頭頸部悪性腫瘍のヌードマウスへの移植および実験的化学療法

東京医科大学耳鼻咽喉科学教室（主任：竹田千里教授）

広 川 剛 夫

EXPERIMENTAL CHEMOTHERAPY USING A TRANSPLANTED HEAD AND NECK CANCER MODEL IN ATHYMIC NUDE MICE

TAKEO HIROKAWA, M. D.

Department of Otolaryngology, Tokyo Medical College, Tokyo

Success rate of transplantation of head and neck cancer to BALB/C athymic mice was 42.2% (19/45). Based of the technical procedures, human squamous cell carcinomas with three different kinds of differentiations were transplanted to the mice and were used as chemotherapy models. These three kinds consisted of a well differentiated squamous cell carcinoma (ES-4), a moderately differentiated squamous cell carcinoma (OKK-2) and a poorly differentiated squamous cell carcinoma (PNC-1-JCK). Bleomycin (BLM) and Mitomycin C (MMC) were selected as chemotherapeutic agents and were given intraperitoneally either alone or in combination. Administration of BLM on day 1 and 4 in combination with MMC on day 1 was more effective. A schedule of administration of BLM for seven consecutive days followed by administration of MMC on day 8 enhanced chemotherapy effect more effectively.

Key words: ヌードマウス, 頭頸部癌, 異種移植, 実験的化学療法

A87—0182—91395

I 緒 言

ヌードマウスは体毛のない突然変異種で, Issacson および Cattanaach (1962年)¹²⁾ により報告された. Flanagan (1966年)²⁾ はヌードマウスの特性の一つが劣性遺伝子 (nu) による事を明らかにし, Pantelouris (1968年)²⁵⁾ はヌードマウスに胸腺が欠損している事を報告した. Rygaard および Povlsen (1969年)²⁶⁾ は先天性 T 細胞機能欠損動物であるヌードマウスへの悪性腫瘍の移植に成功し, 1973年に移植動物を用いて化学療法実験を行った²⁷⁾. 以来, 本邦でも下里²⁸⁾, 大沢²³⁾, 久保田¹⁴⁾, 永井²¹⁾ ら多数の各種治療実験の報告があり, ヌードマウスの有用性が認められている. 著者は国立がんセンター研究所病理部および, 東京医大において各種ヒト悪性腫瘍を BALB/C ヌードマウスに移植してきた. 今回は頭頸部悪性腫瘍の移植成績を報告するとともに, これらの著者自身が移植に成功した腫瘍および, すでに他

の研究者により移植継代されている腫瘍の中から分化度の異なる 3 種の扁平上皮癌を選択し実験的化学療法を行った. 実験に用いた抗腫瘍剤は, Bleomycin と Mitomycin C であり, 各腫瘍の両薬剤に対する感受性を比較検討し, 単独あるいは併用投与法についても検討した. さらに Bleomycin については実験に用いた 3 腫瘍を一匹のマウスに同時移植し, 同剤の腫瘍および各臓器の分布量を測定した.

II 材料と方法

A. 移植実験

1. 使用動物と飼育方法

実験動物中央研究所(実中研)にて, specific pathogen free (S. P. F.) 下で飼育, 繁殖された BALB/C を遺伝的背景とする ヌードマウス (nu/nu) の 6 週齢以上の雄または雌を使用した. 実験はビニール・アイソレーター

図1 実験に用いた腫瘍

あるいは laminar flow iso rack 内で行い、オートクレーブ滅菌した飼料、飲料水、ケージ、フィルターキャップ、床敷を使用した。

2. 腫瘍の移植

凍結切片標本あるいは生検材料のパラフィン切片で腫瘍が確認された各種ヒト頭頸部悪性腫瘍の原発巣または転移リンパ節を無菌的に採取し、培養液(MEM-Nissan)または PPMI-(1640) に入れ、細切した組織数個をトロカール針を用いてヌードマウス両側腋窩部皮下に移植した。一部の腫瘍においては、移植前処置としてライナック全身照射を行った。腫瘍の長径が15mm 前後に達した時点で継代し、摘出腫瘍、リンパ節、その他の臓器の病理学的検索を行った。それぞれの継代腫瘍についても10%ホルマリン固定HE染色による観察を行った。

B. 実験的化学療法

1. 使用動物と移植法

移植実験と同様であるが、ヌードマウスは6～8週齢、20g 以上の雄を使用した。

2. 実験に用いた腫瘍

1) ES-4 (図1a)

1976年国立がんセンターにて手術された食道癌患者の頸部リンパ節転移をヌードマウスに移植し、以後累代しているもので、21～25代の腫瘍を使用した。組織学的診断は高分化型扁平上皮癌である¹¹⁾。

2) OKK-2 (図1b)

1978年国立がんセンターで手術された上顎癌患者の原発巣を著者が移植株樹立し、累代移植された4～12代の腫瘍を用いた。組織学的診断は中等度分化型扁平上皮癌である⁶⁾。

3) PNC-1-JCK (図1c)

1974年に実中研の上山義人博士により初代移植された上顎癌の株で低分化型扁平上皮癌である。12代継代し、凍結保存された腫瘍を分与され、我々の施設で累代、観察を行った。実験には4～17代の腫瘍を用いた。

これらの腫瘍は、初代移植腫瘍の増殖は緩慢であったが、3代目以降の増殖曲線はほぼ一定している。凍結より戻した PNC-1-JCK も同様であった。3腫瘍の継代移植率は100%である。治療実験では、無菌的操作により腫瘍2mm 角2個を側背部皮下に移植した。4週間で腫瘍容積が1000mm³ 前後の固型腫瘍となった。

3. 抗腫瘍剤

1) Bleomycin (BLM)

市販の臨床用 BLM を生理食塩水(生食)にて溶解し、ヌードマウスへの1回投与量を10ml/kg となるように調整した。

2) Mitomycin C (MMC)

市販の MMC を使用直前に生食に溶解し、投与量は10ml/kg となるように調整した。

3) 投与方法

投与法は腹腔内投与(ip)とし、対照群には生食を同

表 1 抗癌剤投与スケジュール

様に投与し、移植翌日より投与を開始した。投与スケジュールを表1に示した。単独投与実験では、BLMは第1日目と4日目の週2回投与を1コースとして4コースおよび4週連日法を用い、MMCは第1日目週1回投与法による4コースを行った。BLM、MMCの併用実験では単独投与法をそのまま併用した方法と、BLM、MMC連続的併用(B-M)療法を行った。B-M療法は宮本らのスケジュールに準じた。

