

培養絨毛癌細胞に対する Methotrexate, Actinomycin-D の 抗腫瘍効果に関する研究

旭川医科大学産婦人科学教室 (主任：清水哲也教授)

林 博 章

Analysis of Cytotoxicity in Cultured Choriocarcinoma Cell Lines Using Methotrexate and Actinomycin-D

Hiroaki HAYASHI

Department of Obstetrics and Gynecology, Asahikawa Medical College, Asahikawa

(Director : Prof. Tetsuya Shimizu)

概要 本研究は、培養絨毛癌細胞株を実験モデルとして化学療法剤の主軸である MTX, および Act-D の絨毛癌細胞におよぼす影響を観察するとともに、化学療法上重大な問題となつている MTX 耐性機序の解明を試みた。また Citrovorum factor (CF) の併用による MTX 大量療法に関して細胞レベルでの検討を行なつた。

1. 著者の作製した MTX 耐性細胞は、MTX による細胞増殖抑制効果からみると、原株に比べ50～100倍の耐性を獲得しており、³H-MTX の細胞内への取り込みは原株の約2/3と低値であつた。

2. MTX は 10^{-9} — 10^{-4} M, Act-D は 10^{-10} — 10^{-7} M の添加濃度に dose dependent な細胞増殖抑制効果が観察され、Act-D の致命的細胞障害は、MTX の約 10^{-3} で得られた。

3. MTX 大量療法に用いられる CF は主に造血臓器の保護を目的として使用されているが、この CF が絨毛癌細胞に対してどのように作用しているかを検討すると、MTX 添加開始から12時間以内に CF を併用すると明らかに MTX の作用を減弱せしめ、かつ MTX 耐性細胞に対しても同様の傾向を示した。

Synopsis The cytotoxicity of methotrexate (MTX) and actinomycin-D (Act-D), and the influence of Citrovorum factor on MTX-treated were analyzed in vitro, using two choriocarcinoma cell lines (BeWo and SCH). HCG and β -HCG in medium were measured with a radioimmunoassay kit, and ³H-MTX, —thymidine, and —Uridine with a liquid scintillation counter. The following results were obtained.

1. The MTX resistant cell of BeWo, named BeWo[®], was selected by continuous exposure to increasing concentration of MTX in culture medium. The resistant cell was 50 to 100 times as resistant to MTX as the parent BeWo to the inhibition of cell growth and the development of resistance was accompanied by two-third decrease in ³H-MTX transport.

2. The cytotoxicity of MTX and Act-D were found to increase lineally with the drug dose for concentrations between 10^{-9} and 10^{-4} M, 10^{-10} and 10^{-7} M, respectively.

3. Act-D caused lethal damage in three choriocarcinoma cells (BeWo, SCH and BeWo[®]) at one-thousandths the concentration of MTX.

4. Citrovorum factor given within twelve hours following the start of methotrexate administration decreased in ³H-MTX transport and inhibited MTX-induced growth.

Key words: Methotrexate • Actinomycin-D • Citrovorum factor rescue Choriocarcinoma cell lines • MTX-resistance

緒 言

絨毛性疾患に対する Methotrexate (MTX), Actinomycin D (Act-D) による化学療法の導入¹⁸⁾²²⁾は著しい寛解率の向上をもたらした。なかでも侵入奇胎 (invasive mole) はほぼ100%の治

癒が期待されるに至つたが、絨毛癌の30—40%はなお治療に抵抗性を示している¹⁷⁾。临床上、絨毛癌の化学療法に対する反応は MTX 単独投与で寛解が得られるものから今日の多剤併用療法にも抵抗性を有する症例まで極めて多彩である。

近年、組織培養の技術の進歩により、従来困難とされていた培養絨毛癌細胞株の樹立が相次ぎ抗癌剤に対する絨毛癌の細胞学的レベルでの検討がなされている。しかし、抗癌剤に対する絨毛癌の細胞レベルでの動態は、未だ明確にされたとはいえない。

本研究は、著者の教室で維持している培養絨毛癌細胞株を実験モデルとしてMTX, Act-Dの培養絨毛癌細胞におよぼす影響を観察するとともに化学療法上、重大な問題となつていく絨毛癌のMTXに対する耐性機序の解明を試みることを目的とした。さらに、これらに対してCitrovorum factor (CF)の併用によるMTX大量療法に関して細胞レベルでの検討を行なつた。

研究方法

1. 培養絨毛癌細胞株

Hertz et al.によつて人脳転移巣より摘出されハムスター類袋に継代移植され、さらにPattillo et al.²⁰⁾によつて培養株化されたBeWo株と、大星ら⁵⁾によつて樹立された男子胃原発絨毛上皮腫のSCH株を用いた。

BeWoに対する耐性細胞は上記MTXを継代維持用の培養液(後述)にMTXを添加し持続的にMTXを細胞に接触せしめることによつて作製した。MTX 1×10^{-9} molar (M)濃度で培養を開始し、MTX 10^{-7} Mで原株と増殖速度が同等となるまで約4カ月間維持培養と同一条件下で培養を行なつた。この操作によつて得られたBeWo株は、本実験で以後BeWo®とした。

