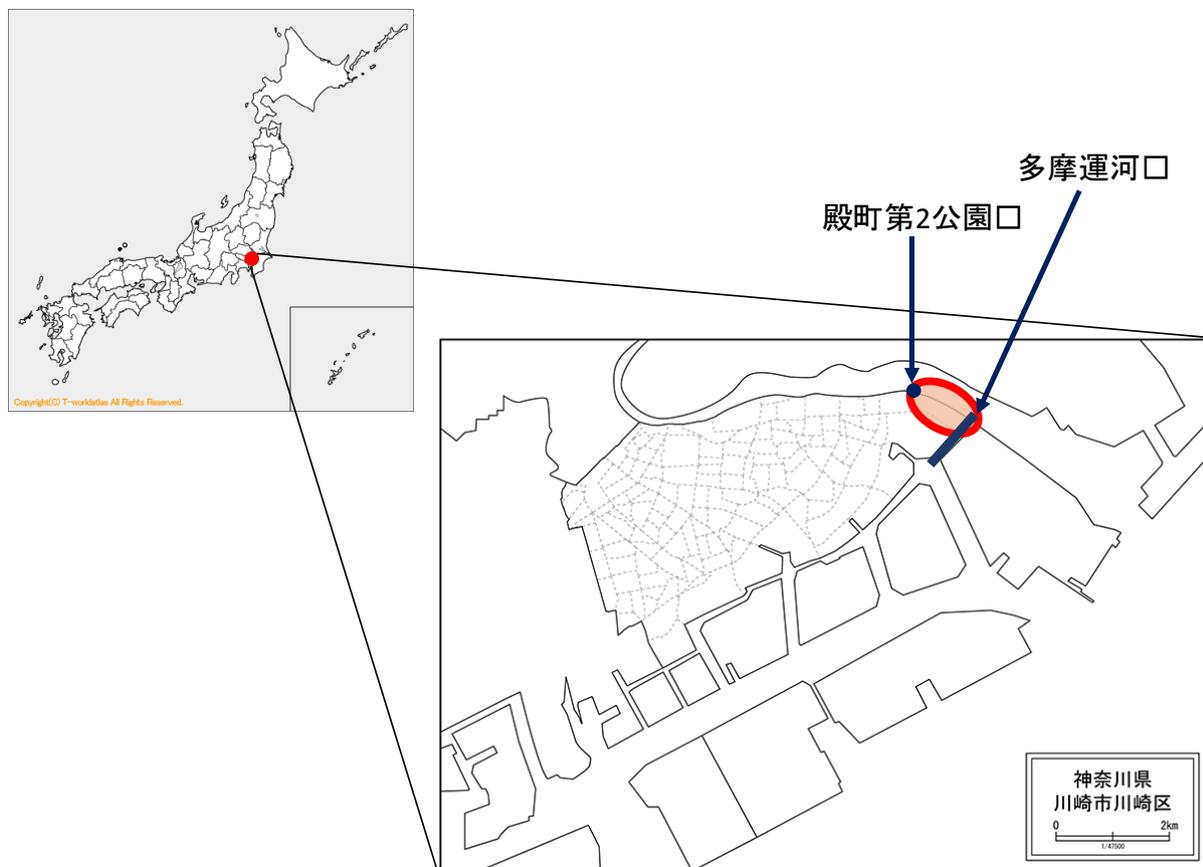


図 1-A. 調査地

多摩川河口付近の殿町第2公園から河口に向かう干潟で野鳥糞便を採取した。右図は拡大図。



図 1-B. 多摩川河口の干潟



図 1-C. 多摩川河口の川辺①



図 1-D. 多摩川河口の川辺②



図 1-E. 多摩川河口川辺と干潟

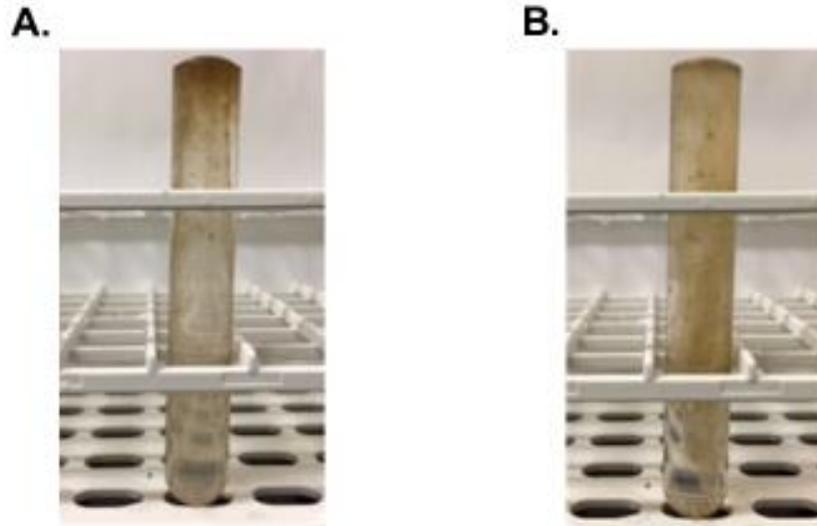


図 2. ショ糖浮遊法