4. 腫瘍の大きさの測定および治療効果の評価

マウスの重量および腫瘍の長径×短径×高さを通3回測定し、各腫瘍が対数増殖を示す4週間で実験を終了し、マウスを屠殺、摘出腫瘍の容積、重量を測定し、対照群との推計学的比較(t検定)、T/C比の算出を行った。

$$T/C比 = \frac{\text{投与群の腫瘍重量(容積)の平均}}{\text{対照群の腫瘍重量(容積)の平均}} \times 100$$

摘出腫瘍および各臓器については、HE染色による組織標本作製し、腫瘍は国立がんセンターの分類³⁰⁾に従って組織学的治療効果を検討すると共に、MMC投与例には実験終了時のマウス白血球数を算出した。

5. 腫瘍中および各種臓器内のBLMの分布

一匹のマウスに治療実験で用いた3種の腫瘍をそれぞれ2mm角2個ずつ、両腋窩および両大腿部皮下に順次移動させて移植した。4匹のマウスを使用し、腫瘍が増大した時点でBLMを後頸部皮下より注射し、1時間後に腫瘍、血清、肺、胃、皮膚等のBLM分布量を測定した。リンパ節は腸間膜リンパ節を用いた。Bioassayの方法は血清1gに70%トリクロル酢酸を加え、ディスポージャーにてホモジネートし、1000rpm 10分遠心分離した。これを直径8mmのペーパーディスクに浸み込ませて、試験菌 *Pacillus subtilis* PCI 219を含む平板上にて、30°C一夜培養し、阻止円直径を測定し、BLM濃度を検量線より求めた。

III 結 果

A. 腫瘍の移植

1. 各種頭頸部腫瘍の可移植性について

45例のヒト頭頸部悪性腫瘍をスードマウスに移植した。腫瘍の種類と移植成績を表2に示す。移植腫瘍は原発部位では11種類で、上顎洞が19例と最も多く、次いで下咽頭頸部食道5例、舌および甲状腺の各4例である。45例中19例で初代移植に成功し、その成功率は42.2%である。下咽頭頸部食道癌の成功率が80%と最も高く、次いで上顎洞の63%であった。咽頭癌は3例移植したが、いずれも失敗し、うち1例(No. 35)では同一症例で初回および再発手術時と2回の移植を試みたが不成功であった。他に同一症例を異なる時期に移植した上顎癌(No. 3)では原発巣の移植に成功し、7カ月後に出現した頸部リンパ節の移植も成功した。また、上顎癌の2例に原発巣と転移巣の移植を同時に試みた。No. 14は両者ともに不成功であったが、No. 18では頸部リンパ節を移植したマウスのみが継代に成功した。

移植腫瘍を組織型で分類すると、扁平上皮癌が31例69%と過半数を占め、その初代移植成功率は52%であった。他に、腺癌、乳頭状腺癌、嗅神経芽細胞腫、悪性リンパ腫をそれぞれ2例ずつ移植した。

移植に用いた腫瘍を採取部位別にみると、原発巣24例中10例が成功し、42%、転移リンパ節は25例中10例で40%の初代移植成功率であった。No. 19は上顎洞のinverted papillomaから扁平上皮癌へ移行した症例で、原発巣は治療によりcontrolされていたが、7カ月後に出現した肺リンパ節転移巣の移植に成功した。本例はX線および病理学的に上顎癌の肺転移と診断され、この症例のみが頸部リンパ節以外の転移巣より移植された。

表 2 頭頸部悪性腫瘍のヌードマウスへの移植成績

	原発部位	名前	組織型	可移植性	前照射	移植部位
1	Maxillary sinus	H. I.	squ. c. ca.	○		metast. L. N.
2		S. O.	squ. c. ca.	○		primary
3		S. I.	squ. c. ca.	○		primary
		"	"	○		metast. L. N.
4		S. M.	squ. c. ca.	○		primary
5		H. S.	squ. c. ca.	○		primary
6		H. A.	squ. c. ca.	×		primary
7		S. S.	squ. c. ca.	×		primary
8		N. S.	rhabdomyosarcoma	×		primary
9		Y. K.	squ. c. ca.	○		primary
10		Y. T.	squ. c. ca.	○		primary
11		Y. M.	squ. c. ca.	○		primary
12		T. T.	malignant melanoma	○		primary
13		T. S.	squ. c. ca.	○		primary
14		G. N.	squ. c. ca.	×		primary
	Nasal cavity	"	"	×		metast. L. N.
15		M. N.	squ. c. ca.	×		primary
16		Y. A.	squ. c. ca.	×		primary
17		A. S.	squ. c. ca.	×		primary
18		F. A.	squ. c. ca.	×		primary
		"	"	○		metast. L. N.
19		Y. F.	squ. c. ca.	○		metast. L. N.
20		K. M.	olfactory neuroblastoma	×		primary
21		S. R.	olfactory neuroblastoma	×		primary
22	Tongue	N. K.	squ. c. ca.	×		metast. L. N.
23		K. U.	squ. c. ca.	×		metast. L. N.
24		S. I.	squ. c. ca.	○		metast. L. N.
25		I. K.	squ. c. ca.	×		metast. L. N.
26	Nasopharynx	E. O.	squ. c. ca.	×	400rad	metast. L. N.
27		H. M.	mucopidermoid ca.	×	400rad	primary
28		R. K.	transitional c. ca.	○	400rad	metast. L. N.
		"	"	×		metast. L. N.
29	Metapharynx	T. Y.	squ. c. ca.	×		metast. L. N.
30	Hypopharynx and cervical Esophagus	H. N.	squ. c. ca.	○		metast. L. N.
31		H. W.	squ. c. ca.	○		metast. L. N.
32		T. U.	squ. c. ca.	○		metast. L. N.
33		A. A.	squ. c. ca.	×		metast. L. N.
34		T. K.	squ. c. ca.	○		metast. L. N.
35	Larynx	R. K.	squ. c. ca.	×		metast. L. N.
		"	"	×		metast. L. N.
36		M. T.	squ. c. ca.	×		metast. L. N.
37		M. S.	squ. c. ca.	×		metast. L. N.
38	Parotid gland	T. T.	adeno. ca.	×	500rad	metast. L. N.
		H. I.	adeno. ca.	×		metast. L. N.
39	Neck	T. U.	malignant lymphoma	×		primary
40		S. S.	anaplastic ca.	○		primary
41		Y. M.	papillary adeno. ca.	×	500rad	metast. L. N.
42		T. N.	papillary adeno. ca.	×	400rad	metast. L. N.
43	Parathyroid gland	T. Y.	malignant lymphoma	×		primary
44		I. Y.	carcinoma	×	500rad	primary