2. 培養方法

培養液は、RPMI 1640(日水製薬)に胎児牛血清(GIBCO)を10%加えたものを使用した。培養は、37°C, 5% CO₂濃度, 湿度100%のincubator(Hotpack Model 351920)内にて静置培養を行なつた。

BeWo, SCH, BeWo®はそれぞれ上記培養液で $0.5-1 \times 10^6$ 個/3mlを50ml plastic flask(Lux社製)に植え込み実験に供した。

3. 実験方法

1) 薬剤MTX(日本レダリー社), Act-D(日本メルク社), CF(Leucovorin, 日本レダリー社)を

RPMI 1640で使用直前に溶解し適当濃度に希釈した。MTX; 10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} M, Act-D; 10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} M, CF; 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} Mに調節した。培養開始4日目より上記濃度をそれぞれ24時間添加し以下実験に供した。薬剤添加日をDay 0とし、以下Day 1から薬剤非添加培養液で24時間ごとに交換した。

2) 薬剤の絨毛癌細胞におよぼす影響

細胞増殖抑制効果は、細胞数により観察した。RPMI 1640にて1-2回洗浄後0.2% Trypsin+0.02% EDTA溶液で細胞を混和しBürker-Türk計算盤で2回以上算定した。MTX-CF添加時のMTX細胞障害に対するCFの効果はgrowth inhibition assay法を用いて検討した。CF添加方法A) MTXと同時に, B) MTX添加12時間目から, C) MTX添加24時間目から, D) MTX添加48時間目からMTX添加濃度と同等モルを24時間添加しDay 3における薬剤非添加群を対照として、その細胞数に対する比を算定しdose response curveを作製した。

3) 培養液中のhCG β -hCG産生の推移

培養液中のhCGおよび β -hCGをRadioimmunoassay法(RIA)で測定して検討した。適時採取した培養液を1,500rpm 5分間遠沈し測定はその上清を対象とし測定日まで-40°Cにて保存した。測定にあつてはduplicate sampleにて行なつた。hCGはCIS社RIA-kit(測定感度2.0-250 mIU/ml) β -hCGはCIS社RIA-kit(測定感度0.2-50ng/ml)を用いた。intra-assayおよびinter-assayの変動係数はそれぞれ8.5, 13.5%であつた。

4) ³H-MTXの細胞内取り込み

MTXに対する耐性細胞の膜透過性の変化とCFのMTXの細胞内への取り込みにおよぼす影響を検討した。³H-MTX(25Ci/mmol)はAmersham(USA)より入手した。対数増殖期にある 10^7 個の細胞に 2×10^{-10} M ³H-MTX含有培養液を添加し実験を開始し、培養後30分, 60分, 120分時に細胞を採取し, cold phosphate buffered saline(PBS)を加えて反応を停止した。cold PBSにて5回洗浄後, 1N NaOH 1mlを加え, 50°Cにて1

昼夜放置し 1N HCl 1ml を加えた細胞溶解液 1ml を液体シンチレーター (Toluen 2L, PPD 12g, POPOP 0.3g, Triton-X 1000ml) 9ml に加え放射活性を液体シンチレーションカウンター (Parrard Instrumental Model 2650) にて測定した。³H-MTX の counting efficiency は55%であった。

研究成績

1. MTX の細胞増殖におよぼす影響

1) MTX の50%有効量(median effective dose, ED₅₀)は, BeWo ; 0.25×10⁻⁶M, SCH ; 0.92×10⁻⁶M であつたが両者の増殖抑制パターンは類似した傾向を示した(図1)。MTX 10⁻⁸M 添加時の増殖抑制効果は, 非添加時と有意な差は認められなかつたが, 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵, 10⁻⁴M 添加で非添加時と比べ有意な差(p<0.001)が認められた。10⁻⁷M 添加後の増殖パターンは, Day 0 の細胞数を2~3日間維持しその後再び増殖を開始したが, 10⁻⁶, 10⁻⁵M 添加では Day 1 に約50%に細胞数を減じ Day 4 頃から漸次増殖した。10⁻⁴M 添加では細胞数は, Day 2 に50%以下となり Day 3 には細胞破壊が著しく正確な細胞数算定は困難であつた。

2) BeWo ®に対する MTX の ED₅₀は0.72×10⁻⁴M であつた。MTX 添加により dose dependent な増殖抑制効果が観察されたが, BeWo ® 10⁻⁵M 添加時の増殖抑制は原株 BeWo の10⁻⁷M 添加時のそれと類似していた(図2)。すなわち増殖抑制効果からは, 原株 BeWo に比べて約100倍の耐性が得られた。

