

子宮頸癌に対する Etoposide の抗腫瘍効果についての基礎的研究

大阪医科大学産科婦人科学教室

前田 隆義 植田 政嗣 山田 隆司 久保 寛倫
岡村 信介 佐野 隆 植木 実 杉本 修

Sensitivity to Etoposide of Cultured Cells from Cervical Squamous Cell Carcinoma

Takayoshi MAEDA, Masatsugu UEDA, Takashi YAMADA,
Hiromichi KUBO, Shinsuke OKAMURA, Takashi SANO,
Minoru UEKI and Osamu SUGIMOTO

Department of Obstetrics and Gynecology, Osaka Medical College, Osaka

概要 Etoposide の子宮頸部扁平上皮癌に対する抗腫瘍効果について基礎的知見を得るために子宮頸部中等度分化型扁平上皮癌株 (SKG-IIIb) を用いて *in vitro* での効果について検討した。

再増殖測定法の結果から dose response curve を作成すると、Etoposide の作用濃度と作用時間の増加とともに survival fraction は減少し、濃度依存性速効性かつ遅効性作用群であることが判明した。50% 増殖抑制濃度は、2 時間作用群では $7.5\mu\text{g/ml}$ 、24 時間作用群では $1.0\mu\text{g/ml}$ であった。 ^3H -thymidine の核内への取込みからみた Etoposide の DNA 合成抑制効果も濃度および作用時間に依存していた。50% DNA 合成抑制濃度は、2 時間作用群では $13.0\mu\text{g/ml}$ 、24 時間作用群では $3.5\mu\text{g/ml}$ であった。Etoposide は SKG-IIIb に対し高濃度作用群ほど核の膨化・細胞質内空胞などの変性所見をもたらし、最終的に細胞を剥脱させることが判った。cell kinetics への影響をみると、 $1.0\mu\text{g/ml}$ では S 期への集積による cell cycle progression の延長がみられた。 $10.0\mu\text{g/ml}$ では 24 時間作用で、 $50.0\mu\text{g/ml}$ では 4～8 時間作用で cell cycle progression の停止がみられた。

以上から、Etoposide の SKG-IIIb 細胞に対する殺細胞効果は、作用濃度と作用時間の増加とともに増強し、これは DNA 合成抑制効果とよく相関した。またこれらの結果は形態学的変化の程度や cell kinetics への影響からも裏付けられた。Etoposide を子宮頸癌に臨床応用する場合には、これらの基礎的成績をふまえた適切な投与方法を考案・選択する必要があると考えられた。

Synopsis The anti-cancer effect of Etoposide was tested in *in vitro* in cultures of cells taken from a squamous cell carcinoma of the uterine cervix (SKG-IIIb). Growth inhibition was tested by the regrowth assay method, inhibition of DNA synthesis by the uptake of ^3H -thymidine, and morphological changes by the method of Limburg et al. The concentrations of Etoposide used were similar to the blood levels recommended for clinical use.

The regrowth assay showed that the effective concentration of Etoposide for 50% cell kill was $7.5\mu\text{g/ml}$ in 2-hour and $1.0\mu\text{g/ml}$ in 24-hour cultures. The ^3H -thymidine uptake test showed that a concentration of $13\mu\text{g/ml}$ for 2 hours or of $3.5\mu\text{g/ml}$ for 24 hours resulted in 50% inhibition of DNA synthesis. Morphological changes were much greater in the 2-hour cultures at the higher concentration of Etoposide than in the 24-hour cultures at the lower concentration. Investigation of the drug sensitivity by cell kinetics disclosed prolongation of the cell cycle occurring after 96 hours at $1.0\mu\text{g/ml}$ and inhibition of cell cycle progression occurring after 24 hours at $10.0\mu\text{g/ml}$ and after 4 or 8 hours at $50.0\mu\text{g/ml}$.

Thus, the anti-cancer effect of Etoposide on SKG-IIIb depends on both the concentration and exposure time and is related to its ability to inhibit cell growth and DNA synthesis and to cause morphological changes in the cancer cells.