上咽頭癌 (No. 28) では、移植 3 日前にライナック 400rad をマウスに全身照射し、移植成功したが、同時に移植した非照射マウスでは不成功であった。その他の 2 例の上咽頭癌および耳下腺癌や甲状腺癌の 4 例については、400～500rad の移植前照射後に移植したが、全例不成功であった。

2. 腫瘍の性状

継代が可能であった腫瘍についてみると、初代移植後の腫瘍の多くは一時縮小、あるいは消失し、再び増殖して移植後 3～6 カ月位で継代可能の大きさとなった。特異な経過としては、分化型扁平上皮癌の不成功例で、角化物が皮下腫瘍として、マウス死亡までの 1 年以上も残存した症例 (No. 23) や、継代腫瘍が常に偽嚢胞を形成する症例 (No. 1) もあった。また症例 No. 18, 19, 31, 34, 41 では移植後も腫瘍が縮小せぬまま増大した。可

移植腫瘍は 3 代目以降はそれぞれほぼ一定の増殖曲線を示し、組織学的にも原腫瘍とほぼ同様の所見であった。甲状腺未分化癌である症例 No. 41 は 3 代まで継代したが、各代共にマウスの疲弊、衰弱が著しく、3 代目以降の継代維持は出来なかった。著者の実験では継代腫瘍における転移例は認められなかった。

B. 実験的化学療法

1. 単独投与

ES-4, OKK-2, PNC-1-JCK の 3 腫瘍に BLM および MMC を単独投与した実験結果 および 実験に用いたマウスの匹数を表 3 に示した。対照群には治療群と同数あるいはそれ以上のマウスを用いた。

1) BLM

① BLM 週 2 回投与実験

OKK-2 に BLM を 週 2 回投与し、腫瘍容積を対数

表 3 BLM および MMC 単独投与による
実験結果

腫瘍	投与法	B L M				M M C			
		2/W T/C	■ T/C	■ T/C	■ T/C	1/W T/C	■ T/C	■ T/C	■ T/C
ES-4	2/W ×4W	10	63.3	48.0	9	0.3	44.5	54.7	3
		20	17.0	21.1	7	0.5	78.7	82.1	7
		40	4.4	6.4	4	1.0	6.0	6.1	4
	7/W ×4W	60	5.2	7.0	4	1.5	1.2	1.3	3
		2.5	20.8	24.9	3	3.0	0.9	0.8	3
		5	10.6	13.9	8				
OKK-2	2/W ×4W	10	5.9	6.6	3	0.5	45.9	43.6	8
		5	66.0	66.0	3	1.0	34.3	35.3	7
		10	42.4	39.7	8	2.0	21.8	19.4	8
	7/W ×4W	20	20.8	19.7	4	4.0	1.2	0.8	4
		40	9.5	8.8	4	0.5	92.8	87.0	4
		5	84.5	76.7	3	1.0	75.1	64.0	7
PNC-1-JCK	2/W ×4W	10	33.5	37.4	12	2.0	64.2	48.9	5
		20	21.9	16.1	8	4.0	0.8	1.8	3
		40	10.4	10.8	8				
	7/W ×4W								

T/C比は、腫瘍重量/対照群腫瘍重量×100
 1/100 0.05
 1/100 0.02
 1/100 0.01
 1/100 0.001

図 3 BLM に対する腫瘍重量による抗腫
瘍効果の比較 図 2 BLM 投与における OKK-2 の増殖
曲線 図 4 BLM 4週連日投与における ES-4
の増殖曲線

変換し、増殖曲線を求めた (図2)。実験終了時の腫瘍容積、摘出腫瘍重量の比較では1回投与量 20mg/kg 投与群以上で対照群との間に推計学的有意差 ($p < 0.01$) を認めた。

また、ES-4、OKK-2、PNC-1-JCK の3種の腫瘍に対し BLM を投与した腫瘍重量の T/C 比と BLM 投与量の関係を図3に示す。それぞれの腫瘍は BLM に dose response を示すとともに、1回投与量 20mg/kg 以上で

推計学的有意差を認めた (表3)。

② BLM 4週連日投与実験

ES-4 に対し、BLM を4週連日投与した (図4)。1回投与量 2.5mg/kg 群 ($p < 0.05$)、5mg/kg 群 ($p < 0.01$)、10mg/kg 群 ($p < 0.01$) はすべて、対照群との間に推計学的有意差を認めた。投与群の総投与量はそれぞれ 70mg/kg、140mg/kg、280mg/kg であった。

2) MMC

図5 MMC 投与における ES-4 の増殖曲線および摘出腫瘍

① ES-4 および OKK-2 に対する MMC 週1回投与実験

ES-4 の増殖曲線 および 摘出腫瘍を図5に示す。1.0 mg/kg 投与群は 対照群に対し、推計学的有意差 ($p < 0.01$) を示した。

OKK-2 に対して MMC 週1回投与した増殖曲線を図6に示す。推計学的有意差は 2.0mg/kg ($p < 0.01$) で認め、4.0mg/kg 投与群 ($p < 0.001$) では著しい効果を認め、腫瘍は縮小したが腫瘍の消失にはいたらなかった。

② MMC に対する抗腫瘍効果の比較

図6 MMC 投与における OKK-2 の増殖曲線

図7 MMC に対する腫瘍重量による抗腫瘍効果の比較

ES-4, OKK-2, PNC-1-JCK の3腫瘍に対する腫瘍重量の T/C 比と投与量の関係を図7に示した。対照群との間に有意差を認めた投与量は、ES-4; 1.0mg/kg, OKK-2; 2.0mg/kg, PNC-1-JCK; 4.0mg/kg であり、MMC の感受性は ES-4 が最も高く、次いで OKK-2