2. Act-D の細胞増殖におよぼす影響

図1 Effect of MTX on the cell growth by BeWo and SCH

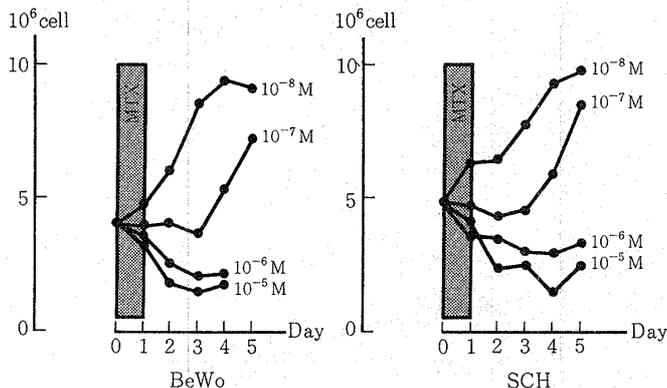


図2 Dose-response curves of the BeWo (●) and BeWo ® (○)

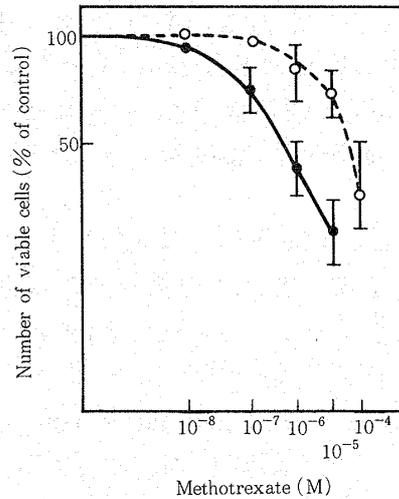
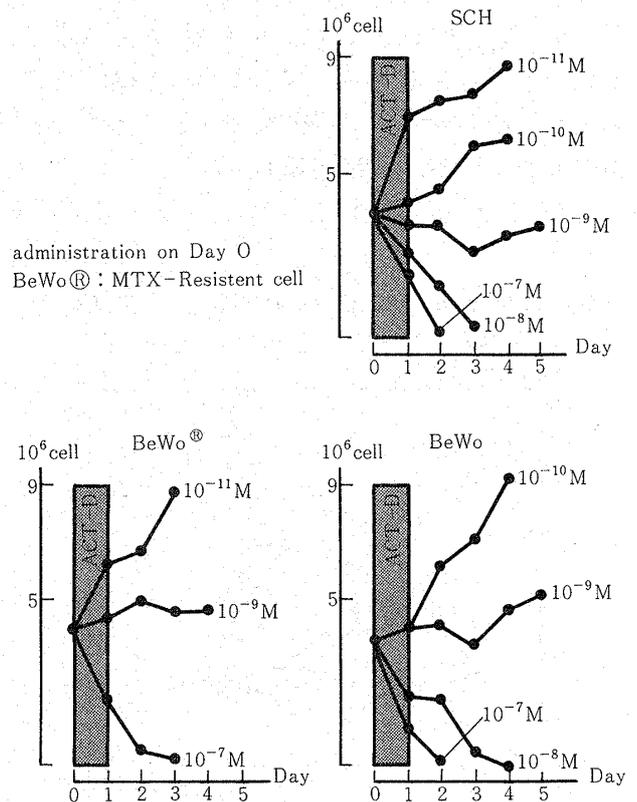


図3 Effect of ACT-D on the cell growth by BeWo, SCH, and BeWo ®



BeWo, SCH, BeWo ®に対する, Act-D の増殖抑制効果は図3に示した。Act-D; 10⁻¹¹, 10⁻¹⁰, 10⁻⁹, 10⁻⁸, 10⁻⁷M の各濃度における dose dependent な増殖抑制効果が3者(BeWo, SCH, BeWo ®)に同程度に示された。10⁻¹⁰以下の添加での増殖抑制は認められず, 10⁻⁹では一時的な増殖抑制

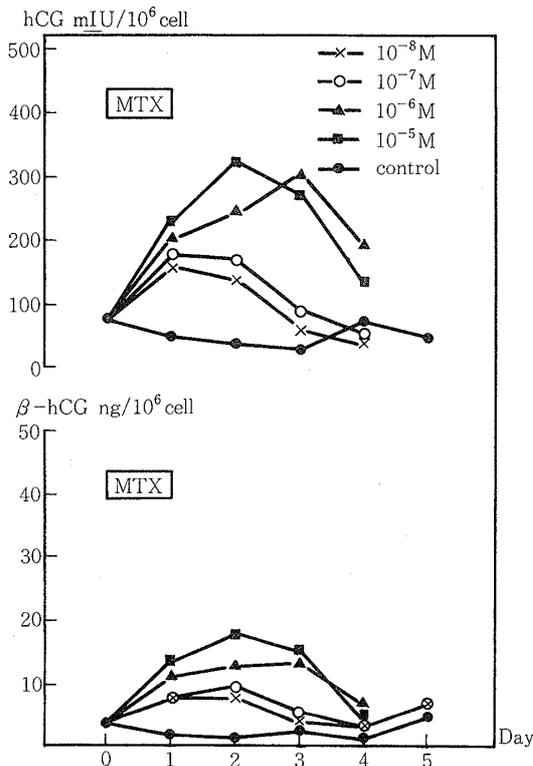
が観察され, MTX 10^{-7} M 添加時の増殖抑制に類似していた。しかし 10^{-8} M 以上の高濃度では細胞障害効果は致死的である。MTX と比べ Act-D の致死性細胞障害域は狭く 10^{-3} ~ 10^{-4} の低濃度で MTX と同程度の殺細胞効果が得られた。