採取した糞便を比重 1.2 のショ糖溶液に懸濁し、1 時間静置後、浮遊箇所を検鏡した。
A.は浮遊前、B.は浮遊後の懸濁液を示す。

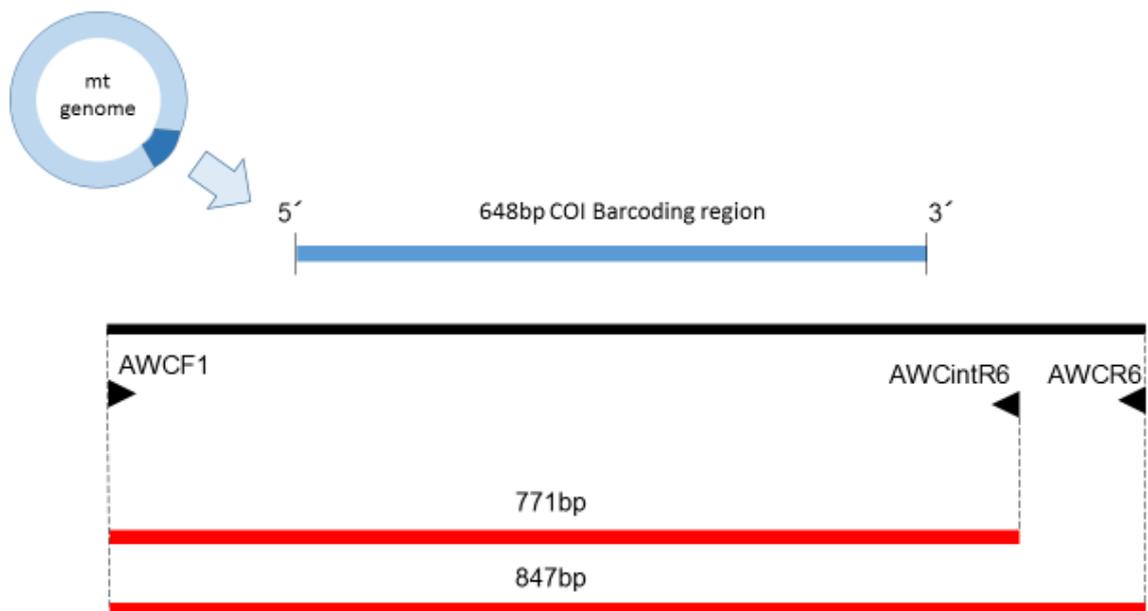


図 3. PCR に使用したプライマー

AWCF1、AWCR6、AWCintR6 のシトクロム *c* 酸化酵素サブユニット I 遺伝子上の位置。それぞれのプライマーの塩基配列は表 1 を参照のこと。黒の矢頭はプライマー、赤線は PCR 産物を示す。mt genome : ミトコンドリアゲノム。