Key words: Cervical cancer • Squamous cell • Cultured tumor cells • Sensitivity • Etoposide

結 言

Etoposide は、植物 podophyllum から抽出した

podophyllotoxin の半合成誘導体である¹⁾。

本薬剤は小細胞性肺癌⁵⁾、悪性リンパ腫²⁾、白血

病²⁰⁾、睾丸腫瘍⁹⁾などに対する有効性が確立され、臨床に応用されている。また最近婦人科領域において、絨毛性腫瘍に対する有効性が注目されており¹⁷⁾、基礎的、臨床的に検討が加えられている。しかし、子宮頸癌に関しては未だ充分な知見は得られていない。そこで著者らは Etoposide の子宮頸癌に対する抗腫瘍効果について基礎的知見を得る目的で、子宮頸部扁平上皮癌由来培養細胞に対する *in vitro* での効果について検討した。

材料および方法

使用培養細胞：ヒト子宮頸部中等度分化型扁平上皮癌 (SKG-IIIb)¹⁸⁾を用いた。

培養方法：Ham's F-12培地 (GIBCO, U.S.A.) に硫酸カナマイシン (25 μ g/ml, 明治製菓), 10% 新生仔牛血清 (三菱化成) を添加した培養液を用い、5%炭酸ガス培養器内、37 $^{\circ}$ Cで静置単層培養をした。

使用薬剤：Etoposide {4'-demethylepipodophyllotoxin 9-(4,6-O-ethylidene- β -D-glucopyranoside)} (ブリストルマイヤーズ) を使用直前に培養液で希釈し、ただちに実験に用いた。濃度勾配は *in vitro* における血中濃度を参考にして、1.0, 5.0, 10.0, 20.0, 50.0 μ g/ml に設定した。

実験方法

1) 増殖能の抑制からみた薬剤感受性

薬剤処理後の細胞生存率の測定に再増殖測定法 (regrowth assay method)¹⁶⁾を用いた。すなわち、3.5cm 径の plastic dish (Falcon, U.S.A.) に 1×10^5 /2ml の細胞を接種し、48時間培養後、対数増殖期に入った時点で各濃度の Etoposide を2時間あるいは24時間作用させ、その後燐酸緩衝液 (NaCl 8g, KCl 0.2g, Na₂HPO₄·2H₂O 0.116g, KH₂PO₄ 0.2g/l, pH 7.2~7.4) (Flow Laboratories, U.S.A.) (PBS (-)) で洗浄した後、もとの培地に戻し、2, 4, 6, 8日後に2dishの細胞数を算定し、その平均をもつて対照群、薬剤処理群の増殖曲線を作成した。また細胞算定時に残りのすべての培地交換を行つた。6~8日後、薬剤処理群が対照群とほぼ同じ増殖速度を示すようになった時点で再増殖測定法の原理に基づいて、薬剤処理群細胞数の対照群細胞数に対する割合を sur-

viving fraction として算出し、片対数表示でプロットして dose response curve を作成した。次に、dose response curve から50%増殖抑制濃度 (EC50: Effective Concentration for 50% cell kill) を求めた。

2) 核酸前駆物質の取込みからみた薬剤感受性

³H-thymidine (³H-TdR) (>15Ci/mmol) を New England Nuclear Corp. (日本アイソトープ協会) より購入し、Ball et al.⁹⁾ の方法に従って行つた。すなわち、scintillation vial (Weaton, U.S.A.) に各々 1×10^5 個/ml の細胞を接種し、48時間培養後、各濃度の Etoposide 加培養液を加え、2時間あるいは24時間培養した。これらを PBS (-) で洗浄後、³H-TdR 1 μ Ci/ml を添加して1時間培養後、冷 PBS (-)、次いで冷1.5%過塩素酸で洗浄した。次に純 ethanol 10ml を添加10分後に洗浄、さらに5%過塩素酸 1ml を添加し、80 $^{\circ}$ C、40分加温後4 $^{\circ}$ Cに冷却した。次いで Triton-X scintillator を1ml 添加後、細胞中に取込まれた ³H-TdR の活性を scintillation counter (TRICARB 300C, Packard, U.S.A.) で測定した。

3) 形態学的障害からみた薬剤感受性

Limburg et al.¹³⁾ の方法に準じて、Etoposide の細胞形態に与える影響について検討した。すなわち、Lab-Tec 4-chamber slide (LUX, U.S.A.) に1 chamber あたり約 2×10^4 個/ml の細胞を接種し、48時間後に各濃度の Etoposide 加培養液を加え、2日毎に各濃度の Etoposide 加培養液にて培地交換を行い、48, 72, 96, 120時間後に ether-alcohol で固定し、papanicolaou 染色を施し、検鏡した。ほとんど変化のない場合を(-)、核の膨化や細胞質内空胞の出現がみられるが未だ剥脱のほとんどみられない場合を軽度障害(+), 細胞の剥脱がかなりみられてきた場合を中等度障害(++)、細胞のほとんどが剥脱し、付着している細胞の形態も著しく変化している場合を高度障害(+++)として形態学的障害度を4段階に分類し、Etoposide に対する感受性を判定した。