図 8 増殖曲線

BLM および MMC 併用投与による ES-4 の増殖曲線および実験結果

であり、PNC-1-JCK は最も低い感受性であった。

2. 併用治療実験

1) ES-4 に対する BLM および MMC の併用実験
 高分化型扁平上皮癌である ES-4 を用いて、BLM, MMC の併用治療実験を2つの異なる投与方法で行った。BLM 週2回 および MMC 週1回投与による併用実験は、それぞれの単独投与実験の最少有効投与量の1/2量である BLM 10mg/kg, MMC 0.5mg/kg を併用した。また、B-M 療法（宮本法）実験では、BLM 2.5mg/kg を7日間連日投与し、8日目に MMC 0.5mg/kg 投与を1コースとして4週間で2コース行った。結果を図8表4に示す。2つの併用実験は共に、対照群との間に推計学的有意差を認めたが、両者の間には有意差はなかった。

2) PNC-1-JCK に対する BLM および MMC の併用実験

低分化型扁平上皮癌である PNC-1-JCK を用いて、BLM, MMC の併用実験を行った。方法および結果を図9、表5に示す。総投与量は BLM 35mg/kg（一部40mg/kg）、MMC 4mg/kg とし、すべての群で投与量が一定となるようにした。

BLM 5mg/kg 週2回と MMC 1.0mg/kg 週1回投

表 4 実験結果

1. Control
2. BLM 10mg/kg x 2/W
MMC 0.5mg/kg x 1/W x 4W
3. (BLM 2.5mg/kg x 7/W + MMC 0.5mg/kg x 1/W) x 2

I. 腫瘍容積

M+SD (mm ³)	T/C	t	P
1. 1204 ± 374	100	—	—
2. 386 ± 261	32.1	3.437	P < 0.02
3. 203 ± 70	16.9	4.559	P < 0.01

II. 腫瘍重量

M+SD (mg)	T/C	t	P
1. 643 ± 247	100	—	—
2. 229 ± 129	35.6	2.925	P < 0.05
3. 73 ± 27	11.4	3.972	P < 0.02

実験終了時白血球数（1群2匹）

1. 5750/mm³
2. 4550/mm³ (MMC Total Dose 2mg/kg)
3. 5600/mm³ (MMC Total Dose 1mg/kg)

与の併用実験と、BLM 2.5mg/kg および MMC 2.0mg/kg による B-M 療法実験を行った。B-M 療法実験群での効果が最も大きく、対照群との間に推計学的有意差 (p < 0.05) を認めた。BLM 単独 2.5mg/kg 7日連日2コース投与群と BLM 5.0mg/kg 週2回、MMC 1.0mg/kg 週1回併用投与群が同程度の効果であった。

3. 副作用

単独投与実験での副作用の発現は、マウス重量では1回投与量が BLM 40mg/kg、および MMC 4.0mg/kg 群ではともに軽度の減少がみられるのみであったが、BLM 60mg/kg 投与群では対照群に比べ、平均24%の有意の減少 (p < 0.001) を示した。マウス白血球数では ES-4 に対する MMC 1.0mg/kg 投与群で対照群の平均 8200/mm³ が 3200/mm³ となり、有意の減少を示し (p < 0.01)、他の腫瘍では MMC 2.0mg/kg 投与群以上で有意の減少が認められた。実験終了時の脾臓重量は MMC 4mg/kg 投与群で対照群に対し、有意の減少 (p < 0.02) を示した。マウスの皮膚は BLM 40mg/kg、および MMC 2.0mg/kg 投与群より投与量の増加につれて、色調がやや悪化した。

併用実験群では、PNC-1-JCK においてのみ、白血球数および脾臓重量に軽度の減少を認めた。また、著者の

圖 9 增殖曲線

BLM, MMC 併用投与による PNC-1-JCK の増殖曲線および実験結果

表 6 スードマウス移植腫瘍の BLM, MMC 投与後の組織学的治療効果

[illegible]

すべての実験で、薬剤によるマウスの死亡例はなかった。

4. 組織学的治療効果

実験終了時の腫瘍の正中剖面における組織学的治療効果を、国立がんセンター分類に従って検討した。その結果を表6に示す。組織学的抗腫瘍効果は、①癌細胞の破壊、②癌細胞の腫大、変性、消失、③核の空胞化、腫大、④壊死層の増大、⑤線維性間質の増大が挙げられる。BLM 週2回投与群ではES-4、OKK-2では共に40

表 5 實驗結果

I. 方法

-
- Figure 1 is a schematic representation of the experimental protocol. It shows five experimental groups (1-5) over a 4-week period. The timeline is marked with weeks 1W, 2W, 3W, and 4W. Arrows indicate the timing of treatments: BLM is given daily from Week 1 to Week 4; MMC is given on specific days in Weeks 1, 2, and 3.
Group	Treatment	Dose	Duration / Timing
1	Control	-	4W
2	BLM	2.5 mg/kg	4W (daily)
3	MMC	2.0 mg/kg	4W (specific days in Weeks 1, 2, 3)
4	MMC + BLM	MMC 2.0 mg/kg, BLM 2.5 mg/kg	4W (BLM daily, MMC specific days in Weeks 1, 2, 3)
5	MMC + BLM	MMC 1 mg/kg, BLM 5 mg/kg	4W (BLM daily, MMC specific days in Weeks 1, 2, 3)

11 結果

i) 雞腸重量(mg)		ii) 雞腸容積(mm ³)	
M ± SD	T/C × 100	M ± SD	T/C × 100
1. 223 ± 152	100	1. 380 ± 243	100
2. 56 ± 30	25.1	2. 153 ± 73	40.3
3. 123 ± 56	55.2	3. 259 ± 82	68.2
4. 23 ± 8	10.3	4. 54 ± 16	14.2
5. 49 ± 26	22.0	5. 148 ± 64	38.9

P = 0.05

iii) 白血球數

1. 8350/mm ³	2. 7750/mm ³	3. 5300/mm ³
4. 6600/mm ³	5. 5900/mm ³	

表 7 BLM 注射 1 時間後の腫瘍 および臓器への BLM の分布量
(μg 重量/ mL serum or g Tissue)

M S D		M S D	
無分性愛	13.62 4.42	好	nd
偏重分性愛	5.65 2.21	嫌	0.84 0.81
無分性愛	7.48 4.42	好	nd
偏重分性愛	12.84 3.32	好	19.51 1.47
好	11.31 4.10	嫌	3.89 0.84
好	2.26 1.22	好	nd

nd, not detectable

mg/kg 群より効果が認められたが、PNC-1-JCK ではほとんど効果を認めなかった。

MMC に対しては ES-4 では 1.0 mg/kg 群で効果を認め、3.0 mg/kg 群では組織学的 viable cell は認められなかった。3 腫瘍の比較では ES-4 が最も高い組織学的