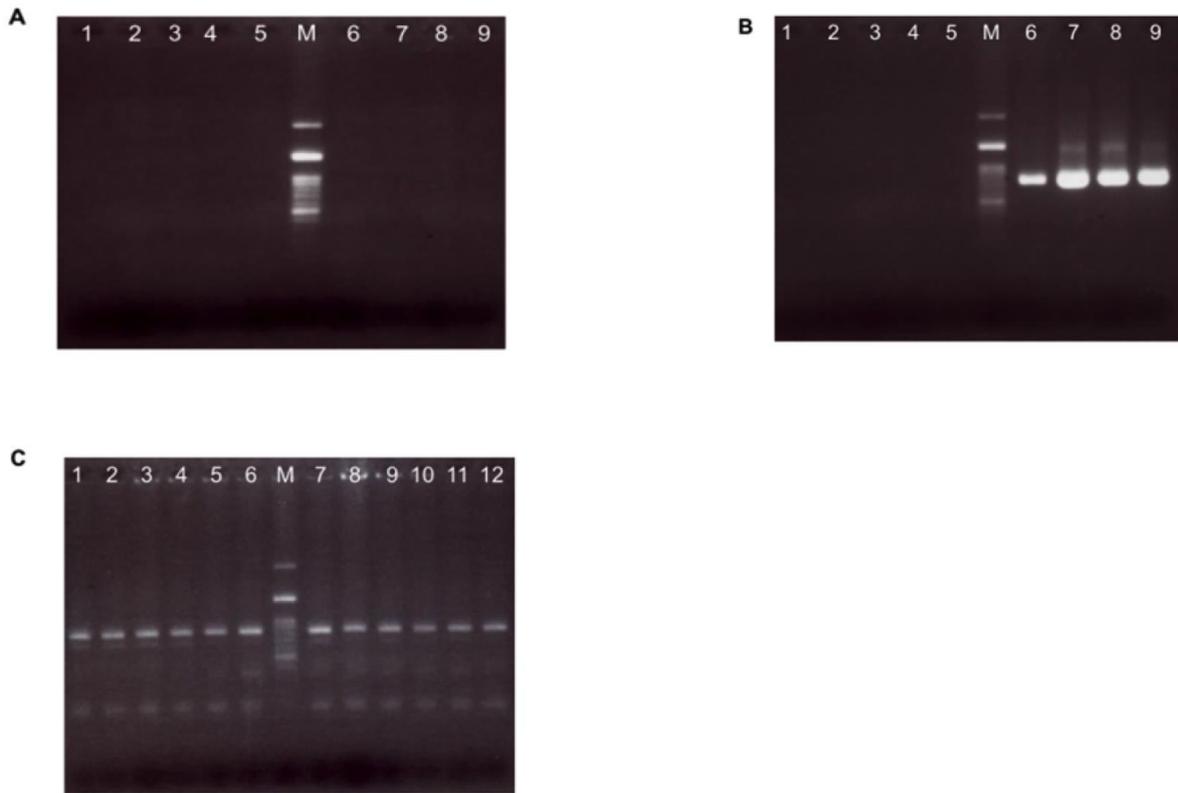


図 4. PCR 産物の電気泳動像

- A. プライマーAWCF1 と AWCR6 を使用した PCR 産物の電気泳動像 (First PCR)。M はサイズマーカー、レーン 1 は陰性コントロール、レーン 2～8 は、サンプル No.60、62、64、65、71、84、86、88 の PCR 産物の泳動結果を示す。
- B. プライマーAWCF1、AWCintR6 を使用した PCR 産物の電気泳動像 (Nested PCR)。各レーンのサンプルは上記 A. と同様のものを泳動。
- C. DNA ポリメラーゼを Q5 High-Fidelity DNA polymerase に変更して行った PCR 産物の電気泳動像。プライマーは AWCF1、AWCR6 を使用した。M はサイズマーカー、レーン 1～12 は、サンプル No. 509、508、511、510、513、514、515、516、518、522、523、525 の PCR 産物の泳動結果を示す。DNA ポリメラーゼを変更することで、PCR 産物が得られた。

