シスプラチンマイクロカプセル微小血管化学塞栓療法

秋田大学医学部耳鼻咽喉科学教室（主任：戸川 清教授）

岡本 美孝, 今野 昭義, 西平 茂樹, 花沢 秀,
寺田 修久, 波田野 洋一, 戸川 清

CHEMOEMBOLIZATION WITH CISPLATIN-MICROCAPSULE

YOSHITAKA OKAMOTO, M. D., AKIYOSHI KONNO, M. D.,
SHIGEKI NISHIHARA, M. D., SHIGERU HANAZAWA, M. D.,
NOBUHISA TERADA, M. D., YOICHI HATANO, M. D.
and KIYOSHI TOGAWA, M. D.

Department of Otorhinolaryngology, Akita University School of Medicine, Akita

Cisplatin (CDDP) was microcapsulated with ethylcellulose. These CDDP-microcapsules (CDDP-m. c.) were prepared based on the principles of coacervation, with modification.

Sustained release of CDDP from the microcapsule, especially non-protein-bound CDDP which has antitumor activity, was clearly demonstrated by an invitro test.

By a bioassay method, it was proved that biological activity of CDDP was not affected by the micro-encapsulation process here employed.

When CDDP-m. c. were infused into the maxillary artery of patients with carcinoma of maxillary sinus or oral cavity, CDDP level in the circulating blood was significantly lower than those of patients administered non-encapsulated CDDP intravenously. However, significantly high CDDP concentration in tumor tissue was found in the patients treated with CDDP-m. c.

These results suggest that selective arterial infusion of CDDP-m. c. could exerts an intensive topical antitumor effects through microinfarction effect and prolonged drug release with decreased systemic side effect.

Key words: シスプラチン, マイクロカプセル化, 化学塞栓療法A88—0477—00355

はじめに

本年、市販となったシスプラチンは、最も強力な制癌剤の一つとされ、すでに睾丸、卵巣癌に対して単独でも20%前後の完全効果も報告されている¹⁾。他方、頭頸部腫瘍に対してもその有効性が続々と報告され²⁾³⁾⁴⁾、近年最も注目される制癌剤となっている。しかし、その副作用も強く、腎臓、骨髄、消化管、リンパ系組織、聴覚などに対する障害が認められており、特に腎障害は著明で

ある。

元来、癌細胞に特異的親和性を有する制癌剤は開発されておらず、このシスプラチンも同様であり、このことが副作用発現の原因に他ならない。癌に対する選択毒性が制癌剤にない以上、より有効な効果を期待するならばその投与形態、投与方法を工夫する他ない。しかし、単なる選択的動脈内注入では、循環血液中への薬剤の流出が早く、癌病巣へ高濃度に薬剤を作用させることは困難である。

秋田大学医学部耳鼻咽喉科教室開講10周年記念論文

加藤らによって開発されたマイクロカプセルは、主に

マイトマイシンマイクロカプセルとして泌尿器科領域で有効性を示しており、抗癌剤含有マイクロカプセルの癌支配動脈注入により生ずる癌組織の微小動脈塞栓と徐放性抗癌剤による持続的局所化学療法との効果を期待した選択的癌治療法である⁵⁾⁶⁾。

今回、我々はシスプラチン（以下 CDDP と略称）に注目し、シスプラチンマイクロカプセルとして基礎的および、臨床的研究を進めているので報告する。

方 法

I シスプラチン (CDDP) の L 細胞に及ぼす影響について

マウスの線維芽細胞由来の L 細胞を 10%ウシ血清加 MEM (日水) を用い、37°C で培養した。小角瓶 (15×15×35mm)、あるいはガラス培養瓶 (65×45×120mm) を目的に応じて使用した。

1. L 細胞の増殖曲線

EDTA-Trypsin で処理した細胞を、 5×10^4 /tube になるよう 10%ウシ血清加 MEM で、37°C、24時間培養したあと、CDDP をそれぞれ、0.05, 1.0, 5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるよう調整した 10%ウシ血清加 MEM を加えて、再び 37°C で培養を続けた。medium 交換後 24時間毎に、CDDP 各濃度および対照群からそれぞれ 3 本の試験管をサンプリングして trypsinize し、トリパンブルーで染色してから生細胞数を数え、各群の平均を求めて増殖曲線を作った。