4) Cell kinetics からみた薬剤感受性

Etoposide の細胞回転に与える影響について、その DNA histogram の変化を flow cytometry

を用いて解析した。6.0cm 径 plastic dish (Falcon, U.S.A.) に各々 1×10^6 個/4ml の細胞を接種し、72時間培養後に各濃度の Etoposide 加培養液を加え、2日毎に各濃度の Etoposide 加培養液にて培地交換を行い、4, 8, 12, 24, 48, 96時間培養した。それぞれの dish の細胞を single cell suspension とした後、70%ethanol 4℃で3日間固定した。この細胞を PBS (-) で洗浄後、1,500 U/ml の RNase (Cooper Biochemical, U.S.A.) で37℃ 1~2時間処理し、二重鎖の RNA を除去した。次に、細胞を50 μ g/ml の Propidium Iodide (SIGMA, U.S.A.) で蛍光染色し (PI 染色)、40 μ の nylon mesh filter に通し、完全な single cell suspension にして flow cytometry (CS-20, 昭和電工) で細胞内 DNA 量を測定し、DNA histogram を作成した。phase fraction は Fried¹⁰⁾ の方法により求めた。

結 果

1) 増殖能の抑制からみた薬剤感受性

Etoposide 2時間作用後の増殖曲線を図1に、24時間作用後の増殖曲線を図2に示した。

両群いずれとも、Etoposide の濃度が高くなるにつれて細胞の増殖は抑制された。8日後には薬

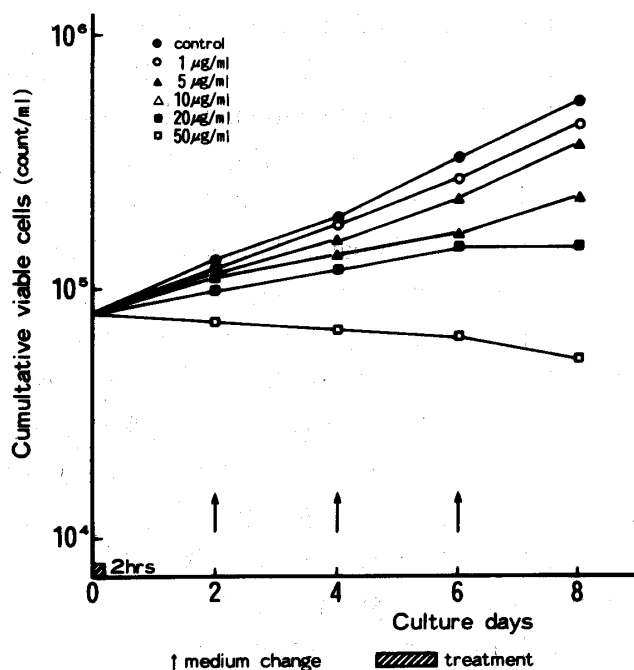


図1 SKG-IIIb細胞にEtoposideを2時間作用させた後の増殖曲線

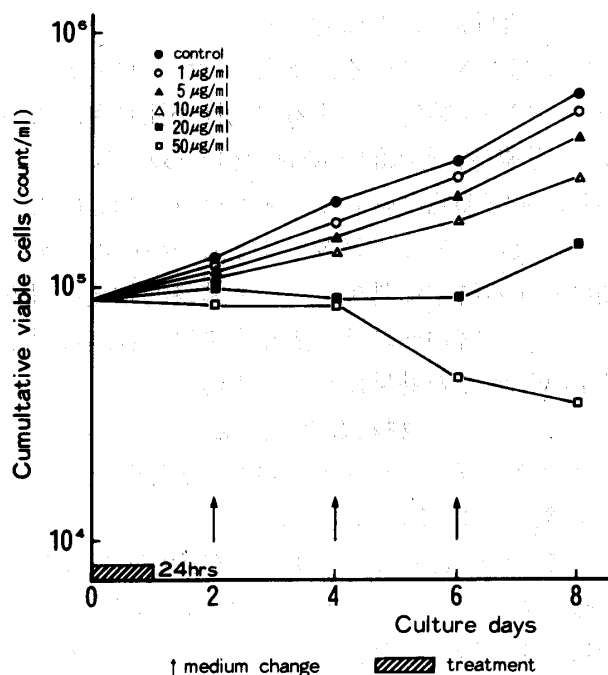


図2 SKG-IIIb細胞にEtoposideを24時間作用させた後の増殖曲線

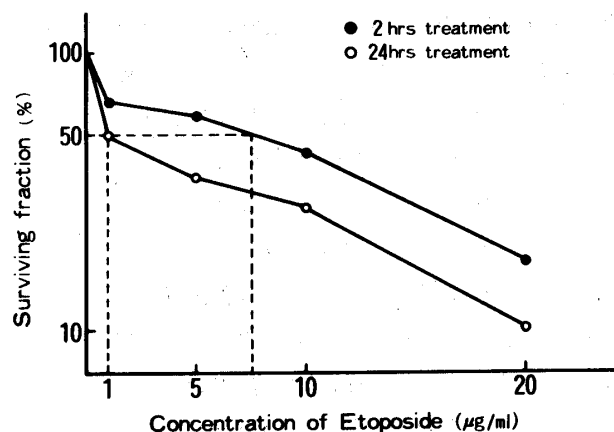