効果を示し、次いで OKK-2 であった。

C. BLM の分布

BLM 注射 1 時間後の腫瘍および血清、各臓器の BLM 分布量を表 7 に示した。腫瘍では、ES-4 が最も高い分布量を示し、次いで PNC-1-JCK であったが、各腫瘍間には推計学的有意差は認められなかった。腫瘍以外では腎が最も高く、次いで血清、肺、皮膚であった。また肝、脳、リンパ節では微量あるいは全く検出されなかった。

Ⅳ 考 按

A. 移植実験

1978年2月より1982年2月までの4年間に、45例のヒト頭頸部悪性腫瘍をヌードマウスに移植した。初代移植成功率は 42.2%である。下咽頭頸部食道癌が 80%と最も良い成績であり、次いで上顎洞の 63%である。下咽頭頸部食道はすべて扁平上皮癌であり、上顎洞扁平上皮癌が 65%の成功率であったことから、頭頸部領域で発症頻度の多い癌では、臨床上、比較的予後の悪いとされている癌ほどヌードマウスへの移植成績が良いという結果となり、甲状腺悪性腫瘍 4 例中未分化癌の 1 例のみが移植成功したのも、その裏づけと考えられる。

舌、喉頭、上咽頭、下咽頭頸部食道では原発巣の移植に際し、十分量の腫瘍が得がたい事、また、腫瘍は露出し、汚染されていることから、ヌードマウスへの移植にはかなりの困難を伴う。しかし、初代移植成功率は原発巣 42%、転移巣 40%で、原発巣は必ずしも移植に不適当とはいえない。比較的移植例数の多い上顎洞扁平上皮癌に限定して検討すると、原発巣より 12 例を移植し、50%の成功率である。一方、3 例に原発巣とリンパ節転移の両者の移植を試みた結果、転移巣のみの成功例があること、また転移巣のみの移植を試みた 2 例ではともに成功した事より、原発巣より転移巣の方が移植は成功し易いのかも知れない。これは転移巣そのものが、より高い悪性度を有するものなのか、または腫瘍の移植が転移と類似した機構で成り立っているのではないかと著者は推測している。

初代移植成績については、下里²¹⁾の報告によれば、48種 756例の悪性腫瘍と 10種 53例の悪性度の低い腫瘍ないし良性腫瘍を BALB/C ヌードマウスに移植し、238例、29%の成功率であったと述べている。著者が移植を試みた悪性リンパ腫 2 例はいずれも不成功であったが、玉置²²⁾は上皮性や間葉系の悪性腫瘍の成功率は比較

的高いが (26.7%)、リンパ腫、白血病は著しく不良であり (7.5%)、natural killer 活性に対する感受性が高い事がその一因と考えられると述べている。河村ら⁸⁾は消化器癌を 31 例移植し、早期癌はいずれも不成功で、進行癌の生着率は 42.1%であり、癌の深達度とヌードマウス可移植性は関係がある事を示唆している。亀谷ら¹³⁾の報告でも、ホルモン産生ヒト腫瘍の移植では、悪性度の高い肺小細胞癌、絨毛上皮癌で生着、継代の可能性が高いと述べている。

頭頸部領域の報告では、甲能ら¹⁷⁾は 22 例移植、9 例 41%の成績であり、上顎癌 6 例、舌癌、口唇癌、鼻中隔癌の各 1 例が成功し、著者と同程度成功率であった。沢木ら²⁰⁾は上咽頭癌を組織培養株を含め、33 例移植し 6 例に成功した。多数例の頭頸部癌の移植成績の報告は本邦では極めて少なく、自験例を含めても十分な比較検討はできないが、上顎癌の移植成績はかなり高いのではないかと思われ、また扁平上皮癌を主とした頭頸部癌は他の領域に比べて、可移植性が高いのではないかと思われる。

移植前照射により渡辺はヒト急性リンパ性白血病由来の株で、極めて困難とされていたヌードマウスでの白血化に成功し⁴⁰⁾、また、マウスの脾臓を摘出し、照射と併用した前処置についても報告している⁴¹⁾。著者は移植成功率の低い腫瘍に対する前処置として、マウスの免疫能を低下させる目的で移植前照射を行った。明らかな効果を認めたものは上咽頭移行上皮癌である。この症例では移植 3 日前にマウスに 400rad のライナック全身照射をしたところ、腫瘍は増大し、移植は成功した。同時に非照射マウスにも移植したが、不成功であった。他に 400-500rad の前照射を発生部位では 4 種、合計 6 腫瘍に行ったが甲状腺乳頭状腺癌、耳下腺癌および副甲状腺癌では全例不成功であり、現在迄これらの腫瘍のヌードマウス移植成功の報告はない。また、河村ら⁸⁾は胃癌継代株を用いて ⁶⁰CO 照射後 4 週間以内のマウス死亡率より、1 回全身至適照射量は 400rad であると述べ、非照射マウスと移植前照射したマウスでの比較では、腫瘍の生着率はそれぞれ 41.2%、100%で、著しい差があったと報告している。ヌードマウスの飼育管理、実験にはかなりの費用を必要とし、移植不成功によるマウスの無駄を省くためにも、可移植性向上の研究努力は今後も続けなければならないが、移植前照射は有効な方法であると思われる。

B. 実験的化学療法

Povlsen²⁷⁾はヌードマウス移植ヒト悪性腫瘍は多くの

場合、元腫瘍の性質をよく維持し、組織学所見、染色体、抗原性、ホルモン産生性を維持するとともに、元腫瘍とはほぼ同じ抗癌剤感受性を有すると報告した。本邦でも、下里²⁹⁾、久保田¹⁴⁾、藤田⁹⁾、松田¹³⁾、谷³⁴⁾らが抗癌剤感受性について、広橋⁷⁾、久保田¹⁶⁾らがホルモン依存性について同様の報告をしている。