2. 蛋白結合型 CDDP の L 細胞に及ぼす影響

ヒト血清に CDDP を 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように加え、24時間、37°C にてインキュベート後、 $1 \times 10^4/\text{ml}$ の L 細胞に CDDP 濃度が 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるようにこの血清混合 CDDP を加えて、37°C で培養を行い同様に増殖曲線を作製した。

3. DNA への CDDP 結合量について

$5 \times 10^4/\text{ml}$ に調整した L 細胞に、CDDP を 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように加えて 37°C、72時間 培養後、Schneider 法⁷⁾ により DNA を抽出し、凍結乾燥にて濃縮後その中の CDDP 量を測定した。また、72時間後 medium を交換してさらに CDDP 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を加え、48時間培養したものについても DNA を抽出し、CDDP 濃度を測定した。DNA 定量は Burton 法によった⁸⁾。

II シスプラチンマイクロカプセル

CDDP をエチルセルロースで被膜化した CDDP マイクロカプセル (CDDP-m.c.) を coacervation の現象を

図 1 シスプラチンマイクロカプセル (CDDP-m. c.) — は 100 μm .

利用した相分離法で、マイトマイシンマイクロカプセルと同様に作製した⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾。本カプセルは芯物質を CDDP (60%)、膜物質をエチルセルロース (40%) とする平均 $396 \pm 119 \mu\text{m}$ のマイクロカプセルであり (図 1)、以下、マイクロカプセル量は、CDDP 含有量で表示した。

1. 徐放性の検討

CDDP-m.c. 1 mg をミリポアの容器 (Milipore Corporation SX00013000) に入れ、ヒト血清を 2.5ml/10min にて流し、フィルターを通して流出してくる血清を一定時間毎に10分間集め、その中の CDDP 量を測定した。

2. 生物学的力価の検討

マイクロカプセル化による CDDP の力価の変動を、以下の 2 通りの方法にて検討した。なお、実験にあたっては、CDDP-m.c. を生食に入れ、溶出した CDDP を用いて、通常の点滴用 CDDP と比較した。

a) *Bacillus subtilis* を用いて Rec assay を行った。すなわち、Rec⁺ 株の *B. subtilis*, H-17、および Rec⁻ 株の *B. subtilis*, M-45 を用いて、常法に従って¹²⁾、両菌株を Rec 用寒天板に V 字型に画線接種し、その頂点に当たる位置に、薬剤で浸した濾紙ディスクを貼り、菌の発育阻止の状況を観察した。

b) CDDP の *Pseudomonas aeruginosa* に対する作用をブイヨン培養における影響にて検討した。CDDP を各濃度に含んだ普通ブイヨンを中型試験管 (18×180 mm) に用意し、これに *P. aeruginosa* (ATCC) を普通ブイヨン中で 37°C 8時間培養したサスペンションを 0.1ml ずつ接種して 37°C の温水の中で振盪培養し、一定時間毎に各試験管の濁度を日立 101 型分光光度計 (600nm を使用) で測定して、各濃度毎 3 本の平均を求めて菌の増殖カーブを作った。

Ⅲ CDDP-m.c. の臨床応用

当科入院の上顎癌および口内癌の患者を対象とした。セルジンガー法により股動脈から経皮的に患側外頸動脈にカテーテルを挿入し、頸動脈あるいはその 1 cm 中樞端より、生食に浮遊した CDDP-m.c.・60mg (20mg/20ml 生食) を注入した。なお、注入時、浅側頭動脈を圧迫してカプセルの同動脈への流入を阻止した。投与後継続的に肘静脈より末梢血を採取し、血中 CDDP 濃度を測定した。また、投与後の尿中への CDDP 排泄量も測定した。一部の症例 (上顎癌患者 5 名) では、投与後 1 時間、3 日、7 日後に癌組織を約 200mg 採取し、メノウ乳パチにて磨細後 Triton X-100 溶液で希釈し、組織中 CDDP 量を測定した。

対照として、同じく当科入院中の上顎癌の患者に、点滴用 CDDP 60mg を 24 時間持続点滴投与し、同様に血中、尿中の CDDP 濃度を測定した。

対照群、CDDP-m.c. 群とも、投与前日 2000ml、投与日 4000ml、投与翌日 3000ml の補液投与を行い、その後は 1000ml の補液を 1 週間継続した。