3. MTX 添加時の hCG および β -hCG 産生の推移

3 者における hCG および β -hCG は, ほぼ平行した推移が観察され MTX 添加により明らかに細胞数が減少するにもかかわらず 10^6 cell 当りの培養液中の値は有意に上昇した。またこれらは MTX 添加後 2 日間は dose dependent な上昇があつた。特に 10^{-5} M 添加時 hCG ; 357 ± 55 mIU/ 10^6 cell β -hCG ; 19 ± 8 ng/ 10^6 cell と非添加時と比べ約 7 倍の値を示した。一方 10^{-5} M 添加時 SCH の hCG, β -hCG の最高値は 216 ± 43 mIU/ 10^6 cell, 15 ± 3.9 ng/ 10^6 cell で非添加時の約 4 倍の値を示した。BeWo ㊟の hCG, β -hCG 値は各濃度で若干の差が認められたが, 原株 BeWo と細胞数との関係において同様の推移が観察された。

4. Act-D 添加時の hCG および β -hCG 産生の推移

図4 Effect of MTX upon hCG and β -hCG by BeWo cell



推移

Act-D 添加時のこれらの推移は, MTX 添加時のそれらと同様の傾向であつた。hCG および β -hCG は平行した推移を示し, 添加濃度に dose dependent な上昇であつた。BeWo では hCG お

図5 Effect of ACT-D upon hCG and β -hCG by BeWo cell

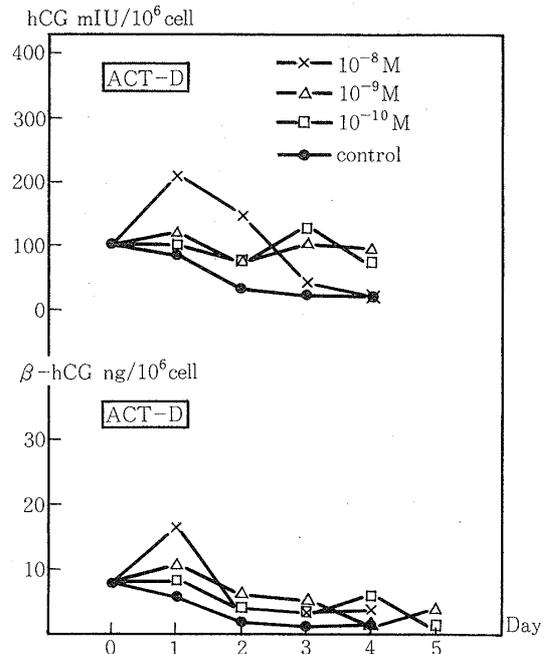


図6 Effect of ACT-D upon hCG and β -hCG by SCH cell

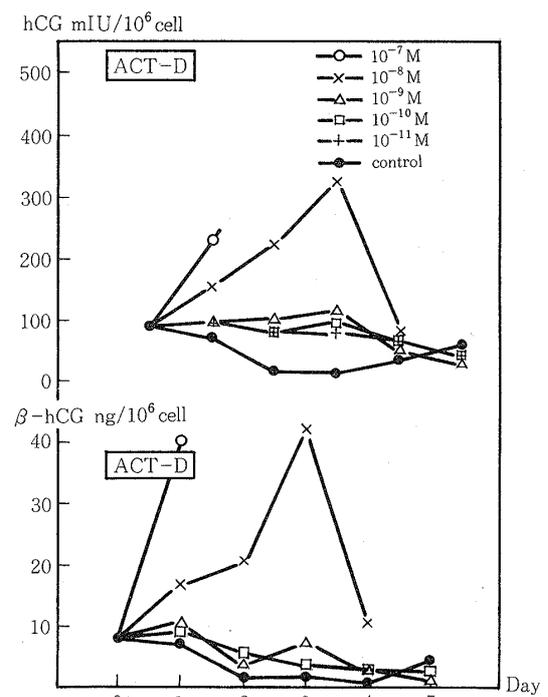
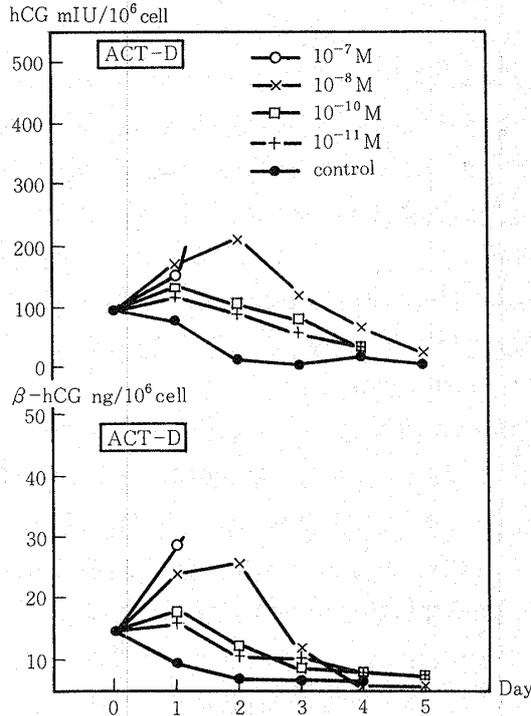