著者の化学療法実験では、3種類のヒト扁平上皮癌ヌードマウス移植腫瘍を使用した。高分化型の食道癌(ES-4)、中等度分化型の上顎癌(OKK-2)、低分化型の上顎癌(PNC-1-JCK)であり、3腫瘍とも継代による組織所見および増殖曲線はほぼ一定であり、実験に適した腫瘍であった。著者は移植翌日より抗癌剤投与を開始している。その理由は担癌マウスが短期間で腫瘍死しないために、生存日数では評価できず、対照の腫瘍が対数増殖期にある期間中に実験を終了する必要がある事、また早期癌や手術直後の腫瘍播種例への治療を想定しているためである。移植翌日より治療を開始する場合はいうまでもなく、継代により100%の生着率が絶対的条件である。著者の実験に用いた腫瘍はこの条件を満たしており、結果的にではあるが、抗癌剤を投与しても多くの腫瘍は増殖を示すとともに、ES-4に対するMMC 3mg/kg投与群のみが実験終了時の組織所見で、viable cellの消失をみたにすぎない。移植翌日より抗癌剤を投与する本実験は、腫瘍増殖抑制効果を検討する実験であると云える。

米国ではBattele Columbus Laboratoriesが独自のProtocolを用いて、ヌードマウス移植ヒト癌による抗癌剤のスクリーニングを行っている⁹⁾。花谷ら³⁵⁾は同一腫瘍および薬剤で移植型日投与法と、腫瘍が増殖を始めてから治療を開始するBattele Columbus Laboratories protocolとを比較検討し、両者の成績はよく一致していたと述べている。

一方、従来から広く臨床で使用され、一定の評価を得ている薬剤で投与方法により、その効果の違いを認識、検討する事も極めて重要であると考え、実験ではBLM、MMCを用いた。BLMは頭頸部領域では使用頻度の高い抗癌剤の一つであり、扁平上皮癌には特に効果があるとされている³³⁾。また、MMCは多くの領域にわたり効果が認められ、日常使用されている。ともに基礎、臨床のデータも豊富である²⁴⁾³²⁾³⁶⁾³⁷⁾³⁸⁾。単独投与でのBLM週2回およびMMC週1回投与法はマウスの尿への排泄時間や、現在臨床で行われている投与法を念頭において、投与スケジュールを立案した。実験結果より腫瘍増

殖抑制効果を検討すると、BLM週2回投与法では対照群と推計学的有意差を認めたのは、3腫瘍とも1回投与量20mg/kg群以上であり、扁平上皮癌の分化度による効果の差はそれ程ないように思われた。また、BLMは週2回投与法より連日投与法の方が1/2以下総投与量で有効となることがわかった。MMC週1回投与法では、3腫瘍の最少有効量はすべて異なり、分化度の高い腫瘍がより感受性が高く、特にES-4はMMCに高い感受性を有する腫瘍と思われた。

併用治療実験において、ES-4ではBLM週2回、MMC週1回投与を単独投与最少有効量の1/2ずつ投与した2剤併用実験群が対照群との間に有意差を示した事は、副作用の軽減等の目的を果たすと思われ、有効な投与法であった。さらに同時に行ったB-M療法(宮本法)実験では、BLM、MMCの総投与量は単独投与での最少有効量の1/4で有効であった。

マウスの白血球数の比較では、MMCの投与量が増加すると減少し、MMCの投与量を出来るだけ少量にすべきである。その意味でも、これらの併用療法のもつ意義は大きいと思われる。二種の薬剤の無効量の併用により効果を得た著者の実験から、BLM週2回、MMC週1回投与による併用実験が相加効果とすれば、B-M療法実験は相乗効果を示したと思われた。一方、PNC-1-JCKではBLM、MMCが単独最少有効量の1/4になるように総投与量を一定にし、ともに相乗効果があるか否かを異なる投与法で検討した。B-M療法実験のみが対照群と推計学的有意差を認め、相乗効果を示した。また、BLM週2回、MMC週1回による併用実験では、ES-4と同様に最少有効量の1/2、つまりBLM 10mg/kg、MMC 2mg/kgによる併用投与を行えば、相加効果を得る可能性が有ると思われた。

Carter¹⁾は抗癌剤の多剤併用療法の基本的概念について、①使用する薬剤がそれぞれ単独でその癌にある程度有効であり、②それらの薬剤の作用機序が異なり、③副作用のpatternが分散している薬剤を選ぶべきであると述べている。ES-4およびPNC-1-JCKでのBLM、MMCの併用は、これに合致した薬剤の選択であった。宮本ら³⁹⁾はB-M療法の作用機序としては、BLMの潜在的致死効果(重死)が、MMCにより誘発されたか、BLMによる何等かの腫瘍損傷効果によりMMCの感受性が高まったか、あるいは双方の組み合わせによると考えられると述べ、その理論的根拠として制癌剤の殺細胞作用様式に基づくBLMの頻回投与による腫瘍細胞の

G₂ block と G₂ 期への集積, G₂ 期に特異的致死作用を有する MMC の周期依存性致死作用の相乗効果をあげている。

また、著者の B-M 療法実験ではその腫瘍重量、容積の減少に比して、組織学的効果は乏しい。これは本法のみでは、再発が比較的早い場合があるという臨床経験と一致した現象かもしれない。

B-M 療法の頭頸部癌の治療成績は、大山ら¹⁶⁾ は有効率 45.4%であると述べ、大野ら²³⁾ も有効例を報告している。著者の実験でも B-M 療法は扁平上皮癌に対し、高分化、低分化型とも他の併用実験よりも効果を認め、また BLM 連日投与実験でも明らかのように、同一薬剤でも投与法の検討、選択が極めて重要であると思われる。

腫瘍の治療実験は、発生臓器と同一部位に腫瘍が存在し、また、臨床と同じ投与系路での実験が理想的であるが、ヌードマウスではそこまでは望めない。従って、皮下の移植腫瘍に薬剤の分布を認める事が必要であり、また、皮膚への分布量の多い薬剤を使用した場合に、効果が過大に評価される危険性がある¹⁹⁾。著者は3種類の腫瘍が BLM の治療実験において、最少有効量が同じであった事より、一匹のマウスに3腫瘍を腋窩および大腿部皮下に順次移動させて移植し、BLM を後頸部皮下より投与し、1時間後の腫瘍への BLM の分布量に差異があるか否かを検討した。同時に、血清、肺、腎、皮膚等の組織への分布も測定した。3腫瘍を同時移植したのは、宿主を同じくする事で、比較がより正しく行われると思われたからであり、また、腫瘍の移植部位を順次かえたことは、注射部位と移植部位との距離を平均化するためであった。それぞれの腫瘍に BLM が高濃度に認められ、高分化型扁平上皮癌である ES-4 に最も高濃度の分布を認めたが、推計学的有意差はなかった。各臓器への BLM の分布量は腎、肺、皮膚の順であり、腫瘍と皮膚の比較では腫瘍群に BLM の高い分布が認められた。藤田³⁾ は B. subtilis ATCC 6633 株を用い、薄層カップ法での30分後の BLM 組織内分布は、肺、肝、皮膚の順であると報告した。

