小児と成人中耳貯留液の生化学的特徴 第2報 蛋白質成分

東京大学医学部耳鼻咽喉科学教室（主任：野村恭也教授）

矢 部 利 江

BIOCHEMICAL DIFFERENCES IN MIDDLE EAR EFFUSIONS BETWEEN PEDIATRIC AND ADULT PATIENTS, (II) THE PROTEIN COMPOSITION

RIE YABE, M.D.

Department of Otorhinolaryngology, Faculty of Medicine, University of Tokyo, Tokyo

To clarify the biochemical differences between pediatric and adult middle ear effusions (MEEs) in secretory otitis media with effusion (OME), we analyzed the protein components from MEEs of 3 children and 3 adults by electrophoresis. High molecular protein components (280 and 265 kDa proteins), which contained in sera in the concentrations less than 2.5%, were not detected in MEEs even in trace amounts. The protein components which molecular weights were less than 260 kDa are transferred from sera into MEEs in a same proportion as in sera.

Mucin type glycoprotein was comprised about 30% of the total protein in pediatric mucous MEEs and the weight ratio of mucin to albumin in pediatric mucous MEEs was 2.69, but serous MEEs from adult patients did not contain mucin.

Immunoglobulin (IgA, IgG and IgM) concentrations in pediatric mucous MEEs were same as in adult serous MEEs. The concentrations of IgA and IgM in MEEs were higher than in sera. Lysozyme concentration in MEEs was also higher than in sera, and that in pediatric mucous MEEs was nearly 2 times higher than serous MEEs from adult patients.

Key words: 滲出性中耳炎, 中耳貯留液, 蛋白質成分, ムチン
生化学的分析

A94—0525—22141

1. はじめに

滲出性中耳炎の中耳貯留液は、血清、粘膜上皮、炎症細胞、微生物などを由来とする物質が混在している。炎症に伴って産生される免疫グロブリンや抗菌性蛋白質リゾチーム、さらには気道粘膜線毛上皮と性格を同じくする中耳腔と耳管の構造的類似性から杯細胞の産生するムチン性糖蛋白質も OME の発症と病状の進行に重要な役割を持つことが予想される。脂質成分が小児粘液性中耳貯留液と成人漿液性中耳貯留液との間で著明な違いを持っていることから、両者の蛋白質成分も同様に詳細に解析し、病態解析の基礎的データを集

めた。

2. 材料及び方法

(1) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) による蛋白質成分の分析

(a) 試料の調製

小児粘液性 MEE 3 例 (平均年齢 6.3 歳), 成人漿液性 MEE 3 例 (平均年齢 62.7 歳) を採取した。比較のため小児血清 3 例 (平均年齢 8.0 歳) と成人血清 3 例 (平均年齢 35.0 歳) を用意した。小児粘液性 MEE は超音波ホモジナイザーで蒸留水 1ml と混合, また成人 MEE, 小

児及び成人血清は蒸留水で希釈し約 $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の蛋白質量になるように試料濃度を調製した。

(b) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

蛋白質重量 $8\mu\text{g}$ 相当の試料に $15\mu\text{l}$ サンプルバッファー (蒸留水 4.0ml , 0.5M トリス-HCl (pH 6.8) 1.0ml , グリセリン 0.80ml , 10% SDS 1.6ml , 2-メルカプトエタノール 0.4ml , 0.05% (W/V) プロモフェノールブルー 0.2ml) を加え、 95°C で 4 分間加熱し試料とした。アクリルアミドグラジェントゲル (4-20%) を用い、 60mA の等電流で 90 分間泳動した。標準物質としては、リゾチーム (分子量 16kDa)、ソイビントリプシンインヒビター (分子量 24kDa)、カルボニックアンハイドラーゼ (分子量 33kDa)、卵白アルブミン (分子量 47kDa)、ウシ血清アルブミン (分子量 84kDa)、ホスフォリパーゼ B (分子量 110kDa) を用いた。ゲルは泳動終了後、蛋白質染色としてクマシーブリリアントブルー染色を、糖蛋白質染色として PAS 染色を行った後、乾燥し、デンストメーター (測定波長 590nm) により各バンドを定量した。検量線は同一ゲル上に異なる濃度のウシ血清アルブミンを泳動し、同様の方法でデンストメーターの面積から作成した。PAS 染色で染色されたムチン性糖蛋白質についても精製されたブタ胃液ムチンを用いて検量線を作成し定量した。