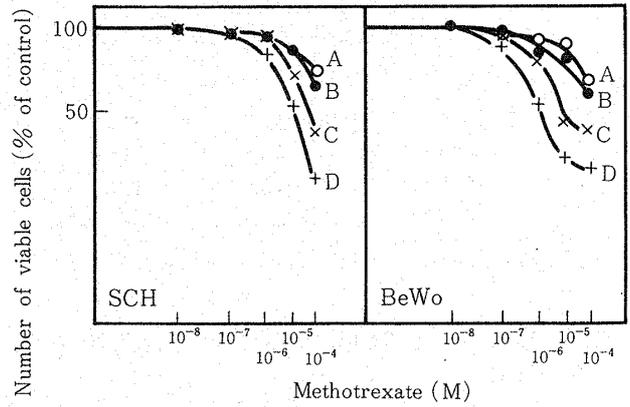
図7 Effect of ACT-D upon hCG and β -hCG by BeWo $\text{\textcircled{R}}$ cell (MTX-resistant cell)



よび β -hCG の 10^{-8} M 添加の最高値は hCG ; 207 ± 54 mIU/ 10^6 cell, β -hCG ; 17 ± 6 ng/ 10^6 cell であり非添加時に比べ 2 - 3 倍の値を示した. SCH は MTX 添加時と異なり非添加時と比べ最高値 hCG ; 345 ± 42 mIU/ 10^6 cell β -hCG ; 42 ± 11 ng/ 10^6 cell と約 10 倍の値が観察された. BeWo $\text{\textcircled{R}}$ は原株 BeWo の hCG β -hCG の推移と類似していた.

5. MTX による細胞障害および hCG, β -hCG

図8 Effect of CF on MTX-induced growth inhibition

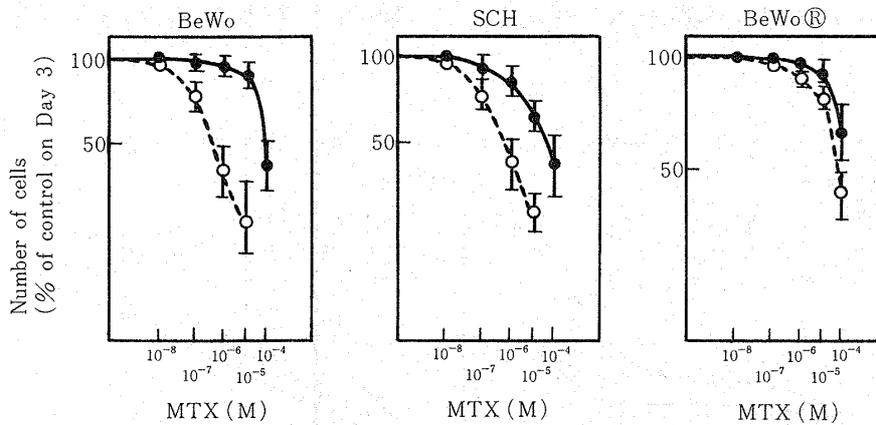


A : MTX and CF, B : CF 12hr after MTX
C : CF 24hr after MTX, D : CF 48hr after MTX

産生におよぼす CF の効果

BeWo, SCH の両株で, MTX と同等モルの CF を添加した場合, D 群は MTX 単独添加群と有意な差はなかった. A, B, C の各群の MTX 細胞障害は CF 併用により明らかに減弱した(図8). また, BeWo $\text{\textcircled{R}}$ に対して MTX と CF を同時に添加した場合も同様に MTX の細胞障害を相殺する CF の効果が観察された. hCG および β -hCG の産生は, MTX と CF の併用時と, MTX 単独添加時の両群で 10^{-7} M 以上添加した場合非添加時と比べ有意な上昇が認められたが, MTX-CF 添加時では約 4 倍であり, MTX 添加 CF 非添加時で, 約 7 倍と比べ明らかに低値であった.

図 9

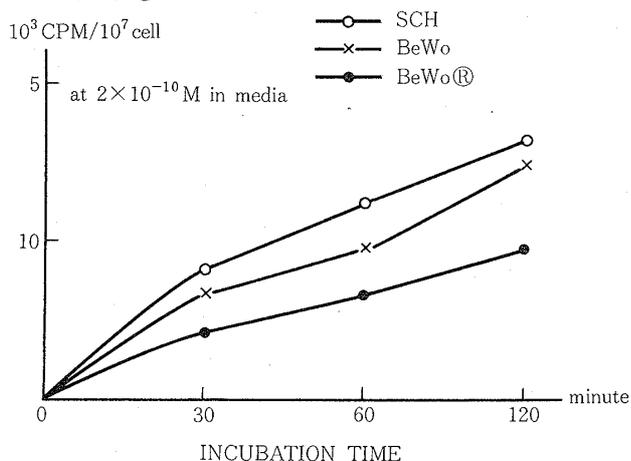


Effect of CF on MTX-induced growth inhibition to BeWo, SCH and BeWo $\text{\textcircled{R}}$
broken line : MTX alone, Solid lines : MTX+CF
vertical bars : standard deviation

