

難治性絨毛癌に対する化学療法の基礎的臨床的研究

千葉大学医学部産科婦人科学教室

小林 治 城武 昇一 松井 英雄
関谷 宗英 高見沢裕吉Fundamental and Clinical Study of Chemotherapy
for Refractory ChoriocarcinomaOsamu KOBAYASHI, Shouichi SHIROTAKE, Hideo MATSUI,
Souei SEKIYA and Hiroyoshi TAKAMIZAWA*Department of Obstetrics and Gynecology, Chiba University School of Medicine, Chiba*

概要 MTX, Act-D, CPM の三剤併用療法 (MAC) の導入以来, 絨毛癌の寛解率は向上してきたが, MAC 抵抗症例の予後は十分ではない. かかる症例の予後を改善するために, 薬剤抵抗性絨毛癌肺転移巣より樹立した HM 細胞を抗癌剤で処理し (MTX 10^{-8} M, Act-D 10^{-8} M, MTX 10^{-8} M + Act-D 10^{-8} M, MTX 10^{-5} M, MTX 10^{-5} M + Act-D 10^{-8} M), 細胞増殖, 3 H-deoxyuridine 取り込み, dihydrofolate reductase (DHFR) 活性の変化を調べた. この結果をもとに作製したプロトコルを絨毛癌患者に行い, MAC 療法との効果を比較した.

1. 細胞増殖, 3 H-deoxyuridine 取り込みの抑制, DHFR 活性の変化よりみた抗腫瘍効果は, MTX 10^{-5} M と Act-D 10^{-8} M の併用が最大であつた.

2. (i) この結果にヌードマウスの成績をふまえて作製した MTX 450mg + Oncovin 2mg + Act-D 0.5mg の三剤併用療法 (MOA) を絨毛癌 5 例に施行した.

(ii) MAC 療法で治療した絨毛癌は 39 例で, 28 例, 71.7% が寛解した. しかし, 8 例, 28.6% が再発, MAC 療法で再治療時, 1 例, 12.5% が寛解した.

(iii) MOA 療法は, MAC 抵抗症例 2 例を含む 5 例に行い, 全例寛解した. 現時点において MOA 療法は MAC 療法より有効であることが示唆された.

Synopsis Since the introduction of MAC therapy in 1973, choriocarcinoma has become one of the most curable gynecologic malignancies. But in MAC resistant cases, the therapeutic results have been unsatisfactory. To establish the proper therapy for MAC resistant choriocarcinoma, fundamental experiments with MTX resistant HM cell lines were carried out with the aim of their clinical application.

The effective combination in the treatment of choriocarcinoma appeared to be 10 to the minus 5th power mol of MTX and 10 to the minus 8th power mol of Act-D, considering its effect in cell proliferation inhibition, deoxyuridine uptake inhibition and dihydrofolate reductase activity suppression. Taking the effects of Oncovin confirmed by the experiments with nude mice into consideration, a combined moderate dose of MTX, Oncovin and Act-D, namely MOA therapy was used. The protocol of MOA therapy is as follows: The first day, MTX 150mg bolus, 300mg drip infusion for 4 hours, Oncovin 2mg bolus and Act-D 0.5mg bolus. From the second to the fifth day, Act-D bolus.

MAC was effective in only one of the eight recurrent cases, but on the other hand, MOA was effective in five cases of choriocarcinoma including two MAC resistant cases. Therefore, MOA seemed to be a more effective therapy than MAC.

Key words: Choriocarcinoma • Chemotherapy • Drug resistance • Moderate dose MTX

緒 言

絨毛癌は化学療法の奏効する代表的疾患であり, 1973年, Methotrexate (MTX), Actinomycin D (Act-D), Cyclophosphamide (CPM) による三剤併用療法 (MAC) の導入以来, その寛解率は約

60%に向上した^{7,8)}. しかし, MAC 抵抗性絨毛癌の予後は十分といえず, かかる症例に対し, MTX 超大量療法¹⁾, Cis-platin⁹⁾など種々の治療を試みてきたが, 未だ確立した治療法がないのが現状である.