(2) Western Blotting 法による免疫グロブリン (IgA, IgG, IgM) とリゾチームの定量

(a) 試料の調製

小児粘液性 MEE 3 例 (平均年齢 6.0 歳) と成人漿液性 MEE 3 例 (平均年齢 61.0 歳) および小児血清 2 例、成人血清 2 例を蒸留水で希釈し、試料とした。小児粘液性 MEE は、前述のごとく超音波ホモジナイザーを用いて蒸留水と混合した。

(b) Western blotting 法

2-(1)と同様に SDS-アクリルアミドグラジェントゲル (4-20%) で電気泳動を行った後、 100mV で 1 時間トランスファーバッファー (pH 8.3) 中で通電し、ニトロセルロース膜に転写した。転写終了後のゲルはクマシーブリリアントブルー染色を行い、ゲル内の蛋白質はほとんどニトロセルロース膜に移動していることを確認した。転写後のニトロセルロース膜は、ブロッキングバッファー (1% 卵白アルブミン, 1% ポリビニルピロリドン (PVP) in PBS) で 37°C 1 時間反応させた後、パーオキシダーゼ標識抗ヒト IgA, 抗ヒト IgG, 抗ヒト IgM ならびに抗ヒトリゾチーム抗体を 4°C 一晩反応させた。0.5% Tween20 PBS 溶液でよく

洗浄後、膜上に残存したパーオキシダーゼ活性をコンカイミノステインキットで反応させた。各蛋白質の定量は同一ゲル内に既知量の精製蛋白質を泳動し、同じ操作で転写・免疫染色後、デンストメーター (測定波長 590nm) を用いて各バンドの濃度を定量した。

(3) 小児粘液性 MEE のムチンと鼻汁ムチンの免疫学的性質

(a) 試料の調製

小児粘液性 MEE 5 例と膿粘液性鼻汁を各々超音波ホモジナイザーを用いて 0.22M チオシアン酸ナトリウムを加えた 0.02M リン酸バッファー溶液と混合した後、 $15,000\text{rpm}$ で 15 分間遠心し、不溶物を除いた後、上清を蒸留水に対して透析した。DNA と RNA を分解するために、1 試料につき、DNase を $5,000\text{kunits}$, RNase を $1,110\text{kunits}$ 加え、 0.01M 塩化マグネシウムの存在下、 37°C で 1 時間反応させた。

(b) Sepharose CL-4B カラムクロマトグラフィーによる分析

(a)の試料を Sepharose CL-4B カラム ($90\times 2.8\text{cm}$) でゲルろ過した。 0.02M PBS (pH 7.5) で溶出させ、溶出液の溶出パターンはヘキソーフ含量をフェノール硫酸法で、タンパク質含量を UV 吸収 (280nm) で定量した。

(c) 鼻汁ムチンと MEE ムチンの免疫学的性質の検討

ゲル濾過法で同様に精製した鼻汁ムチンを Freund 完全アジュバントと共に家兎に免疫し、得られた抗鼻汁ムチン抗血清を用い、Ouchterlony 二重拡散法による鼻汁ムチンと MEE ムチンの抗原性を比較した。

3. 結 果

(1) 小児ならびに成人 MEE 中の蛋白質成分

SDS-PAGE 終了後、クマシーブリリアントブルー染色を行ったものが図 6, PAS 染色を行ったものが図 7 である。血清と MEE の蛋白質パターンは類似しており、 67.5kDa の血清アルブミンが全蛋白質の 37.3% を占め、その他のバンドもほぼ両者に検出された。従って MEE 中の主要蛋白質のほとんどは血清より移行したと予想される。しかし血清中に認められる蛋白質のうち分子量が 280kDa と 265kDa のものは MEE 中に認められず、血清蛋白のうち分子量 260kDa 以下の蛋白質が MEE 中に移行しており、それ以上の分子量の蛋白質は血清から MEE 中に移行していないことがわかった。図 7 は同じ試料の SDS-PAGE ゲルを PAS

図1 小児と成人の血清とMEEのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動像 (クマシーブリリアントブルー染色)

小児血清 (Child, Serum 1~3), 成人血清 (Adult, Serum 1~3), 小児中耳貯留液 (Child, MEE 1~3), 成人中耳貯留液 (Adult, MEE 1~3) を電気泳動した後, クマシーブリリアントブルー染色を行った. 左端は標準蛋白質.