図3 SKG-IIIb細胞にEtoposideを2時間あるいは24時間作用後のdose response curve

剤処理群が対照群とほぼ同じ増殖を示した。これらより作成した Etoposide 2時間作用あるいは24時間作用の dose response curve (図3) によれば Etoposide の殺細胞効果は作用濃度および作用時間に依存し、50%増殖抑制濃度は、2時間作用で7.5 μ g/ml、24時間作用で1.0 μ g/mlであった。

2) 核酸前駆物質の取込みからみた薬剤感受性

1.0~50.0 μ g/ml の各濃度の Etoposide 加培養液で2時間あるいは24時間培養したのち、³H-

TdR の DNA への取込みの割合は対照群を100%とすると, 図4のごとくである. Etoposide の作用濃度の増加に伴い³H-TdR の取込みは減少し, また作用時間が長くなると取込みは減少した. 増殖抑制能からみた薬剤の感受性と同様, Etoposide の DNA 合成抑制効果は濃度および時間に依存していた. また50% DNA 合成抑制濃度は, 2時間作用群で13.0 μ g/ml, 24時間作用で3.5 μ g/mlであった.

3) 形態学的障害からみた薬剤感受性

Etoposide を高濃度, 長時間作用させるほど核の膨化, 細胞質内空胞および細胞質融解などの変性所見が目立ち, 最終的に細胞が剥脱することが判った. 表1は作用濃度, 時間別に細胞の形態学的障害を4段階に分類したものである. 120時間作

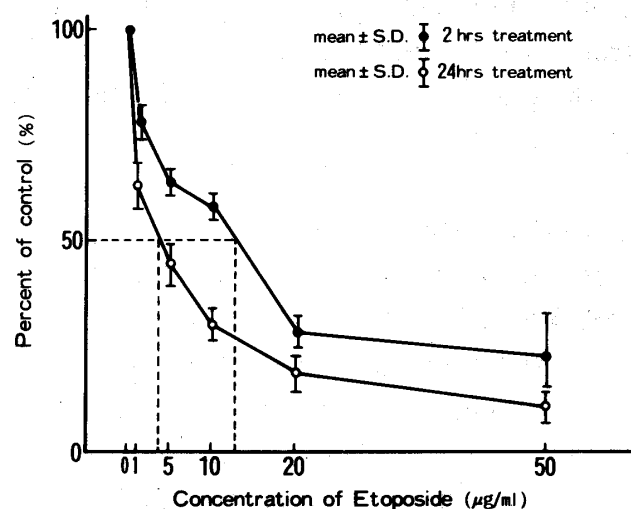


図4 SKG-IIIb細胞にEtoposideを2時間あるいは24時間作用後のDNAへの³H-thymidineの取込み

表1 形態学的障害からみたSKG-IIIb細胞のEtoposideに対する薬剤感受性

Time of Treatment (hr) \ Concentration of Etoposide (μ g/ml)	48	72	96	120
1.0	—	—	—	+
5.0	—	—	+	+
10.0	—	+	+	+
20.0	+	+	+	+
50.0	+	+	+	+