CDDP 濃度は、白金量として原子吸光分析法により、

図 2 各種 CDDP 濃度と L 細胞の増殖カーブ

Perkin-Elmer 403 型 atomic absorption spectrophotometer および HGA-2100 flameless graphic atomizer を使用して、drying: 150°C, 60 秒, carrying: 1500°C (ただし、組織の場合は 1900°C), 60 秒, atomization: 2700°C, 15 秒の条件で試料 20 μ l にて測定した。また非蛋白結合型 CDDP は血清をアミコン社 CF50A フィルターで加圧 (200g, 10 分) して限外濾過を行い、濾液から原子吸光法にて測定した。

結 果

1. CDDP 存在下での L 細胞の増殖

図 3 血清と十分混合した CDDP を添加した場合の L 細胞の増殖カーブ

図 4 CDDP の L 細胞の DNA への結合量

図2に、CDDP濃度と細胞数の変化を示す。CDDP $1\mu\text{g}/\text{ml}$ の存在下では、96時間たっても細胞の増殖は少なく、生細胞数は、一定数を保ち、 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ では48時間後より減少をみせ、96時間後では初めの $1/10$ 以下になる。

次に、CDDPを前もってヒト血清と十分反応させ、結合型CDDPとして培養細胞に添加しても、CDDPの増殖抑制作用は認められない(図3)。

CDDPのDNAへの結合量をみると、投与量、投与時間と共に増加していく(図4)。

2. シスプラチンマイクロカプセル

図5に示すように、フィルターを通過した血清中のCDDPは、蛋白結合型、非結合型ともに徐放性を示す。ただし、6時間目までのCDDP流出は早い。

Rec assayの結果を図6に示す。CDDPはRec⁺株よりもRec⁻株を強く阻止している。その阻止の様子は、点滴用CDDPとCDDP-m.c.に差は認めない。

CDDP存在下での*P. aeruginosa*の増殖カーブを図7に示す。CDDPは $1\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度では増殖を阻止するが、点滴用CDDPおよびCDDP-m.c.はそのカーブに差は認めない。

3. 臨床応用

CDDP-m.c. 60mgを投与した症例の血清中のCDDP濃度を図8に示す。投与後2~3日でピーク(400~900 ng PT/ml)に達し、以後漸減していく。非蛋白結合型

図6 Rec assay

図5 CDDP-m. c. の徐放性の検討

図 7 CDDP 存在下での *P. aeruginosa* の増殖カーブ

図 8 CDDP-m.c. 投与後の血清中の CDDP 濃度の推移、非蛋白結合型 CDDP は検出されなかった。

CDDP は検出されなかった。

同じく CDDP-m.c. を投与した上顎癌患者 5 名の癌組

図 9 CDDP-m.c. 投与後の癌組織中の CDDP 濃度

織中の CDDP 量を図 9 に示す。投与直後より 3 日目の方が高く 25~100 µg PT/wet gram を示す。

点滴用 CDDP 60mg を 24 時間投与した症例の血清中の CDDP 濃度を図 10 に示す。投与終了後にピークを作り、以後漸減していく。非蛋白結合型は投与後 2 時間で

図 10 CDDP 24時間点滴投与後の血清中の CDDP 濃度の推移。点線は非蛋白結合型シスプラチン

検出されなくなった。

尿中への排泄量は、CDDP-m.c. を投与した症例では、投与後 24時間で 6~12.5%で 平均 6.8%，1週間では 22~25.5%で 平均 23.5%，CDDP 点滴投与群では投与開始後 24時間で 15~23%で 平均 19%，1週間では 26~48%で 平均 39%であった。

考 察

シスプラチン（化学名 Cis-dichlorodiamine platinum (II)，略称 CDDP）は、中心に白金原子を持ち、2つの塩素と2つのアンモニアがシス位に配置された水溶性の化合物である。

1965年、Rosenberg が白金電極を用いた溶液の中で、大腸菌が分裂能を失い、長いフィラメント形成を起こしたのを観察したことから白金の抗菌作用、ついで抗腫瘍作用が明らかにされ、各種白金化合物の抗腫瘍効果が検討され、この CDDP が著効を示すことが見出された。