図2 小児と成人の血清とMEEのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動像 (PAS染色)

小児血清 (Child, Serum 1~3), 成人血清 (Adult, Serum 1~3), 小児中耳貯留液 (Child, MEE 1~3), 成人中耳貯留液 (Adult, MEE 1~3) を電気泳動した後, PAS染色を行った. 左端は標準蛋白質.

図3 電気泳動およびデンシトメトリー法により作成されたムチン性糖蛋白質の検量線

左側はブタ胃液ムチンを電気泳動後、PAS染色を行ったもので、右のグラフはその結果から作成した検量線。電気泳動像の左端の標準蛋白質は図6、図7と同じもので、上から110kDa, 84kDa, 47kDa, 33kDa, 24kDa, 16kDa。

図4 MEE中の総蛋白質含量

染色し、糖蛋白質を染色したものであるが、分子量300kDa以上のムチン性糖蛋白質が小児粘液性MEEにのみ認められ、成人漿液性MEEにはほとんど含有されていないことがわかった。

方法の箇所に記載したように、アルブミンとムチン含量をデンシトメトリー法で定量した。図8はブタ胃液ムチンを用いて作製した検量線である。

乾燥重量当たりの全蛋白質重量は小児粘液性MEE (360.7mg/g乾燥重量)の方が、成人漿液性MEE (294.9mg/g乾燥重量)よりも高い傾向にある(図9)。次に

図5 MEE中のムチン/アルブミン比

アルブミンに対するムチンの重量比(図10)は小児MEEでは2.69であるが、成人漿液性MEEではムチンは検出されなかった。しかし、まれな成人粘液性MEE 1例について同様にムチン/アルブミン比を求めると2.08で小児粘液性MEEより低値であった。従ってMEEが粘液性である原因はムチンの有無にあり、小児粘液性MEEでは実にアルブミンの2.7倍もの量のムチンが混在し、漿液性MEEではほとんど含有されていないことがわかった。

(2) 小児ならびに成人MEE中の免疫グロブリン(IgA, IgG, IgM)とリゾチーム

用いた抗血清はそれぞれの抗原に対し特異的な反応

図 6 (a) 血清と MEE 中の IgA の Western blotting 法による定量
小児血清 (Child, Serum 1, 2), 成人血清 (Adult, Serum 1, 2), 小児中耳貯留液 (Child, MEE 1~3), 成人中耳貯留液 (Adult, MEE 1~3) の IgA をニトロセルロース膜に転写後, 免疫染色を行った。

図 6 (b) 血清と MEE 中の IgG の Western blotting 法による定量
小児血清 (Child, Serum 1, 2), 成人血清 (Adult, Serum 1, 2), 小児中耳貯留液 (Child, MEE 1~3), 成人中耳貯留液 (Adult, MEE 1~3) の IgG をニトロセルロース膜に転写後, 免疫染色を行った。

性を示し, 交叉反応性は見られなかった。還元剤を入れたサンプルバッファーで試料を処理しているため免疫グロブリンはそれぞれのペプチド鎖に分離されている。抗体は H 鎖に対して反応する特性を持っている

図 6 (c) 血清と MEE 中の IgM の Western blotting 法による定量
小児血清 (Child, Serum 1, 2), 成人血清 (Adult, Serum 1, 2), 小児中耳貯留液 (Child, MEE 1~3), 成人中耳貯留液 (Adult, MEE 1~3) の IgM をニトロセルロース膜に転写後, 免疫染色を行った。

図 6 (d) 血清と MEE 中のリゾチームの Western blotting 法による定量
小児血清 (Child, Serum 1, 2), 成人血清 (Adult, Serum 1, 2), 小児中耳貯留液 (Child, MEE 1~3), 成人中耳貯留液 (Adult, MEE 1~3) のリゾチームをニトロセルロース膜に転写後, 免疫染色を行った。