表1 Effect of folic acid on the secretion of hCG and β -hCG by BeWo cell

	hCG (mU/10 ⁶ cell)	β -hCG (ng/10 ⁶ cell)
control	14.97 ± 5.83	0.27 ± 0.12
MTX+C.F. 10 ⁻⁴ M	148.10 ± 32.17	2.09 ± 0.76
10 ⁻⁵ M	55.53 ± 0.58	0.73 ± 0.06
10 ⁻⁶ M	25.04 ± 1.36	0.42 ± 0.03
10 ⁻⁷ M	24.40 ± 20.6	0.26 ± 0.10

MTX=Methotrexate, C.F.=citrovorum factor

図10 Uptake of ³H-MTX by BeWo, SCH and BeWo ®6. ³H-MTX の細胞内への取り込み

BeWo, SCH の培養30分, 60分, 120分目の ³H-MTX の細胞内への取り込みは両者で有意な差は認められなかつた。しかし BeWo ®では BeWo, SCH と比べ各時点で約2/3程度の細胞内への取り込みしか認められなかつた。CF が ³H-MTX の細胞内への取り込みにおよぼす影響をみると CF;

10⁻¹⁰, 10⁻¹¹M の両濃度で明らかに ³H-MTX の取り込みを減少させた (図11)。

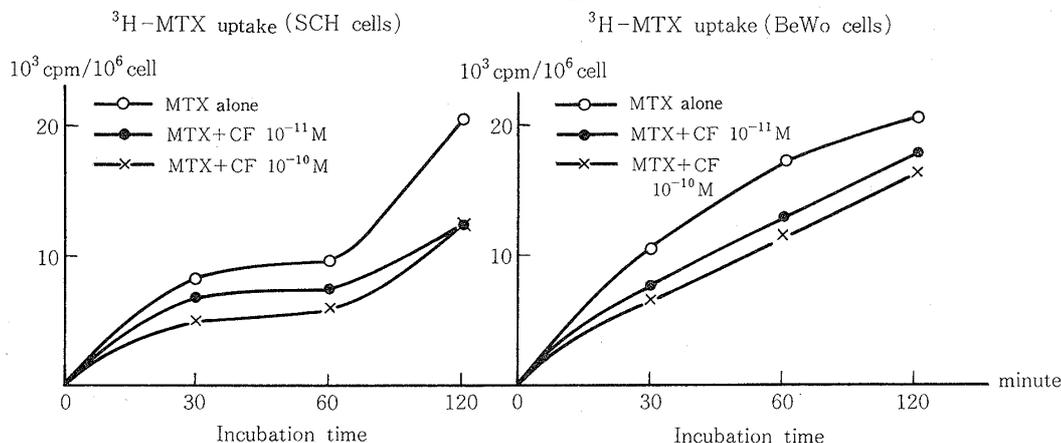
考 察

MTX 細胞障害は folic acid から tetrahydrofolate (THF) への経路を阻止し, 特に dehydrofolate (DHF) から THF への環化酵素 DHF reductase と強く結びつき DNA 合成を阻害するといわれている¹⁰⁾。この MTX に対する耐性獲得の機序は DHF reductase の量的, 質的变化や細胞膜の変化による MTX の取り込み低下と放出亢進など⁸⁾²³⁾が推定されている。

著者は, MTX 耐性絨毛癌に対する合理的化学療法確立の一環として細胞学的な面からの検討を行なうため MTX 耐性絨毛癌細胞の樹立を試みた。著者の作製した MTX 耐性絨毛癌細胞は MTX 無添加培養液で継代維持していないため不可逆的 mutant としてはとらえられないが現時点では, MTX による細胞増殖抑制からみると, 原株に比べ約100倍の耐性を獲得している。また ³H-MTX の細胞内への取り込みは原株の約2/3と低値であつた。

MTX の常用量15—20mg/day 投与で血中濃度は投与後, 約7時間は10⁻⁸—10⁻⁶M 維持されるので³⁾, この濃度における MTX 耐性獲得の可能性を検討した。同等モルを24時間培養絨毛癌細胞 (BeWo, SCH) に添加したが, 10⁻⁶M 添加時においても完全な死滅は得られず一時的な増殖抑制しか示さないことが示された。MTX による細胞増殖抑制の程度を左右する因子として添加時間によ

図 11



る差は少なく、濃度による差すなわち添加3日目を最低とするMTXのdose dependentな抑制効果²⁾が認められ、このことはMTX 15—20mg/day投与では耐性獲得の可能性のあることを示唆している。