絨毛癌症例は、近年減少傾向にあり、各種治療法の有効性の評価は容易ではない。新しい治療法を試みるにあたって、盲目的に error and trial をくり返すことは許されず、基礎的、臨床的な有効性の裏づけが要求されよう。今回、教室で継代している8種類の絨毛癌細胞のMTX感受性を調べ、MTX抵抗性株を用い基礎的実験を行い、有効性が示唆された薬剤の組み合わせ、投与量を基に新しいプロトコルを作り、絨毛癌患者に施行、その有効性をMAC療法と比較、以下の結果を得たので報告する。

対象および方法

1. 対象

対象は1973年～1983年の11年間に千葉大学産婦人科で治療した絨毛癌42例である。このうち39例は、従来の治療法であるMTX, Act-D, CPMの三剤併用療法(MAC)で治療を行った。5例(再発症例2例を含む)は基礎的実験を基に作製したMTX, Oncovin, Act-Dの三剤併用療法(MOA)で治療した。

2. 研究方法

1) In vitro 実験

(i) MTX 10^{-8} M 処理時の細胞増殖

MTX 10^{-8} M/1添加培養液5ml中にHCCM-5¹⁴⁾, BeWo, IMa¹⁹⁾, JAr, NUC-1⁶⁾, SCH⁵⁾, JEG, HM細胞²⁰⁾各 10^5 個を径60mmのプラスチック Culture dish (Falcon plastics) に接種し、5% CO₂, 37°Cで培養した。48時間毎に培養液を交換し、0.25%トリプシン溶液で5～15分消化後、単個細胞を集め、0.05%クリスタル紫染色後、血算板を用いて細胞数を算出した。

(ii) HM細胞の抗癌剤処理時の細胞増殖

HM細胞 10^5 個/5mlを5%CO₂, 37°Cで培養した。抗癌剤の処理条件はMTX 10^{-8} M, 0.5mg投与時の血中濃度に相当するAct-D 10^{-8} M, MTX 10^{-8} M+Act-D 10^{-8} M, MTX 10^{-5} ～ 10^{-9} M(24時間毎に濃度1log低下), MTX 10^{-5} ～ 10^{-9} M+Act-D 10^{-8} Mで、Act-Dは1日2時間で5日、MTXは5日間連続処理を行った。

(iii) HM細胞抗癌剤処理時の³H-deoxyuridine 取り込み

滅菌シンチレーション・バイアルにHM細胞 2×10^5 個を接種し、48時間培養後、MTX 10^{-8} M, Act-D 10^{-8} M, MTX 10^{-8} M+Act-D 10^{-8} M, MTX 10^{-5} M, MTX 10^{-5} M+Act-D 10^{-8} Mで処理(MTX 24時間, Act-D 2時間), ³H-deoxyuridine (1 μ ci/ml, New England Nuclear corp.) の細胞内取り込みをBall et al. の方法¹²⁾に従って測定した。

(iv) HM細胞抗癌剤処理時のdihydrofolate reductase (DHFR) 活性の変化

薬剤未処理コントロールおよびMTX 10^{-8} M, Act-D 10^{-8} M, MTX 10^{-8} M+Act-D 10^{-8} M, MTX 10^{-5} M, MTX 10^{-5} M+Act-D 10^{-8} M処理3, 6, 9, 12, 24時間後に細胞をメルカプト・エタノールで処理した材料0.1mlにNADPH 1ml, 1mM dihydrofolate 0.1mlを加え、OD 340nmにおける吸光度の減少により、細胞内DHFR活性を測定した¹³⁾。

2) 血中MTX濃度測定

絨毛性疾患患者にMTX 20mg筋注(n=10), 1, 3, 6, 12, 24時間後, 450mg静注(n=10, 150mg, bolus, 300mg: drip infusion), 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72時間後に採血, 血中MTX濃度はenzyme kinetic法で測定した。

3) 化学療法の効果判定

化学療法の効果判定は、癌治療効果判定基準作成委員会の絨毛がん化学療法の直接効果判定基準によった³⁾。

(i) Complete Response (CR)

尿中hCG値が4週以上にわたり、安定してLHレベル値を維持した場合。

(ii) Partial Response (PR)

尿中hCG値がLHレベルまで下降するが、4週以内に再上昇を示す場合。

(iii) No Change (NC)

尿中hCG値が1,000IU/day以下に下降するがLHレベルに到らず、4週をすぎて1,000IU/day以上に上昇を示すか、同様の値を続けている場合。

(iv) Progressive Disease (PD)