(図11)。

それぞれの蛋白質の含量も同様にデンストメトリー法で定量し, アルブミン量に対する比で表したのが図12である。IgM は血清中より MEE 中の方が少ないのに対し, 逆に IgA と IgG は血中より MEE 中で倍近い濃度になっていた。IgA と IgG の濃度は小児粘液性

図7 血清とMEEにおけるIgA, IgG, IgM, リゾチームのアルブミンに対する重量

図8 小児粘液性MEEのSepharose CL-4Bカラムからの溶出パターン

MEEと成人漿液性MEEでの差は認められなかった。一方リゾチームも血清中よりMEE中で多くなっているが、アルブミンに対する比は成人漿液性MEE (1.069×10^{-2})より小児粘液性MEE中 (1.800×10^{-2})の方が高く、小児の方がリゾチームによる抗菌性が特に高いことを示している。

図9 抗鼻汁ムチン抗血清と鼻汁およびMEEムチンとのOuchterlony二重拡散法による反応

抗鼻汁ムチン家兔抗血清 (Ab) と Sepharose CL-4B カラムにかけた鼻汁の Tube Number 38, 40, 42 (N38, N40, N42) と中耳貯留液の Tube Number 38, 40, 42 (M38, M40, M42) との反応。

(3) 小児粘液性MEEのムチンと鼻汁中ムチンの性質

小児粘液性 MEE ムチンの Sepharose CL-4B カラムからの溶出パターンを図13に示した。Sepharose CL-4B カラムは分析する分子量の範囲が10k～20000kDaである。糖でモニターした時の小児粘液性 MEE および膿粘性鼻汁ムチンの溶出位置はほぼ等しく、ブロードな溶出パターンを示した。家兎抗鼻汁ムチン抗血清によるモニターでは鼻汁ムチンは Tube Number 38～50 に、小児 MEE では36～50に沈降線がみられた。MEE ムチンも鼻汁ムチンも等しい分子量を有すると考えられた。

次に、鼻汁ムチンと MEE ムチンの抗原性を比較するために、抗鼻汁ムチン家兎抗血清を用い、鼻汁の Tube Number 38, 40, 42 と MEE の Tube Number 38, 40, 42 を Ouchterlony 法により同様の寒天プレートで反応させたところ、図14のごとく spur を形成し、一部共通の抗原性を有することが示され、両ムチンは免疫学的に一部共通の性質を持つものであることが明らかになった。

4. 考 察

MEE 中に認められる蛋白質はその起源によって次の4つに分けられる。第1は、血清中のものが MEE 中に移行したもの。第2は中耳局所の粘膜上皮により産出されたもの。第3は白血球や組織のマクロファージなどの遊走細胞により産出されたもの。第4は中耳の細菌など微生物により産出されたもの、である。

図6のクマシーブリリアントブルー染色で染色された蛋白質は血清蛋白のうち分子量が260kDa以下のものがアルブミンを主要蛋白質とし血清中と同じ比率で MEE 中に認められることから、血清中のものがそのまま移行したと考えられる。一方 PAS 染色で小児 MEE にのみ染色された分子量が300kDa以上のムチン性糖蛋白質は、血清中には全く認められず、中耳粘膜の goblet cell により産出されたと考えられる。また図12で認められた免疫グロブリン(IgA, IgG, IgM)とリゾチームは、もちろん血清中にも認められ、MEE 中にも移行できると予想されるが、IgA, IgG とリゾチームの MEE 中での濃度は血清中での濃度よりかなり高いため、血清中から移行したものの他に、中耳腔上皮あるいは白血球などの遊走細胞が産出したものもかなり含まれると考えられる。一方ムチンは血清中にほとんど認められず、小児粘液性 MEE 中にアルブミン量の約2.7倍もの濃度で含まれていることから、もっぱら中耳腔で産生されたものであるとおもわれる。