用後1.0 μ g/mlでは細胞質はやや膨化し, 細胞質内空胞が認められ, 軽度障害(+)とした. 10.0 μ g/mlではかなりの細胞が剥脱し, 付着している細胞の形態も著明に変化しており, 中等度障害(++)とした. 50.0 μ g/mlでは, 細胞のほとんどは剥脱し, 付着細胞の形態も著明に変化しており, 高度障害(+++)とした. 50.0 μ g/mlでは48時間で(++), 72時間では(+++)の障害が認められた. 高

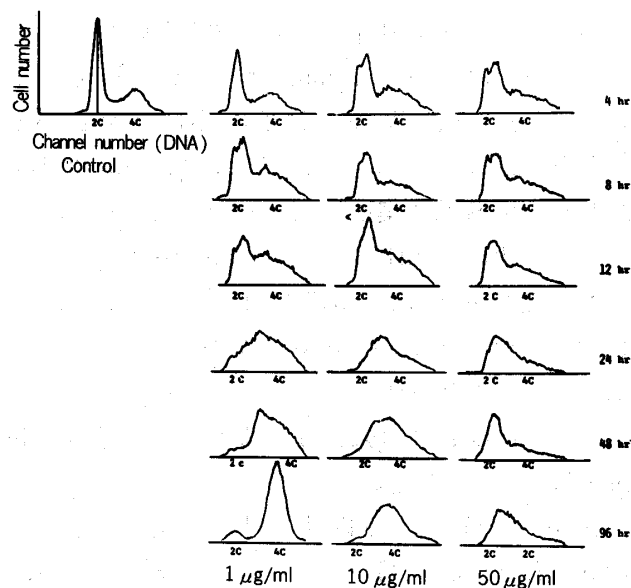


図5 SKG-IIIb細胞にEtoposideを24時間~120時間作用させた時の細胞内DNA histogramの経時的変化

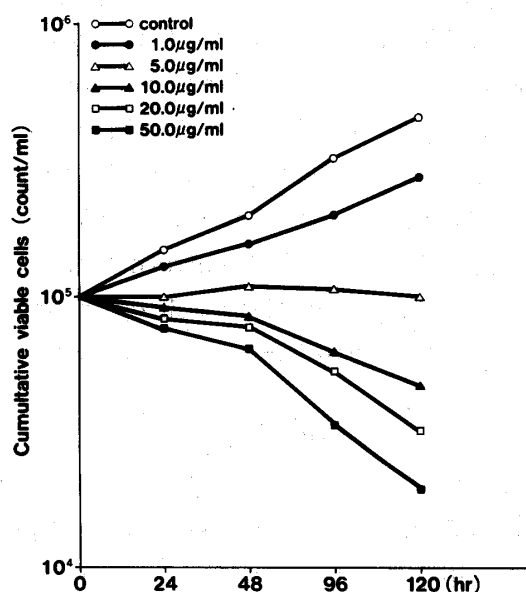


図6 SKG-IIIb細胞にEtoposideを24時間~120時間作用させた時の各時点における生細胞数

濃度作用群では著明な変性が認められたが、低濃度作用群でも長時間になると強い障害が認められた。

4) Cell kinetics からみた薬剤感受性

PI 染色による DNA histogram を図 5, 各時点における生細胞数を図 6 に示した。

Control の細胞の PI 染色による DNA histogram では, diploid chromosomal complement (2C) に dominant な tetraploid chromosomal complement (4C) に小 peak を有する 2 峰性の pattern を示していた。Phase fraction を算定すると, $G_1+G_0=64.3\%$, $S=14.2\%$, $G_2+M=21.5\%$ となり, cv 値は 6.1% であった。1.0 $\mu\text{g/ml}$ では 48 時間作用で S 期に集積し, Phase fraction は $G_1+G_0=12.0\%$, $S=31.6\%$, $G_2+M=56.4\%$, cv 値は 26.7% であった。96 時間作用では $G_1+G_0=17.2\%$, $S=5.6\%$, $G_2+M=77.2\%$ となり, G_2+M に peak を形成し, 一部は G_0+G_1 期に移行した。Etoposide 1.0 $\mu\text{g/ml}$ の濃度では cell cycle progression の遅延がみられた。