尿中hCG値が上昇、不変、または1,000IU/day以下でLHレベル以上の範囲に下降するが、4週

以内に上昇を示す場合、

成績

I. 基礎的成績

1. MTX 10^{-8} M 処理時の細胞増殖

8 種類の絨毛癌細胞を MTX 10^{-8} M で処理した時の細胞増殖抑制効果は、その程度により 3 群に分けられた (図 1)。

1) ほとんど増殖抑制がみられない群(低感受性群): HM, SCH, JEG, 2) 中間群: NUC-1, JAr, 3) 高度に細胞増殖が抑制される群(高感受性群): IMa, BeWo, HCCM-5であつた。

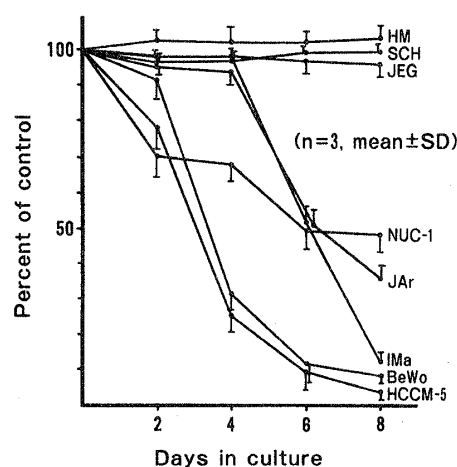


図1 Effect of 10^{-8} M methotrexate on the growth of choriocarcinoma cell lines in vitro

2. 抗癌剤処理時の HM 細胞増殖

HM 細胞の抗癌剤処理時の増殖曲線は図 2 に示す如く, MTX 10^{-8} M では増殖抑制はみられず, Act-D 10^{-8} M, MTX 10^{-8} M+Act-D 10^{-8} M 処理では, 6 日目以後細胞増殖がみられるが, 12 日目にコントロール 1.6×10^6 に対し, それぞれ $3.7 \pm 1.3 \times 10^5$ (コントロール比 $23.1 \pm 8.4\%$), $3.2 \pm 1.5 \times 10^5$ ($20 \pm 10\%$)であつた。MTX $10^{-5} \sim 10^{-9}$ M 処理では, 8 日目から細胞増殖抑制, 12 日目には $9.5 \pm 5.6 \times 10^4$ ($5.9 \pm 3.6\%$) ($p < 0.01$), MTX $10^{-5} \sim 10^{-9}$ M+Act-D 10^{-8} M 処理では, 6 日目より増殖抑制, 12 日目には $5.1 \pm 1.3 \times 10^4$ ($3.2 \pm 0.8\%$) ($p < 0.01$) と, MTX $10^{-5} \sim 10^{-9}$ M, MTX $10^{-5} \sim 10^{-9}$ M+Act-D 10^{-8} M 処理時に有意の細胞増殖抑制効果を認めた。

3. 抗癌剤処理時, HM 細胞の 3 H-deoxyuridine 取り込み

抗癌剤処理時 HM 細胞の 3 H-deoxyuridine の取り込みは図 3 に示す如く, コントロール比 Act-D 10^{-8} M, $112 \pm 14\%$, MTX 10^{-8} M, $109 \pm 11\%$, MTX 10^{-8} M+Act-D 10^{-8} M, $75 \pm 11\%$, MTX 10^{-5} M $8 \pm 4\%$ ($p < 0.01$), MTX 10^{-5} M+Act-D 10^{-8} M, $6 \pm 5\%$ ($p < 0.01$) であり, MTX 10^{-5} M, MTX 10^{-5} M+Act-D 10^{-8} M 処理時に有意の低下