ムチン性糖蛋白質の生化学的定義は、(1) 分子量が100万ダルトン以上である。(2) ペプチド鎖含量が30%重量以下である。(3) スレオニン、セリン、プロリンの含量が多い。(4) ペプチド鎖と糖鎖とは O-グリコシド結合により結合する。(5) ガラクトース、N-アセチルグルコサミン、N-アセチルガラクトサミン、フコース、シアル酸、硫酸を含み、マンノース、ウロン酸、グルコースは含まない。などであり¹⁾、構造的に明確に定まっている訳ではないため、本実験ではその性質をカラムからの溶出位置と特異的抗ムチン抗血清の反応性に置いて比較検討した。一般にムチン性糖蛋白質は disulfide (S-S) 結合と2価金属イオンを介して重合し、気道分泌液においては粘調度や弾性を与えている。図7のムチン性糖蛋白質は分子量が300kDaと小さめだが、これは、サンプルバッファーに含まれていた2-メルカプトエタノールにより S-S 結合が切れ、1つの分子がいくつかに分かれ、なかでも最も小さな分子を検出したためと考えられる。

ムチンは、消化管、唾液腺、呼吸器、生殖器など外分泌液に広く認められるが、最近では新しい腫瘍マーカーとしても注目されている^{2)~4)}

中耳～耳管にかけての上皮は、鼻腔、咽喉頭、気管、気管支などと同様の気道粘膜上皮(線毛上皮)であり⁵⁾、粘液を分泌している。中耳耳管におけるこの粘液の機能は他の気道粘液と同様に ① 微生物や微細粒子を吸着する、② 生物学的活性物質(IgA やリゾチームなど)が異物と反応し、これらの体内への侵入を阻止する、③ 異物を線毛輸送系により咽頭へ輸送し、中耳・耳管系から排除する、の3点である⁵⁾。①はムチン性糖蛋白質の巨大分子構造がになっており、②は局所で分泌される免疫グロブリンやリゾチームがつかさどり、③はムチンを含む粘液と線毛との相互作用による。ムチン性糖蛋白質は上記の①と③にかかわっており、中耳耳管系の粘液に不可欠である。しかし、小児滲出性中耳炎中耳腔上皮は杯細胞化生をなし、多量のムチンが産生され、③の線毛排泄系が障害されている。坂倉は、MEE の除去により線毛性排泄能は回復するため、これは炎症の原因ではなく結果であると述べている⁶⁾

線毛性排泄能には不可欠のムチンであるが、小児粘液性中耳炎は成人よりもムチン産生が活発であり、そのムチンの過多のため、MEE のレオロジー的性質が粘液線毛輸送にとって最適範囲から逸脱しているという報告もある⁷⁾。本来生体防御機構として働くべき

ムチンが逆に異物排泄機能を障害している理由は不明であるが、中耳腔に細菌などの感染があった際、亢進したムチンの分泌がなぜか止まらず、ムチンが多すぎのために線毛輸送系が働かず、微生物が排除されないまま中耳腔にとどまり、このため炎症が遷延化したということは考えられる。成人漿液性 MEE にはムチンはほとんど認められないのは、成人中耳腔上皮細胞は杯細胞化されにくいいためか、そもそも最初に液体が貯留する理由が全く別にあるのかは不明である。

Western blotting 法の結果から IgA と IgG は血清中より MEE 中の方が高く、中耳腔局所での産生が多い蛋白質と思われるが、逆に IgM は血中の方が高いことから、中耳腔局所では産生されておらず、また IgM は分子量が約 1000kDa と高いため、血中から MEE 中への移行も少ないと予想された。図 6 にみられるように、血清蛋白質のうち 260kDa 以下のものしか MEE 中に移行しないのは、分子量に対してバリアーの働きを持つ構造が存在するためと思われる。これら免疫グロブリンの濃度を MEE 中と血清中で比較すると IgA が最も血清に対する MEE 中での濃度比が高かった(小児 2.32, 成人 2.75)。このことは、中耳腔の細胞は呼吸器や消化管と同様に、分泌型免疫グロブリン IgA の産生能を持っていることを示している。IgA は局所での産生の割合が IgG (小児 1.89, 成人 2.01) や IgM (小児 0.72, 成人 0.59) より高い。さらにリゾチームは IgA や IgG 同様、MEE 中では高濃度となっていて(小児 3.62, 成人 2.54) 中耳腔でもつばら合成された蛋白質であると思われた。また免疫グロブリンは小児の粘液性 MEE と成人漿液性 MEE でほとんど差がなかったが、リゾチームは小児粘液性 MEE 中の方が成人漿液性 MEE の 2 倍近い濃度となっている。これらの結果は Virtanen らの結果⁸⁾ とほぼ等しい。リゾチームはグラム陽性菌の細胞膜障害作用があり、細菌感染で増加することから、リゾチームが小児粘液性 MEE で成人漿液性 MEE 中より高いことは小児粘液性 MEE 中で細菌感染が先行したことを示している可能性があり、興味深い。また Lim ら⁹⁾ は中耳ではリゾチームは主に粘膜上皮から分泌され、一部多核白血球やマクロファージから分泌されるという。これらの結果から成人 OME においても炎症反応が全くないというわけではないらしいが小児 OME の方が炎症がより強い印象を受ける。