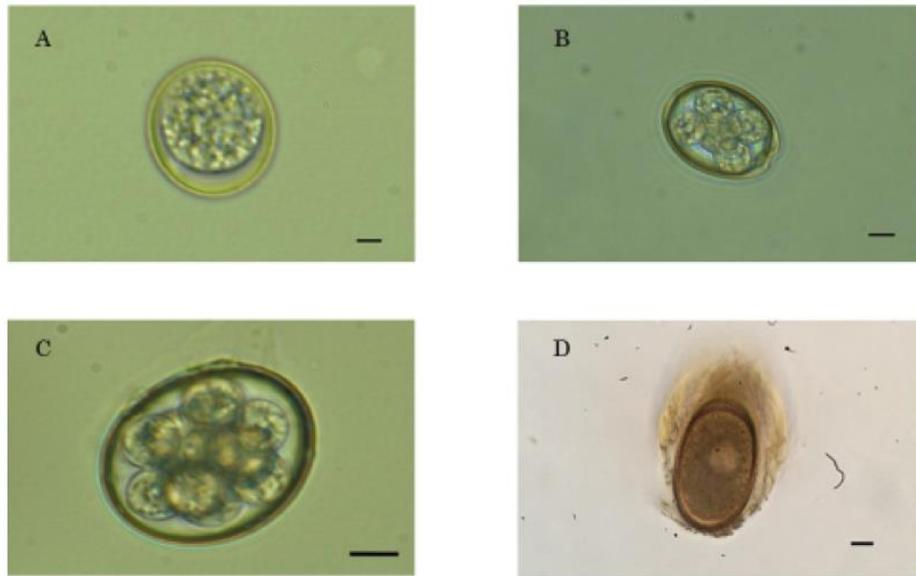


図 5. 検出された原虫オーシストおよび蠕虫卵

バーのサイズはそれぞれ 10 μm を示す。

A. 未成熟原虫オーシスト、B および C は成熟原虫オーシスト、D は蠕虫卵。

表1. 本研究で使用したプライマーの塩基配列

プライマー	塩基配列
AWCF1	5'- CGC YTW AAC AYT CYG CCA TCT TAC C -3'
AWCR6	5'- ATT CCT ATG TAG CCG AAT GGT TCT TT -3'
AWCintR6	5'- GGA TTA GGA TGT AGA CTT CTG GGT G -3'

表2. 野鳥糞便からの寄生虫検出率

調査地	検出数/調査数(検出率%)	
	原虫オーシスト	蠕虫卵
湿地	35/287 (12.2)	12/287 (4.2)
乾燥地	3/106 (2.8)	1/106 (0.9)
その他	0/8 (0)	0/8 (0)
計	38/401 (9.5)	13/401 (3.2)

表3. 推定された鳥類種と寄生虫感染数

種名	和名	水/陸	検体数	寄生虫検出数	
				原虫オーシスト	蠕虫卵
<i>Actitis hypoleucos</i>	イソシギ	水辺・陸	15	0	2
<i>Alanda arvensis</i>	ヒバリ	陸	4	0	0
<i>Anthus pratensis</i>	マキバタヒバリ	陸	2	0	0
<i>Anthus rubecens</i>	アメリカタヒバリ	陸	82	11	0
<i>Chroicocephalus ridibundus</i>	ユリカモメ	海	12	0	0
<i>Cisticola juncidis</i>	セッカ	水辺	1	0	0
<i>Egretta garzetta</i>	コサギ	水辺・陸	12	1	0
<i>Larus canus</i>	カモメ	海	1	0	0
<i>Microscelis amanrotis</i>	ヒヨドリ	陸	1	0	0
<i>Motacilla alba</i>	タイリクハクセキレイ	陸	38	3	2
<i>Motacilla yarrelli</i>	ホクオウハクセキレイ	陸	3	0	0
<i>Passer montanus</i>	スズメ	陸	2	1	2
<i>Streptopelia orientalis</i>	キジバト	陸	43	2	0
<i>Sturnus cineraceus</i>	ムクドリ	陸	2	0	0
<i>Turdus naumanni</i>	ツグミ	陸	3	0	0
計	—	—	221	18	6

多摩川河口域に飛来する野鳥の保護に向けた寄生虫感染状況の調査

(研究助成・学術研究VOL. 47—NO. 333)

著 者 彦坂 健児

発行日 2018年11月

発行者 公益財団法人とうきゅう環境財団

〒150-0002

東京都渋谷区渋谷1-16-14 (渋谷地下鉄ビル内)

TEL (03) 3400-9142

FAX (03) 3400-9141

<http://www.tokyuenvironment.or.jp/>