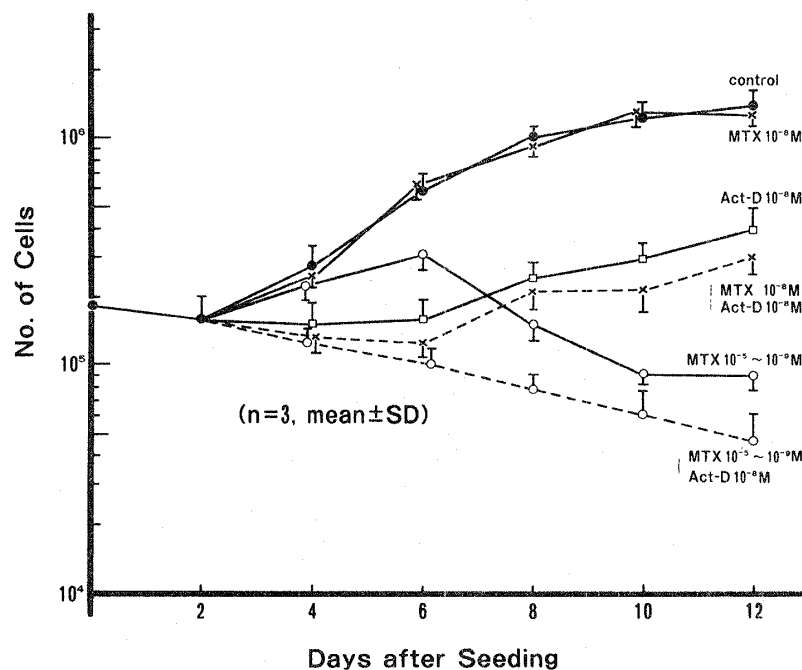


図2 Influence of MTX and Act-D on cell growth in HM cells

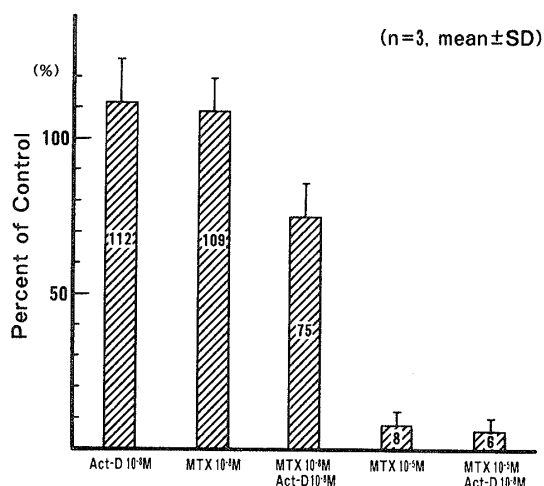


図3 Inhibition of ^3H -deoxyuridine uptake in HM cells treated with MTX and Act-D

を認めた。

4. 抗癌剤処理時, HM 細胞の DHFR 活性

抗癌剤処理後 HM 細胞の経時的 DHFR 活性の変化は図4に示す如く, MTX 10^{-8}M , Act-D 10^{-8}M , MTX 10^{-8}M + Act-D 10^{-8}M , MTX 10^{-5}M + Act-D 10^{-8}M 処理では, 薬剤処理6時間でピークをとり, コントロール $10.5 \pm 1.4\text{mU/mg}$ に対し,

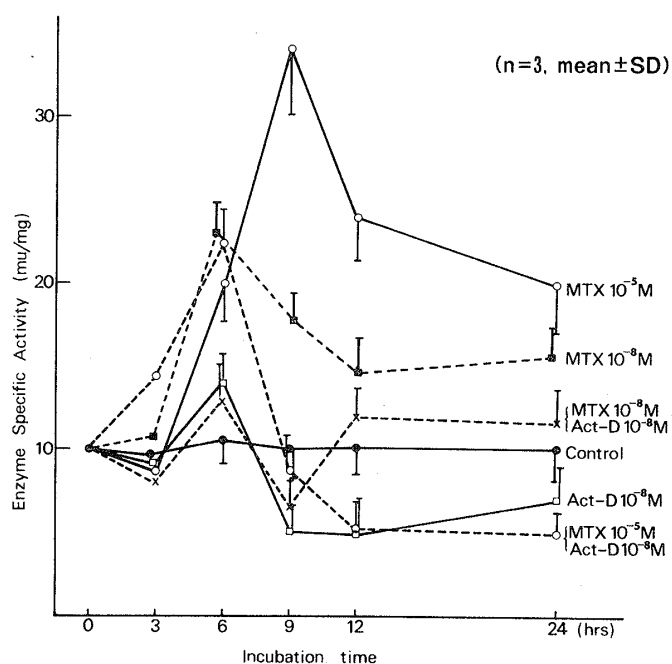


図4 Effect of MTX and Act-D on dihydrofolate reductase in HM cells

それぞれ $23.5 \pm 2.5\text{mU/mg}$ ($p < 0.01$), $14.0 \pm 2.5\text{mU/mg}$, $12.9 \pm 1.9\text{mU/mg}$, $22.4 \pm 2.1\text{mU/mg}$ ($p < 0.01$) と MTX 10^{-8}M , MTX 10^{-5}M + Act-D