10.0 $\mu\text{g/ml}$ では, 24 時間作用で S 期に集積し, Phase fraction は $G_0+G_1=10.9\%$, $S=59.8\%$, $G_2+M=29.3\%$, cv 値は 22.8% であった。以後 72 時間, 96 時間作用でも同様の pattern を示した。Etoposide 10.0 $\mu\text{g/ml}$ の濃度では, 24 時間作用以降 cell cycle progression が停止に向かう傾向がみられた。50.0 $\mu\text{g/ml}$ では, 4 時間作用から DNA histogram がくずれだし, Phase fraction は $G_1+G_0=51.9\%$, $S=18.2\%$, $G_2+M=31.5\%$, cv 値は 23.3%, 12 時間作用では $G_1+G_0=52.8\%$, $S=19.0\%$, $G_2+M=28.2\%$, cv 値は 24.4% となり, 96 時間作用まで同様の pattern を示した。Etoposide 50.0 $\mu\text{g/ml}$ では, cell cycle progression が 4 時間作用からほとんど停止していることが判明した。

考 案

婦人科悪性腫瘍のなかで, 子宮頸癌は抗癌剤に対する感受性が低く, 各種の抗癌剤の単独あるいは多剤併用療法が用いられているが, 未だ満足すべき療法は確立されていない。著者らは肺小細胞性癌⁵⁾, 悪性リンパ腫²¹⁾, 白血病²⁰⁾, 睾丸腫瘍⁹⁾など

に有効性が確かめられている新しい抗癌剤, Etoposide を用いて子宮頸癌に対する抗腫瘍効果の基礎的知見を得る目的で, SKG-IIIb 細胞に対する in vitro での効果について検討した。

まず, Etoposide の癌細胞に対する抗腫瘍効果を再増殖測定法で, DNA 合成抑制効果を $^3\text{H-TdR}$ の取込み法で調べた。癌細胞の形態に与える影響については Limburg et al.¹³⁾の方法により行い, さらに cell kinetics へ与える影響については flow cytometry で検討した。

Drewinko et al.⁸⁾はヒト lymphoma cell line を用いて in vitro の実験を行つた。Etoposide 1 時間作用による 63% 増殖抑制濃度は 3 $\mu\text{g/ml}$ であり, 10 $\mu\text{g/ml}$ では 95% 抑制され, 作用時間の延長によつて抑制はさらに増強されると報告している。宮本ら¹⁾はヒト肺小細胞癌培養細胞を用いた実験で, Etoposide 1 $\mu\text{g/ml}$ 1 時間作用では control とほとんど差はなく, 5 $\mu\text{g/ml}$ では 96 時間まで抑制効果を示し, Etoposide の細胞増殖抑制は濃度および時間に依存するとした。また高橋ら⁴⁾はマウス白血病細胞 P388 を用いた実験で, Etoposide は濃度依存性速効性かつ遅効性作用群に属すると結論している。これらの結果は著者らの成績とはほぼ一致する。さらに Long et al.¹⁵⁾は 2 種の小細胞性肺癌を含む 3 種の肺癌の培養細胞を用いて Etoposide 1 時間作用による EC50 は 2.8~15.9 $\mu\text{g/ml}$ (4.7 μM ~27 μM) であったと報告しており, 著者らの 2 時間作用の EC50 7.5 $\mu\text{g/ml}$ と同様の成績であった。以上より Etoposide の SKG-IIIb 細胞に対する増殖抑制効果は作用濃度および作用時間に依存し, その EC50 は臨床的に Etoposide の有効性が確認されている小細胞性肺癌の EC50 と近似していることが判つた。

Loike et al.¹⁴⁾は Hela cell を用いた研究で, Etoposide は microtubule に作用せず用量に依存して一本鎖 DNA を可逆的に切断すると述べている。また Etoposide 15 分作用による 50% DNA 合成抑制濃度は 1.47 $\mu\text{g/ml}$ (25 μM) であったと報告している。著者らの検討によれば $^3\text{H-TdR}$ の取込みは Etoposide の作用濃度の増加あるいは作用時間の延長に伴い減少した。50% DNA 合成の抑

制濃度は2時間作用群では $13.0\mu\text{g/ml}$, 24時間作用群では $3.5\mu\text{g/ml}$ であった。以上より, EtoposideのSKG-IIIb細胞に対するDNA合成抑制効果は作用濃度および作用時間に依存していることが判明した。