人癌のヌードマウス移植腫瘍を用いた化学療法実験は、in vivo の新しい実験法として有用であり、今後大いに発展するものと考ええる。しかし、免疫不全動物である点、腫瘍間質はマウス由来である点、化学療法剤の作用は宿主であるヌードマウスの pharmacokinetics の影響を受ける等の問題を常に念頭において、実験を進め

る必要がある。また、担癌マウスが長期間生存すること、治療による腫瘍の消失例を得るのが難しいことから、腫瘍容積、重量、組織学的効果、およびマウス重量、皮膚色調、白血球数等の副作用の面を考慮した総合的な効果判定が必要であると思われる。

頭頸部悪性腫瘍の治療には、手術療法、放射線療法および両者の併用が主流をなしている。しかし近年になり、各科領域で化学療法の理論的根拠のある投与法の確立により、多くの効果を認めるに至り、耳鼻咽喉科医も治療成績を向上させるべく、化学療法に注目するとともに、その期待も高まってきた。その一つに甲能ら¹⁷⁾ の cell kinetics を利用した投与法の開発や、新しい抗癌剤の頭頸部領域への導入、治療実験がある。しかし、直ちに患者に対して行うには制約も多く、また、結果的にみると不必要な治療となる場合もありうると思われる。

頭頸部悪性腫瘍の集学治療の一つとして、より効果的な化学療法の開発および確立は、今後我々に課せられた課題であろう。そのためには頭頸部悪性腫瘍または、この領域の大多数を占める扁平上皮癌を用いた実験、研究が是非必要と考える。頭頸部領域でのヌードマウス移植腫瘍を用いた治療実験は非常に少なく、本邦では三宅¹⁹⁾、甲能¹⁷⁾ らの報告があるのみで、いずれも一つの腫瘍に対する治療実験であり、複数の腫瘍に対し、複数の薬剤による感受性および、投与法を比較した報告は著者が初めてと思われる。同一腫瘍の供給源を保つことの出来るヌードマウス移植腫瘍は、今後の頭頸部癌の研究にとって極めて有用と考える。

V 結 語

1. 頭頸部悪性腫瘍 45例を BALB/C ヌードマウス移植し、19例で初代移植に成功した。その初代移植成功率は 42.2%であった。
2. 頭頸部癌では臨床上予後の悪いとされている下咽頭頸部食道癌、次いで上顎癌の可移植性が高く、また、上顎癌においては原発巣より、転移巣の可移植性が高かった。
3. 上咽頭癌の可移植性の向上に、マウスへの移植前照射が有効であるかもしれない。
4. 3種の異なる分化度をもつ、ヒト扁平上皮癌ヌードマウス移植腫瘍を用いて、BLM および MMC による実験的化学療法を行った。その腫瘍増殖抑制効果は、BLM は組織学的分化度に関係なく同程度の効果を示し、MMC に対しては分化度の高い腫瘍ほど感受性が高かつ

た。

5. BLM では間歇投与より、連続投与がより有効な投与法であり、BLM と MMC の併用実験では、宮本らの提唱した B-M 療法が有効な治療法である事が確められた。

6. 同一薬剤を使用しても、その投与法により効果は異なり、化学療法において、投与法の選択が極めて重要であると思われる。

7. 1匹のマウスに3腫瘍を同時移植し、BLM による1時間後の腫瘍および各臓器への分布を測定した結果、腫瘍に高い分布を示したが、各腫瘍間に有意の差はなかった。

参 考 文 献

- 1) Carter SK: Planning Combined Therapy — The Interaction of Experimental and Clinical studies. Cancer Chemotherapy Reports Part 2, 4: 3-11, 1974.
- 2) Flanagan SP: "Nude" a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. Genet Res Camb 8: 295-309, 1966.
- 3) 藤田 浩: プレオマイシンの吸収、分布および排泄 日癌治 4: 30-32, 1969.
- 4) 藤田昌英 田口鉄男: ヌードマウス移植ヒト消化管癌の制癌剤感受性 — とくに臨床成績との対比について — 癌と化学療法 5: 187-194, 1978.
- 5) 花谷勇治 久保田哲朗 山田好則 他: ヌードマウス可移植性ヒト胃、結腸癌5株を用いた実験的化学療法 — Battelle Columbus Laboratories Protocol の評価を中心に — 日癌治 15: 1114-1120, 1980.
- 6) 広川剛夫 本田哲朗 竹田千里 他: 頭頸部癌のヌードマウスへの移植および実験的化学療法 日耳鼻 82: 1187-1188, 1979.
- 7) Hirohashi S, Shimosato Y and Kameya T et al: Hormone dependency of a serially transplantable human breast cancer (Br-10) in nude mice. Cancer Res 37: 3184-3189, 1977.
- 8) 河村栄二 宮川 健 黒河輝久 豊田 元 他: ヌードマウスへ移植されたヒト消化器癌の可移植性向上と化学療法の検討 Jap Soc Cancer Ther 13: 689-699, 1978.
- 9) Houchens DP and Ovejera AA: The therapy of human tumors in athymic (nude) mice. In Proceedings of the Symposium on the Use of Athymic (Nude) Mice in Cancer Research. Gustav Fisher New York, Stuttgart: 267-280, 1978.
- 10) 犬山征夫 中島康夫 浅岡一之 堀内正敏 他: 頭頸部悪性腫瘍に対する Bleomycin Mitomycin の連続的併用療法 (BM療法) の効果について、耳鼻臨床 70: 721-727, 1977.
- 11) Ikeuchi S, Shimosato Y and Kameya T: Cell Kinetic Study of Human Cancers Transplanted to Nude Mice. Expl Cell Biol 48: 218-228, 1980.
- 12) Issacson JH and Cattanaach BM: Mouse News Letter 27: 31, 1962.
- 13) 亀谷 徹 林 博厚 田谷 勝 下里幸雄: 人のホルモン産生移植腫瘍数種の増殖と分化 癌の臨床 24: 275-276, 1978.
- 15) 久保田哲朗: ヌードマウス可移植性人癌を用いた実験的化学療法 — 制癌剤による腫瘍抑制効果の検討を中心に — 日外会誌 78: 1069-1080, 1977.
- 15) 久保田哲朗 下里幸雄 広川剛夫 他: BALB/C ヌードおよびヘテロマウスに可移植性の同系腫瘍を用いた実験的化学療法 癌と化学療法 6: 109-115, 1979.
- 16) 久保田哲朗 広橋説雄 下里幸雄 他: ヌードマウス可移植性ヒト乳癌 (Br-10) を用いた実験的化学・内分泌療法 癌と化学療法 7: 257-264, 1980.
- 17) 甲能直幸 犬山征夫 増野精二 他: 頭頸部癌に対する多剤併用療法 日耳鼻 84: 54-61, 1981.
- 18) 松田 明 吉岡 修 高橋克俊 他: 人癌移植ヌードマウスを用いる化学療法の研究 癌と化学療法 5: 77-86, 1979.
- 19) 三宅浩郷 藤井一省 秋田谷直 他: ヌードマウスに移植された上顎癌を用いての化学療法の研究 (第1報) 癌と化学療法 7: 41-47, 1980.
- 20) 宮本忠昭 高部吉庸 渡辺道典 他: プレオマイシンとマイトマイシンの連続的併用 (B-M) 療法による末期子宮頸癌の治療成績について 癌と化学療法 4: 273-291, 1977.
- 21) 永井完治: T細胞機能の有無による放射線治療効果の相違 東医大誌 37: 187-201, 1979.
- 22) 大沢伸昭 上山義人: ヌードマウスに移植されたヒト悪性腫瘍を用いる制癌研究について 医学のあけ