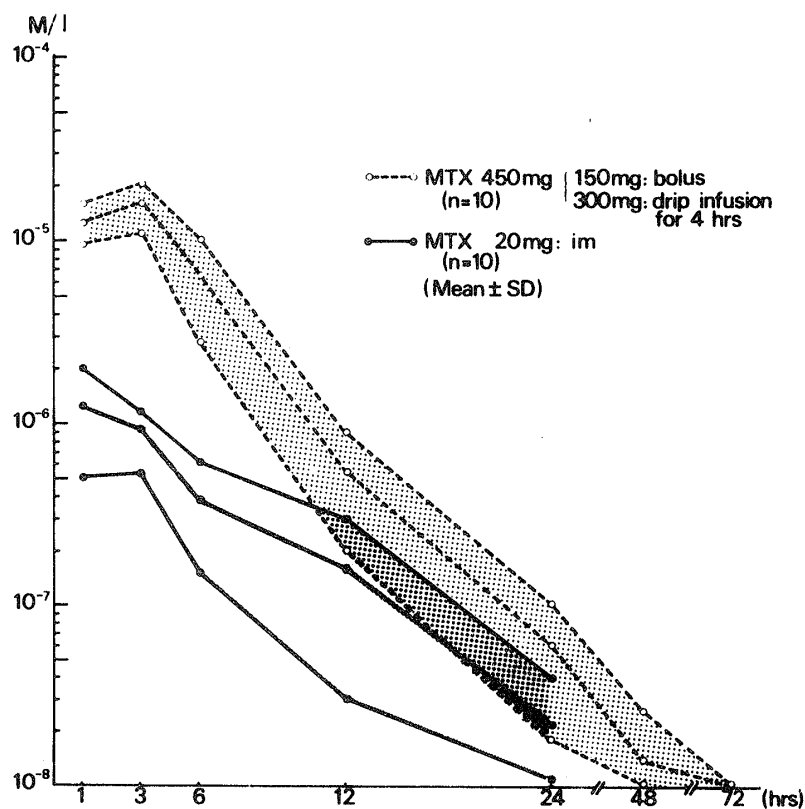


図5 Serum MTX concentration

10^{-8} M 処理で有意に上昇した。薬剤処理24時間後には、コントロール 10.1 ± 1.7 mU/mg に対し、それぞれ 15.8 ± 2.2 mU/mg ($p < 0.05$), 6.9 ± 1.4 mU/mg, 10.8 ± 1.8 mU/mg, 4.8 ± 1.1 mU/mg ($p < 0.05$) と MTX 10^{-8} M 処理で有意に上昇, MTX 10^{-5} M+Act-D 10^{-8} M 処理で有意に低下した。MTX 10^{-5} M 処理では、9 時間後にピーク 34.1 ± 4.1 mU/mg をとり、24 時間後は 20.1 ± 3.0 mU/mg ($p < 0.01$) と有意に上昇した。

5. 血中 MTX 濃度

MTX 20mg 筋注、450mg 静注後の血中 MTX 濃度の経時的变化は図 5 に示す。MTX 20mg 筋注群では、投与後 1 時間で最高値 $1.25 \pm 0.75 \times 10^{-6}$ M をとり、3 時間、 $9.44 \pm 4.1 \times 10^{-7}$ M, 6 時間、 $3.76 \pm 2.3 \times 10^{-7}$ M, 12 時間、 $1.62 \pm 1.36 \times 10^{-7}$ M と、投与後 12 時間まで 10^{-7} M を維持、24 時間で $2.24 \pm 2.0 \times 10^{-8}$ M に低下した。

MTX 450mg 静注群では、投与開始後 1 時間で最高値 $1.26 \pm 0.3 \times 10^{-5}$ M をとり、3 時間、 $1.58 \pm 0.5 \times 10^{-5}$ M, 6 時間、 $6.49 \pm 3.6 \times 10^{-6}$ M, 12 時間、 $5.4 \pm 3.4 \times 10^{-7}$ M, 24 時間、 $6.03 \pm 4.2 \times 10^{-8}$ M, 48 時間、 $1.43 \pm 1.2 \times 10^{-8}$ M, 72 時間、感度以下 (10^{-8}