薬剤感受性を形態学的障害からみると, $50.0\mu\text{g/ml}$ では48時間で(++)、72時間で(+++)の変性を示し, $1.0\mu\text{g/ml}$ でも120時間作用で(+)の変性を示すことが判った。

Skipper et al.¹⁹⁾は癌の化学療法において細胞回転 (cell kinetics) の概念を導入した治療法を強調した。Krishan et al.¹²⁾は flow cytometry を用いて human lymphoblast に対して Etoposide $1.0\mu\text{g/ml}$ が24時間作用すると cell cycle progression が停止し, 細胞がS期に集積する DNA histogram を形成すると述べている。宮本ら¹⁾はヒト肺小細胞癌培養細胞における Etoposide の cell kinetics に与える影響について, 24時間作用によりS期の遅延がみられS期に細胞が集積し, $10\mu\text{g/ml}$ 以上の高濃度では細胞回転は停止したと述べている。著者らの成績では $1.0\mu\text{g/ml}$ では8時間作用でS期に集積し始め, 24時間作用でS期に集積が著明になり, 96時間作用でS期から $G_2 + M$ 期に peak を形成した。一方 $10.0\mu\text{g/ml}$ では24時間作用で, $50.0\mu\text{g/ml}$ では4ないし8時間作用で cell cycle progression の停止がみられた。これらの結果から Etoposide のSKG-IIIb細胞の cell kinetics へ与える影響は, $1.0\mu\text{g/ml}$ では cell cycle を延長させ, $10.0\mu\text{g/ml}$ 以上では cell cycle を停止させることが判った。

以上, Etoposide のSKG-IIIb細胞に対する増殖抑制効果, DNA合成抑制効果, 細胞形態, cell kinetics に与える影響は作用濃度および作用時間の増加とともに大きくなることが判った。また EC50および50%DNA合成抑制濃度は, 臨床的に有効性が確立されている小細胞性肺癌のそれと近似していることも判った。

下山³⁾は抗癌剤をその作用様式から大きく濃度依存性作用群 (type I) と時間依存性作用群 (type II) に分類し, 濃度依存性作用群をさらに速効群 (type Ia) と速効性かつ遅効性作用群 (type Ib)

に再分類している。そして, Etoposide の様な type Ib の抗癌剤の用法としては, 1回大量投与よりも中等量間歇投与法または頻回投与法が至適な投与法であるとしている。また宮本ら²⁾は Etoposide と同様に type Ib に属する Bleomycin について詳細に検討しており, Bleomycin の分割投与が1回投与よりもはるかに高い抗腫瘍効果をもたらすとしている。このことは, 臨床的にも裏付けられている。Etoposide を用いた臨床成績でも, 小細胞性肺癌に対して, 1回大量投与よりも3~5回間歇連続投与が優れているとの報告がある⁷⁾。

これらの著者らの実験成績ならびに文献的考察から, Etoposide は子宮頸部扁平上皮癌培養細胞に対して下山の type Ib の抗腫瘍効果を示すことが判り, また EC50および50%DNA合成抑制濃度は, 臨床的に有効性が確立されている小細胞性肺癌のそれに近似していることが判った。

これらの知見は, Etoposide を子宮頸癌治療に臨床応用する場合の指標になり, さらに基礎的・臨床的成績を加えることにより, 適切な投与方法が確立されてくるであろうと考えられた。

本論文の要旨は, 第72回近畿産科婦人科学会および第23回日本癌治療学会において発表した。

文 献

1. 宮本 宏, 伊藤正美, 荒谷義和, 高岡和夫, 磯部 宏, 堂坂弘俊, 井上勝一, 川上義和, 水野重孝: ヒト肺小細胞癌培養細胞における Etoposide の Cell Kinetics に関する研究. 癌と化療, 11: 1237, 1984.
2. 宮本忠昭, 寺島東洋三: プレオマイシンの細胞致死作用と腫瘍治療. Oncologia, 7: 61, 1983.
3. 下山正徳: 抗癌剤の殺細胞作用の様式からみた適切な投与法. 最新医学, 28: 850, 1973.
4. 高橋克俊, 岩淵 実: Etoposide のマウス白血病 P388 細胞に対する殺細胞作用様式. 癌と化療, 12: 2190, 1985.
5. Aisner, J., Whitacre, M., Van Echo, D.A., Wesley, M. and Wiernik, P.H.: Doxorubicin, cyclophosphamide and VP 16-213 (ACE) in the treatment of small cell lung cancer. Cancer Chemother. Pharmacol., 7: 187, 1982.
6. Ball, C.R., Poynter, R.W. and Van den Berg, H. W.: A novel method for measuring incorporation of radioactive precursors into nucleic