その後 CDDP の臨床応用が開始され、睾丸、卵巣腫瘍に対して著しい制癌効果が認められ¹⁾、本邦でもこの

3月薬価も決まり一般に市販されるようになった。一方、頭頸部癌の領域でも多くの有効例が報告されている²⁾³⁾⁴⁾。しかし、その副作用も従来の制癌剤に比して多く、特に腎障害、消化管症状、聴覚障害が問題となる。

当教室でも、約3年前より CDDP を進行頭頸部癌患者に試験的に用いており、60~80mg/body を24時間持続して点滴投与し、著効例も経験している。

さて、原子吸光分析法を用いて、その場合の CDDP の体内動態を検討してみると、図 10 に示すように、点滴投与終了後一旦血中 CDDP 濃度は上昇しピークを生じ以後漸減していくが、血中には長期に高濃度に残存することがわかる。

ところで、CDDP は生体に投与されると、早期に血中のアルブミン、 γ -グロブリン、組織内の蛋白等と結合を生じ、蛋白結合型 CDDP を形成する。血清を限外濾過によって得られる非蛋白結合型 CDDP は、投与終了後2時間にては検出されなくなり（図 10）、血中に長期に検出される CDDP は結合型 CDDP と考えられる。

一方、L細胞を用いた *in vitro* の実験では、図3に示すように蛋白結合型 CDDP に細胞障害は認められない。一旦蛋白と結合した CDDP に解離が容易に生ずるとは考えられず、図 10 に示すような高濃度に長期に残存する蛋白結合型 CDDP に制癌効果は期待されない。

他方、CDDP の作用機序は DNA 合成阻害にあるとされているが、細胞の DNA と結合する CDDP は投与量、投与時間と共に増加していくことは明らかである（図4）。

以上のことは、点滴投与後、高濃度かつ長期に存在する蛋白結合型 CDDP に制癌効果は期待されないこと、逆に、その濃度を下げることが副作用の軽減に役立つことを示唆する。事実、CDDP 投与後12時間、24時間目の血中 CDDP 濃度が腎障害と相関するという報告もある¹⁵⁾。このことから、非蛋白結合型が少量ずつ長期に癌組織に投与されることが CDDP の理想的な投与法に近いと考えられる。

そこで、我々は CDDP 含有のマイクロカプセル塞栓法に注目した。すなわち、当大学泌尿器科の加藤らによって開発されたマイクロカプセルは、主にマイトマイシン含有マイクロカプセルとして泌尿器科領域で有効性を示しており⁵⁾⁶⁾、抗癌剤含有マイクロカプセルの癌支配動脈注入により生ずる癌組織の微小動脈塞栓と徐放性抗癌剤による持続的局所化学療法効果を期待した選択的癌治療法である。我々は、前述の理由で CDDP のマ

図 11 症例 1. 67歳男性, 右白後部扁平上皮癌, CDDP-m.c. 40mg 投与前(上)と投与後3週目(下)の腫瘍の変化を示す。

図 12 症例 2. 60歳女性, 右上顎扁平上皮癌, CDDP-m.c. 60mg 投与前(左)と投与後3週目(右)のCT像の変化を示す。

マイクロカプセル化が一つの CDDP の理想的投与法に近づくのではないかと考え種々の検討を行った。

CDDP 結晶をエチルセルロースで被膜化した CDDP マイクロカプセル (CDDP-m.c.) をマイトマイシンマイクロカプセルと同様に, coacervation の現象を利用した相分離法にて当大学薬剤部にて作製した (図 1)。これを血清にさらすと, 血清がカプセル内に浸透して CDDP を溶解し, ついで高濃度の CDDP 溶液がカプセル外へ濃度勾配によって溶出していく (図 5)。制癌効果の確認されている非蛋白結合型 CDDP の徐放性も明らかである。ただ, この実験では, フィルター通過後試料中の CDDP 測定まで 10分以上必要とするため, その間に非蛋白結合型 CDDP のうちには血清蛋白と結合するものもあり, 実際にはこの数値以上に非蛋白結合型は高く, 蛋白結合型は低いものと思われる。