M 以下) であった。

II. 臨床成績

1. MAC 療法と MOA 療法の治療効果の比較

MAC 療法と HM 細胞に対する I の成績を基にした MOA 療法 (表 1) の絨毛癌に対する治療効果の比較は表 2 に示す。

MAC 療法で治療した絨毛癌は 39 例で、転移性絨毛癌 33 例中、CR 22 例 66.7%, PR 1 例 3.0%, NC 7 例 21.2%, PD 3 例 9.1%, 非転移性絨毛癌 6 例中、CR 6 例 100% であった。転移性絨毛癌で CR の症例 22 例中 8 例 36.4% が再発, MAC 療法で再治療時、CR 1 例 12.5%, PR 3 例 37.5%, NC 4

表 1 MOA protocol

D ₁	MTX	150 mg (bolus) 300 mg (drip infusion) for 4 hours
	Oncovin	2 mg (bolus)
	Act-D	0.5 mg (bolus)
D ₂	Act-D	0.5 mg
	Leucovorin	15 mg (im) × 2
D ₃	Act-D	0.5 mg
	Leucovorin	15 mg (im)
D ₄₋₅	Act-D	0.5 mg

表 2 Comparison of response rate between MAC and MOA

		Metastasis	No. of cases	Response			
				CR	PR	NC	PD
MAC (39 cases)	Initially treated with MAC	(+)	33	22	1	7	3
		(-)	6	6	0	0	0
	Recurrent	(+)	8	1	3	4	0
		(-)					
MOA (5 cases)	Initially treated with MOA	(+)					
		(-)	3	3	0	0	0
	Recurrent	(+)	2	2	0	0	0
		(-)					

表 3 Result of MOA protocol for choriocarcinoma

Case	Age	Antecedent Pregnancy	Pretreatment U-hCG (IU/l)	Metastasis	Previous Chemotherapy	Response
O. T.	32	FTD	3,200	Lung	MAC, Act-D+CPM MTX+VCR+BLM+CDDP	CR
S. T.	49	HM	3,200	Lung	MAC	CR
Y. K.	38	FTD	102,400	(-)	(-)	CR
S. Y.	44	FTD	256,000	(-)	(-)	CR
S. S.	52	HM	25,600	(-)	(-)	CR

FTD : Full term delivery HM : Hydatidiform mole

例50%であつた。

MOA療法で治療した絨毛癌は5例で(表3)初回治療としてMOA療法を行つた非転移性絨毛癌3例中, CR 3例, 100%である。また, MAC療法で寛解後再発, MAC療法で再治療時PRであ

つた2例に対しても, CR 2例, 100%であつた。

2. 症例

O.T. 32歳, 2G1P

臨床経過は表4に示すが, 1976年8月胞状奇胎内容除去, 同10月奇胎後続発症(臨床的侵入奇胎)にて, Act-D 2コース, MTX+Act-D 2コース, MAC 4コースで寛解したが, 1年後hCG再上昇, MAC 4コースで寛解した。1980年6月, 2,660gの女児を正期産にて出産。産後4カ月で, hCG再上昇, Act-D+CPM 4コースで寛解, しかし10カ月後に再発, 子宮摘出し, 絨毛癌と診断された。その後の治療法と尿中, 血中hCGの推移は図6に示す。

尿中hCGは子宮摘出により急速に下降, LHレベルに達した。血中hCGはMAC 2コース, Act-D+CPM 4コースでLHレベルに下降したが, 治療による一過性上昇(細胞効果)が消失しないため, MTX+CDDP+VCR+BLMの四剤併用に変更, 6コース施行するも細胞効果は消失せず, 血中hCGは休薬期間中に10mIU/ml以上の値をとり, 上昇傾向がみられた。患者の希望により, 休薬, その間に尿中hCGは3,200IU/lと再上昇したのでMOA療法を行つた。これにより血中hCG

表4 Case O.T. 32y 2G1P

76—8	Hydatidiform mole
76—10~77—4	Trophoblastic sequelae Undetermined { Act-D 2C. MTX+Act-D 2C. Triple 4C. →Remission
78—2~4	Recurrence (I) Triple 4C. →Remission
80—6	Normal vaginal delivery 2,660g (♀)
80—10~12	Recurrence (II) Act-D+CPM 4C. →Remission
81—12~83—4	Recurrence (III) Chorio carcinoma { hysterectomy, triple 2C. Act-D+CPM 4C. MTX+CDDP+VCR+BLM 6C. MTX+Act-D+VP+CPM+VCR 2C. MTX+VCR+Act-D 6C. →Remission