- み 96: 278-287, 1976.
- 23) 大野政一 昇 卓夫: 頭頸部癌に対するブレオマイシンとマイトマイシンの連続的併用療法の効果について 耳鼻と臨床 23: 499-504, 1977.
 - 24) 太田和雄 栗田完次 西村 稔 他: 悪性腫瘍の化学療法における多剤併用 MFC 療法 日癌治 6: 267-276, 1971.
 - 25) Pantelouris EM: Absence of Thymus in a Mouse Mutant. Nature 217: 370-371, 1968.
 - 26) Rygaard J and Povlsen CO: Heterotransplantation of a human malignant tumor to "Nude" mice. Acta Path Microbiol Scand 77: 758-760, 1969.
 - 27) Povlsen CO, Jacobsen GK and Rygaard J: The mouse mutant nude as a model for testing of anticancer agents. The Laboratory Animal in Drug Testing. ed. by Spiegel, A Gustav Fisher Verlag, Stuttgart, 63-72, 1973.
 - 28) 沢木修二 大石公直: ノードマウスへの上咽頭癌組織の移植実験 日耳鼻 10: 1183, 1976.
 - 29) 下里幸雄 永井完治 久保田哲朗 他: 可移植性ヒト癌に対する各種治療実験の試み 癌の臨床 22: 699-706, 1976.
 - 30) Shimosato Y, Oboshi S and Baba K: Histological Evaluation of Effects of Radiotherapy and Chemotherapy for carcinomas. Jap J Clin Oncol: 19-35, 1971.
 - 31) 下里幸雄: ノードマウス, その癌研究への応用 蛋白質・核酸・酵素 23: 719-732, 1978.
 - 32) 高部吉庸 渡辺道典 宮本忠昭 他: ブレオマイシンのエールリッヒ腹水腫瘍細胞に対する致死効果およびその最適投与方法の提案 癌と化学療法 3: 137-144, 1976.
 - 33) Taketa C, Shimosato Y and Nagano A et al: Effects of Bleomycin for Epidermoid Carcinoma of Head and Neck. Jap J Clin Oncol 1: 41-53, 1971.
 - 34) 谷 忠憲: 制がん剤感受性試験に関する実験的ならびに臨床的研究 日外会誌 81: 594-607, 1980.
 - 35) 玉置憲一: 先天性無胸腺動物 癌と化学療法 8: 1480-1492, 1981.
 - 36) 竹中正治 谷田 秀 宗像雅丈 他: 扁平上皮癌細胞におよぼす制癌剤の影響についての細胞学的研究 日本臨床細胞学会雑誌 10: 31-36, 1971.
 - 37) 梅沢浜夫: ブレオマイシンに関する研究 日本医師会雑誌 62: 144-153, 1969.
 - 38) Umezawa H, Takeuchi T and Hori S et al: Studies on the mechanism of antitumor effect of bleomycin on squamous cell carcinoma. The Journal of Antibiotics 15: 409-420, 1972.
 - 39) 吉村真一 玉置憲一 上山義人 他: ノードマウス移植ヒト腫瘍による血清蛋白質の産生 医学のあゆみ 105: 620-622, 1978.
 - 40) Watanabe S, Shimosato Y and Kameya T et al: Leukemic Distribution of a human Acute Lymphocytic Leukemia Cell Line (Ichikawa Strain) in Nude Mice Conditioned with Whole-Body Irradiation. Cancer Res 38: 3494-3498, 1978.
 - 41) Watanabe S, Shimosato Y and Kuroki M et al: Transplantability of human Lymphoid Cell Line, Lymphoma, and Leukemia in Splenectomized and/or Irradiated Nude Mice. Cancer Res 40: 2588-2595, 1980.

稿を終えるにあたり、ご指導、ご校閲下さいました東京医科大学耳鼻咽喉科、竹田千里教授に深謝致します。直接ご指導をいただいた国立がんセンター研究所、下里幸雄病理部長ならびに、亀谷徹第3組織病理室長に心より感謝の意を表します。また、実験施設をお貸しいただいた東京医科大学外科、早田義博教授および終始ご助言をいただいた、雨宮隆太講師、永井完治講師、慶応大学外科、久保田哲朗博士に感謝の意を表すとともに、教職員ならびに国立がんセンター病理部の諸兄のご協力に感謝致します。

本研究の一部は厚生省がん研究費および東医大がん研究費によった。

なお、本論文の要旨は第80回日本耳鼻咽喉科学会総会第27回癌治療学会総会、および第4回頭頸部腫瘍学会において発表した。

(原稿受付 昭和 57. 9. 8日)

別刷請求先 〒160 東京都新宿区西新宿 6-7-1

東京医科大学耳鼻咽喉科学教室 広川剛夫