次に, CDDP は光, 熱, pH 等の変動により分解を受

けやすく¹⁶⁾, マイクロカプセル化の工程での生物学的力価の低下が懸念される。CDDP の作用機序は, DNA 鎖に結合し架橋を形成することによる細胞致死作用と考えられており¹⁴⁾, 図 6 に示した Rec assay の成績でも Rec⁺ 株でなく, Rec⁻ 株を強く阻止している。一方, CDDP-m.c. も通常の CDDP と同様の阻止の強さを示している。また, *Pseudomonas aeruginosa* の増殖カーブをみると, その増殖阻止のパターンはマイクロカプセル化によっても変動を認めず, これらの成績は, CDDP のマイクロカプセル化による生物学的力価の変動が小さいことを示している。

以上の基礎的研究をもとに, 当科入院中の上顎癌, 口内癌の患者に対して臨床応用を試みた。その投与後の血中 CDDP 濃度をみると (図 8), そのピークは 2~3 日後にあり, その値も 400~900ng PT/ml と同量を 24 時間点滴投与した場合 (1800~2000ng PT/ml) の 1/2~1/5 であり, これはカプセルからの CDDP の徐放性流出によると思われる。

次に, 上顎癌患者の癌組織中の CDDP 濃度をみると (図 9) そのピークは 20~100μg PT/wet gram である。Mattox¹⁷⁾ は, 100mg/m² の CDDP を 10 分で静注後, 口内癌患者では 2 時間後に癌組織中の CDDP 濃度は 1 μg PT/wet gram で以後減少し, 下咽頭癌では 6 時間後に 6.4 μg PT/wet gram で以後減少すると報告しているが, それに比べて, マイクロカプセル投与後の値は非常に高い。

このように, CDDP-m.c. を選択的動脈内注人を行うことで, 持続的かつ選択的に癌病巣を攻撃することが可

能となり、CDDP の治療効果は増強し、同時に CDDP の全身副作用は軽減すると期待される。すなわち、単なる通常 CDDP の選択的動脈内注入法では循環血液中への薬剤の流出が速く、癌病巣へ高濃度に薬剤を作用させることが困難であるが、CDDP をカプセル化することにより、カプセル自体の腫瘍栄養血管の閉塞効果と、CDDP の徐放効果により、CDDP の循環血液中への流出を抑え、癌病巣周囲に薬剤を長時間にわたり放出することができるわけである。

次に、初回治療として CDDP-m.c. を単独に動注投与した症例を示す。症例 1 は 67 歳の男性で臼後部の扁平上皮癌であるが、CDDP-m.c. 40mg 投与前と投与後 3 週目の腫瘍を示す。著しい縮小を示す (図 11)。症例 2 は 60 歳の女性で上顎の扁平上皮癌であるが、CDDP-m.c. 60mg 投与前と投与後 3 週目の CT を示す。著明な腫瘍の縮小を示す (図 12)。

副作用として、18 症例中嘔気・嘔吐は 7 例にみられたが、PSP テスト、あるいはクレアチニン・クレアランステストによる腎機能低下は 1 例も認められなかった。また、患側頬部痛は 12 例が訴えたが、多くは鎮痛剤投与にて自制可能であり、24 時間以内に消失した。

当教室でこれまで CDDP-m.c. を投与した症例の多くは、放射線やその他の治療施行後、あるいは併用中の患者であり、CDDP-m.c. の治療効果を客観的に評価することは現在のところ尚早である。さらに、現在の CDDP-m.c. は 400 μ と大きいこと、図 5 に示すように 6 時間までの CDDP の流出が早いことなど、改良の余地が大きく残っている。しかし、当教室では例えば上顎癌に限れば、これまで、6000rad の大量の術前照射と徹底的な根治手術、その後の再建手術により 70% を超える高い 5 年生存率を得ている¹⁸⁾。

しかし、今後この成績をさらに向上させるにはより有効な化学療法の出現が必須である。さらに、6000rad という大量の照射により、患者は眼鏡の有無によらず、患側の視力は失うことになる。CDDP-m.c. 投与によりこの照射量が減量出来れば視力の保持も夢ではなく、その上、手術不能な高齢者、進行癌に対しても有効な治療法となる期待もある。今後、さらに臨床応用、カプセル改良に努めていきたい。