- acids and proteins of cells in monolayer culture. *Analytical Biochemistry*, 46 : 101, 1972.
7. *Cavalli, F., Sonntag, R.W., Jungi, F., Sennt, H. J. and Brunner, K.W.* : VP16-213 monotherapy for remission induction of small cell lung cancer : A randomized trial using three dosage schedules. *Cancer Treat. Rep.*, 62 : 473, 1978.
 8. *Drewinko, B. and Barlogie, B.* : Survival and cycle-progression delay of human lymphoma cells in vitro exposed to VP-16-213. *Cancer Treat. Rep.*, 60 : 1295, 1976.
 9. *Fitzharris, B.M., Kaye, S.B., Saverymuttu, S., Newlands, E.S., Barrett, A., Peckham, M.J. and McElwain, T.J.* : VP16-213 as a single agent in advanced testicular tumors. *Europ. J. Cancer*, 16 : 1193, 1980.
 10. *Fried, J.* : Method for the quantitative evaluation of data from flow microfluometry. *Comput. Biomed. Res.*, 9 : 263, 1976.
 11. *Issel, B.F.* : The podophyllotoxin derivatives VP16-213 and VM26. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 7 : 73, 1982.
 12. *Krishan, A., Paika, K. and Frei, E.* : Cytofluometric studies on the action of podophyllotoxin and epipodophyllotoxins (VM-26, VP-16-213) on the cell cycle traverse of human lymphoblasts. *J. Cell Biol.*, 66 : 521, 1975.
 13. *Limburg, H. and Heckmann, U.* : Chemotherapy in the treatment of advanced pelvic malignant disease with special reference to ovarian cancer. *J. Obstet. Gynec. Brit. Cwlth.*, 75 : 1246, 1968.
 14. *Loike, J.D. and Horwitz, S.B.* : Effect of podophyllotoxin and VP-16-213 on microtubule assembly in vitro and nucleotide transport in HeLa cells. *Biochemistry*, 15 : 5435, 1976.
 15. *Long, B.H. and Brattain, M.G.* : The activity of etoposide (VP16-213) and teniposide (VM26) against human lung tumor cells in vitro : Cytotoxicity and DNA breakage. In *Etoposide (VP-16), Current Status and New Developments* (eds. B.F. Issel, F. Muggia and S.K. Carter), 63. Academic Press, Inc., New York, 1984.
 16. *Motoyama, T., Hoji, H., Suzuki, T. and Obushi, S.* : Evaluation of the regrowth assay method as an in vitro drug sensitivity test and its application to cultured human gastric cancer cell lines. *Acta Medica et Biologica.*, 27 : 49, 1979.
 17. *Newlands, E.S. and Bagshawe, K.D.* : The role of VP16-213 (Etoposide ; NSC-141540) in gestational choriocarcinoma. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 7 : 211, 1982.
 18. *Nozawa, S., Udagawa, Y., Ohta, H., Kurihara, S. and Fishman, W.H.* : Newly established uterine cervical cancer cell line (SKG-III) with reagan isozyme, human chorionic gonadotropin β -subunit, and pregnancy-specific β_1 -glycoprotein phenotypes. *Cancer Res.*, 43 : 1748, 1983.
 19. *Skipper, H.E., Schabel, F.M., Mellett, L.B., Montgomery, J.A., Wilkoff, L.J., Lloyd, H.H. and Brockman, R.W.* : Implication of biochemical, cytotoxic, pharmacologic, and toxicologic relationships in the design of optimal therapeutic schedules. *Cancer Chemother. Res.*, 54 : 431, 1970.
 20. *Smith, I.E., Gerken, M.E., Clink, H.M. and McElwain, T.J.* : VP16-213 in acute myelogenous leukemia. *Postgraduate Med. J.*, 52 : 66, 1976.
 21. *Taylor, R.E., McElwain, T.J., Barret, A. and Peckham, M.J.* : Etoposide as a single agent in relapsed advanced lymphomas A phase II study. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 7 : 175, 1982.

(特別掲載 No. 6005 昭61・7・8 受付)