Act-DはDNAのguanineと結合して複合体を形成し、そのためDNA依存性RNA polymerase作用を阻害し、RNA合成が抑制されるとされている¹⁰⁾。Act-Dによる今回のin vitroでの致死的細胞障害効果はMTXに比べ約 10^{-4} の低濃度でえられており、 10^{-8} M以上の血中濃度が維持されれば高い有効性が期待できると思われた。また今回、観察されたAct-Dの細胞障害作用は、MTX耐性細胞に対しても耐性のない絨毛癌細胞と同程度の効果を示している。臨床的にも最近、primary chemotherapyの施行にあたり組織学的には無関係に予後の面からみたgrading¹³⁾が提唱され、low risk群に対してMTX、Act-Dの単独投与が行なわれており、友田らは⁶⁾Act-D使用以前と以後の死亡率を比べ約80%から約40%まで減少したと報告しており、Osathanondh et al.¹⁹⁾やGoldstein et al.¹²⁾はprimary chemotherapyのfirst choiceとしてAct-Dを用いて非転移性絨毛性疾患で94—100%、転移性絨毛性疾患で67—80%の寛解が得られたと報告している。これらin vitroとin vivoの成績からみてprimary chemotherapyのfirst choiceとしてAct-Dは有力な薬剤の一つと考えることができる。またhigh risk群に対しては初回から多剤併用、MTX大量療法が行なわれている。これらに対してもNude miceにおける治療効果の有効性⁹⁾および本研究の細胞レベルでの直接効果の結果からみてAct-Dを主体とする多剤併用療法が今後さらに検討されるべきであろう。

一方、MTX大量療法はMTXの新しい体内薬理動態とCF rescueの開発と相俟って注目されている。従来、MTXは体内でほとんど代謝されず腎より排泄されると考えられていたが、7-OH methotrexate, 2, 4, diamino N-10 methylpterioic acidと2, 4, diamino N-10 methyl poly (r) glutamateの代謝産物が発見され、その抗腫瘍効

果が検討されている¹⁴⁾。また、Goldmann et al.¹¹⁾は大量のMTX投与によりMTXの腫瘍細胞への取り込みが、常用量30mg/m²でpassive transportのみであったが 10^{-5} M以上の濃度ではactive transportも加わると報告している。MTXは中枢神経系にはBlood-Brain-Barrierが存在するため移行し難いと考えられていたが50—100 mg/kg投与で骨髄内へ 10^{-6} M程度の移行が報告され²¹⁾、予後不良とされる脳転移性絨毛癌にも応用可能なことを示唆するものである。臨床的にMTX大量療法は、骨肉腫¹⁶⁾、白血病¹⁷⁾などにおいて極めて高い治療効果が報告されているが、絨毛性疾患に関してその評価は未だ一定していないのが現状である⁷⁾⁹⁾²⁵⁾。そこで、MTX大量療法、すなわち20mg/kg以上の投与ではたしてMTX耐性絨毛癌に有効であるかという点の検討では、 10^{-5} M以上の大量のMTXはMTX非耐性細胞に対してもMTX耐性細胞に対してもその効果は完全とはいえないと思われる。さらにMTX大量療法時に副作用軽減を目的として使用されるCF¹⁵⁾が絨毛癌に対するMTXの作用にどのように影響するかという点をみると、臨床的一絨毛性疾患に対して一にはMTX投与開始からCFは、24時間目から12時間毎投与方法が行なわれている。今回、投与方法としてMTX添加開始から24時間以内のCFの併用はMTXの細胞障害効果を明らかに減弱せしめる。これは、CFがactive transportの悪い骨肉腫などの悪性腫瘍細胞へは入り難く、骨髄などの正常細胞へより優先的に取り込まれるとされる¹⁵⁾が、絨毛癌細胞はMTXに対して、active transportが存在するためMTXの大量投与を行なってもCFの同時併用は絨毛癌細胞に対するMTXの作用を減弱せしめ、必ずしも期待される臨床効果がえられないものと推察された。

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜わった恩師清水哲也教授に心より感謝するとともに、直接御指導をいただいた山下幸紀助教授に感謝の意をあらわします。