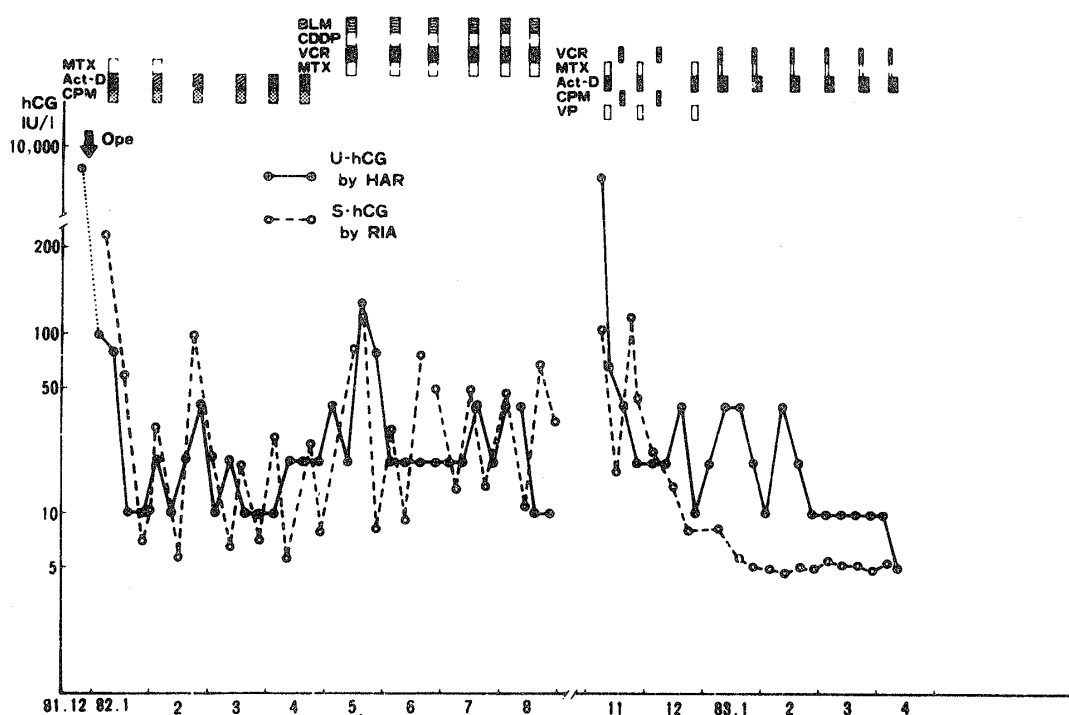


図6 O.T. 32y choriocarcinoma

は LH レベルに低下, 細胞効果消失し, 5 コースの追加化学療法を行つた後, 退院。3年後の現在まで再発の徴候はみられない。

考 案

絨毛癌に対するもつとも有効な薬剤は, MTX と Act-D であり, 初回治療は, この二剤の併用, あるいはアルキル化剤を加えた三剤併用療法 (MAC) で行うのが一般的であるが, 転移性絨毛癌の寛解率は未だ十分とはいえない⁷⁾。MAC 療法で寛解が得られない場合, 現在, かかる症例に対しては確立した治療法はなく, 薬剤の選択に困惑することが少なくない⁸⁾。

では, MAC 抵抗性の判定はどの時点で行うべきであろうか。我々は, 数コースの治療で hCG が LH レベルに下降しない場合, MAC 抵抗性と判断して, 治療法の変更を行つてきた。しかし, MAC 抵抗症例=MTX 抵抗症例とは考えていない。

MTX 耐性機序には, 細胞質の変化による MTX 取り込み低下, 放出亢進, dihydrofolate reductase (DHFR) の量的, 質的变化などが考えられているが¹⁰⁾¹⁷⁾¹⁸⁾²¹⁾, 取り込みの低下に対しては, 細胞外 MTX 濃度の上昇, すなわち MTX 投与量の増加により, ある程度克服可能である。MAC 療法に用いる MTX 15~20mg の投与量で得られる血中濃度は, 10^{-7} ~ 10^{-8} M であり⁴⁾, この濃度では増殖抑制効果がなくとも 10^{-6} M で細胞増殖が抑制される絨毛癌細胞株もあり, この濃度は, moderate dose MTX の投与で達成可能である。実際, 最近の MTX を含むプロトコールには, moderate dose MTX を使用するものが多い¹¹⁾¹⁵⁾¹⁶⁾²²⁾。したがって臨床的には, 少なくとも moderate dose MTX (1g 以下) を投与しても寛解が得られない場合に, MTX 抵抗症例と考えるべきである。