線毛輸送系を障害する多量のムチンにせよ補体系を活性化させて炎症を遷延化する抗原抗体複合物にせ

よ、治療方法としてはいずれも早期に除去し、線毛輸送系の回復を図り炎症をおさめるのが最も良い方法と考えられる。鼓膜切開を行い、MEE を吸引除去すれば一時的にはこれらを排除できるが、鼓膜切開孔は 1 週間前後で閉鎖してしまうため、線毛輸送系の回復や炎症の消退前に閉鎖し、MEE が再貯留する恐れがある。このため、換気チューブを挿入し、中耳粘膜が回復する時間を作る必要がある。

5. 結 語

MEE 中の蛋白質成分を小児粘液性 MEE と成人漿液性 MEE で比較したところ、以下のことが示された。

1. MEE 中の蛋白質成分のうち血清蛋白質の中で分子量が 260kDa 以下のものがほぼ血清中の割合のまま移行していることが明らかになった。蛋白質パターンは小児粘液性 MEE と成人漿液性 MEE とで差はないが、乾燥重量に対する蛋白質の濃度は、前者が 360.7 mg/g, 後者が 294.9 mg/g であり、小児粘液性 MEE の方が高かった。

2. 中耳腔粘膜上皮細胞で産生されるムチン性糖蛋白質は、小児粘液性 MEE 中に多く(ムチン/アルブミン比 2.69)、成人漿液性 MEE 中にはほとんど検出できなかった。

3. 免疫グロブリン (IgA, IgG, IgM) 含量は小児粘液性 MEE と成人漿液性 MEE で差はなかった。MEE 中と血清中との濃度を比較すると、IgA, IgG は MEE 中の方が高濃度であった。またリゾチームも血清中より MEE 中で高く、小児粘液性 MEE 中の濃度は、成人漿液性 MEE 中の濃度の 2 倍近かった。

参 考 文 献

- 1) Forstner JF: Intestinal mucins in health and disease. *Digestion* 17, 234-263, 1978.
- 2) Irimura T, Carlson DA, Price J et al: Differential expression of a sialoglycoprotein with an approximate molecular weight of 900,000 on metastatic human colon carcinoma cells growing in culture and in tumor tissues. *Cancer Res* 48: 2353-2360, 1988.
- 3) Kurosawa A, Nakajima H, Funakoshi I et al: Structures of the major oligosaccharides from a human rectal adenocarcinoma glycoprotein. *J Biol Chem* 258: 11594-11598, 1983.
- 4) 杉田公一: 慢性副鼻腔炎鼻汁ムチン: その可容化と O-グリコシド糖鎖の生化学的研究. *日耳鼻* 89: 715-

- 723, 1986.
- 5) 坂倉康夫：気道液の機能 上気道液の生理と病態。協和企画通信，1989，13-16頁。
- 6) 坂倉康夫：粘液纖毛機能不全 上気道液の生理と病態。協和企画通信，1989，140-156頁。
- 7) Majima Y, Sakakura Y, Matsubara T et al: Rheological properties of middle ear effusions from children with otitis media with effusion. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 95 (Suppl 124) 1-4, 1986.
- 8) Virtanen S and Lahikainen E: Lysozyme activity and immunoglobulins in middle ear effusion fluid in acute purulent otitis media and in otitis media with effusion. *Scand J Infect Dis* 11: 63-67, 1979.
- 9) Lim DJ, Liu YS and Birck H: Secretory lysozyme of the human middle ear mucosa: immunocytochemical localization. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 185: 50-60, 1976.
-

(1990年7月16日受稿 1990年11月19日受理)

別刷請求先 〒113 東京都文京区本郷7-3-1

東京大学医学部耳鼻咽喉科学教室 矢部 利江