なお本論文の要旨は第34回日本産科婦人科学会学術講演会において発表した。

文 献

1. 藤本孟男：小児癌治療における臨床薬理学 Methotrexate 血中および髄液 Pharmacology

- kinetics. 日本小児科学会誌, 84: 801, 1980.
2. 林 博章, 山下幸紀, 牟禮一秀, 佐川 正, 石川睦男, 清水哲也: 培養絨毛癌細胞における細胞増殖, hCG, β -hCG ならびに SP-1 の産生動態に与える Methotrexate の影響. 日産婦誌 (投稿中).
 3. 伊藤治英, 服部光顕, 田中忠夫, 小室順義, 関根達征, 細川 勉: 絨毛性腫瘍に対する Methotrexate の少量長期投与方法, 特に副作用の軽減を目的として. 日産婦誌, 16: 21, 1981.
 4. 加藤孝子, 石毛英男, 小林 法, 高見澤裕吉, 田中 昇, 時田尚志: 薬剤抵抗性絨毛癌継代マウスを用いた実験化学療法. 日産婦誌, 33: 2055, 1981.
 5. 大星章一, 清藤 勉, 吉田紘一, 下里幸雄, 小出勉, 佐野量造, 北岡久三: 胃悪性上皮腫の組織培養. 日病会誌, 61: 1910, 1972.
 6. 友田 豊, 可世木成明, 石塚隆夫, 浅井保正, 後藤節子, 原 孝子, 有井吉太郎, 堀 正男, 小林達也, 本田義久: 絨毛癌脳転移に対する手術療法の評価. 日産婦誌, 32: 1792, 1980.
 7. 山下幸紀, 鷲塚紀夫, 山崎知文, 石川睦男, 溝口久富, 萬 豊, 牟禮一秀, 清水哲也, 椎名美博, 一戸喜兵衛: 破壊性胎状奇胎に対する MTX-CF 療法について. 産婦人科治療, 42: 383, 1981.
 8. Albrecht, A.M., Biedler, J.L. and Hutchison, D. J.: Two different species of dihydrofolate reductase in mammalian cells differentially resistant to amethopterin and methasquin. Cancer Res., 32: 1539, 1972.
 9. Berkowitz, R.S., Goldstein, D.P., Jones, M.A., Marean, A.R. and Bernstein, M.R.: Methotrexate with citrovorum factors rescue: Reduced chemotherapy toxicity in the management of gestational trophoblastic neoplasms. Cancer, 45: 423, 1980.
 10. Calabresi, P. and Robert, E.P. Jr.: Alkylating agents, antimetabolites, Hormones and other antiproliferative agents pp1268: The pharmacological basis of therapies. Fifth edition.
 11. Goldmann, I.D.: Membrane transport of methotrexate and other folate compounds: Relevance to rescue protocols. Cancer Chemother. Rep., Part 3, 6: 62, 1975.
 12. Goldstein, D.P., Wing, F.P. and Shirley, R.L.: Actinomycin D as initial therapy of gestational trophoblastic disease: A reevaluation. Obstet. Gynecol., 39: 341, 1972.
 13. Hammond, C.B., Borchert, L.G., Tyrey, L., Cresman, W. and Parker, R.T.: Treatment of metastatic trophoblastic disease: Good and Poor prognosis. Am. J. Obstet. Gynecol., 15: 451, 1973.
 14. Hande, K.R., Ross, C.D. and Chabner, B.A.: Pharmacology and Pharmacokinetics of high dose methotrexate in man. Clinical Pharmacology of Anti-Neoplastic Drugs (ed. H.M., Pinedo), 97, New York, 1978.
 15. Harrap, K.R. and Renshaw, J.: The selective reversal of Methotrexate toxicity in tumour-bearing animals. Clinical Pharmacology of Anti-Neoplastic Drugs (ed. H.M., Pinedo), 57, New York, 1978.
 16. Jaffe, N., Traggis, D., Cassady, J.R., Filler, R. M., Watts, H. and Frei, E.: Multidisciplinary treatment for macrometastatic osteogenic sarcoma. Brit. Med. J., 2: 1039, 1976.
 17. Jones, W.B. and Lewis, J.L.: Treatment of gestational trophoblastic disease. Am. J. Obstet. Gynecol., 120: 14, 1974.
 18. Li, M.C., Hertz, R. and Spencer, D.B.: Effect of methotrexate therapy upon choriocarcinoma and chorioadenoma. Pro. Soc. Exper. Biol., 93: 361, 1956.
 19. Osathanondh, R., Goldstein, D.P. and Pastorfid, G.B.: Actinomycin D as the primary agent for gestational trophoblastic disease. Cancer, 36: 863, 1975.
 20. Patillo, R.A. and Gey, G.O.: The establishment of a cell of human hormone-synthesizing trophoblastic cells *in vitro*. Cancer Res., 28: 1231, 1968.
 21. Rosen, G., Chavimi, F., Nirenberg, A., Mosende, C. and Mehta, B.M.: High-dose methotrexate with citrovorum factor rescue for the treatment of central nervous system tumours in children. Cancer Treat. Rep., 61: 681, 1977.
 22. Ross, G.T., Stolbach, L.L. and Hertz, R.: Actinomycin D in the treatment of methotrexate resistant trophoblastic disease in women. Cancer Res., 22: 1015, 1962.
 23. Sirotnak, F.M., Urita, S. and Hutchison, D.J.: On the nature of a transport alteration determining resistance to amethopterin in the L1210 leukemia. Cancer Res., 28: 75, 1968.
 24. Skipper, H.T. and Schablel, F.M.: Quantitative and cytokinetics studies in experimental tumor model. Int. Cancer Medicine (Holland, J.F. and Frei, E. III., eds.), p. 629, Lea and Febiger, Philadelphia, 1973.
 25. Smith, E.B., Weed, J.C. Jr., Tyrey, L. and Hammond, C.B.: Treatment of nonmetastatic gestational disease: Results of methotrexate alone versus methotrexate-folic acid. Am. J. Obstet. Gynecol., 144: 88, 1982.

(特別掲載 No. 5307 昭58・5・14受付)