結 語

シスプラチンを、エチルセルローズで被膜化したシスプラチンマイクロカプセルについて、基礎的、および臨

床的検討を行った。シスプラチンのマイクロカプセル化は、シスプラチンの循環血液中への放出を抑え、癌巣周囲に長時間、高濃度に放出すると考えられ、有効な投与方法として期待される。

参 考 文 献

- 1) Merrin C: A new method to prevent toxicity with high doses of Cis-diamine Platinum. *Roc Amer Soc Clin Oncol* 17: 243-243, 1976.
- 2) Hill JM, Loed E et al: Clinical studies of platinum coordination compounds in the treatment of various malignant diseases. *Cancer Chemother Rep* 59: 647-659, 1975.
- 3) Wittes RE, Cvitkovic E et al: Cis-dichloro-diamineplatinum (II) in the treatment of epidermoid carcinoma of the head and neck. *Cancer Treat Rep* 61: 359-366, 1977.
- 4) Muggia FM, Rozenzweig M et al: Role of chemotherapy in head and neck cancer: Systemic use of single agents and combination in advanced disease. *Head and Neck Sug* 2: 196-205, 1980.
- 5) Kato T, Nemoto R et al: Microencapsulated mitomycin C therapy in renal cell carcinoma. *Lancet* 2: 479-480, 1979.
- 6) 加藤哲郎 根本良介: 泌尿器悪性腫瘍の化学塞栓療法に関する臨床的研究 日泌尿会誌 71: 157-170, 1980.
- 7) 山川民夫 他: 医化学実験法講座第 1 巻 A-生体構成成分 I: 55-57 中山書店 1972.
- 8) Burton K: A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem J* 62: 315-321, 1956.
- 9) Kato T and Nemoto R: Microencapsulation of mitomycin C for intra-arterial infusion chemotherapy. *Proc Japan Academy* 54: 413-417, 1978.
- 10) 加藤哲郎 根本良介 他: マイクロカプセル化抗癌剤の研究, I. マイクロカプセル化マイトマイシンの試作とその特性 日癌治誌 14: 152-156, 1979.
- 11) 海野勝男 後藤昭雄 他: 制癌剤マイクロカプセルの製法とその浴出 病院薬学 6: 244-250, 1980.
- 12) Sadaie Y and Kada T: Recombination-deficient mutants of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriology* 125:

- 489-500, 1976.
- 13) Gullo JJ, Litterst CL et al: Pharmacokinetics and protein binding of Cis-dichloro diamine platinum (II) administered as a one hour or as a twenty hour infusion. *Cancer Chemother Phamacol* 5: 21-26, 1980.
- 14) Zwelling LA and Kohn KW: Mechanism of action of cis-Dichlorodiamine platinum (II). *Cancer Treat Rep* 63: 1439-1444, 1979.
- 15) Campbell B, Kalman S et al: Cisplatin nephrotoxicity: relationship to serum levels and pretreatment creatinine. *Proc AACR and ASLO* 22: 354-354, 1981.
- 16) 薬事研究会: シスプラチン 月刊薬草 16: 309-312, 1984.
- 17) Mattox DF and Sternson LA: Tumor concentration of platinum in patients with head and neck cancer. *Otolaryngeal Head Neck Surg* 91: 271-275, 1983.
- 18) Konno A, Togawa K et al: Analysis of the results of our combined therapy for maxillary cancer. *Acta Laryngol Sup* 372: 1-16, 1980.

稿を終わるにあたり、終始適切な御助言をいただいた本学泌尿器科の加藤哲郎助教授に深謝致します。実験の御指導、お手伝いをしていただいた本学機器センターの天野保二助教授、同柴田淑子技官に心から感謝致します。また、薬剤の作製と供与をしていただいた本学付属病院薬剤部の後藤昭雄先生、並びに動脈カテーテル法に対して全面的に協力していただいた本学放射線科の玉川芳春助教授はじめ教室員の方々に深謝致します。なお、本論文の要旨は第18回頭頸部腫瘍学会にて口演した。

(原稿受付 昭和 59. 9. 21日)

別刷請求先 〒010 秋田市本道 1-1-1

秋田大学医学部耳鼻咽喉科学教室 岡本 美孝