また, MTX 耐性機序の一つに, DHFR の量的増加があるが, 今回実験に用いた, 多剤抵抗性絨毛癌患者の肺転移巣より樹立した HM 細胞を抗癌剤で処理し, 経時的に DHFR 活性の変化をみると, 薬剤処理後 6~9 時間でピークをとり, 特に MTX 10^{-5} M 処理 24 時間後には, コントロールの約 2 倍の活性を示した。

このことは, DHFR の量的増加, 質的变化とともに, MTX と接触後, 比較的短時間に DHFR 活性が上昇することも, MTX 耐性機序の一因子である可能性も考えられた。さらに, Act-D 10^{-8} M 処理, 24 時間後の DHFR 活性はコントロールの約 2/3 であり, MTX 10^{-5} M と Act-D 10^{-8} M を併用すると, 24 時間後に酵素活性は, コントロールの約 1/2 に低下した。Act-D の併用は, Act-D 自体の抗腫瘍効果とともに, その機序は不明であるが, DHFR 活性の上昇を抑え, 間接的に MTX の抗腫瘍効果を増強させることも考えられた。HM 細胞に対する細胞増殖, ³H-deoxyuridine 取り込みからみた抗腫瘍効果は, 今回検討した薬剤の組合わせの中では, MTX 10^{-5} M と Act-D 10^{-8} M の併用が最大であり, ノードマウスに移植した HM 細胞の実験化学療法の結果 MTX に Oncovin の併用が抗腫瘍効果が強いことより, MTX 450mg + Oncovin 2mg + Act-D 0.5mg の三剤併用療法—MOA 療法—のプロトコールを作製, これを絨毛癌 5 例に行い, MAC 療法を行つた絨毛癌 39 例と治療効果を比較した。非転移性絨毛癌に対しては, MAC, MOA 療法とも CR 100% であつた。しかし, 転移性絨毛癌に対しては, MAC 療法, 33 例中 CR 22 例 66.7% であり, うち 8 例 36.4% が再発した。MAC 療法で再治療時, CR 1 例, 12.5%, PR 3 例 37.5%, NC 4 例 50% と十分な効果が得られなかつた。

MOA 療法で治療した転移性絨毛癌は, MAC 療法で PR の症例であるが, 2 例とも CR であつた。現時点において, 絨毛癌に対しては, MOA 療法は MAC 療法より有効であると考えられるが, 今後, 多数の症例の治療成績が出た時に, 両者の優劣がはつきりしてくるであろう。

文 献

1. 加藤孝子, 遠藤信夫, 小林 治, 高見沢裕吉: 薬剤抵抗性絨毛癌に対する超大量 Methotrexate 療法。産婦治療, 43: 253, 1981.
2. 加藤孝子, 石毛英男, 小林 治, 高見沢裕吉, 田中 昇, 時田尚志: 薬剤抵抗性絨毛癌継代ノードマウスを用いた実験化学療法。日産婦誌, 33: 2055, 1981.
3. 加藤 俊: 婦人科がん化学療法の直接効果判定基

- 準. 日本癌治療学会癌治療効果判定基準作成委員会, 癌治療に関する合同委員会, 東京, 1983.
4. 小林 治, 加藤孝子, 岩沢博司, 石毛英男, 高見沢裕吉: Low risk 絨毛性疾患に対する化学療法の比較検討. 産婦治療, 47: 115, 1983.
 5. 大星章一, 吉田紘一, 清藤 勉, 下里幸雄, 小出 勉, 佐野量造, 北岡久三: 胃悪性絨毛上皮腫細胞培養株の樹立とその in vitro ゴナドトロピン産生. 日本癌学会総会記事, 59, 1972.
 6. 鈴森謙次, 杉本美絵, 鈴森 薫, 八神喜昭, 松山睦司: ヒト絨毛癌細胞株の in vitro 培養系における樹立. 日本癌学会総会記事, 178, 1981.
 7. 高見沢裕吉, 小林 治, 遠藤信夫, 加藤孝子: 絨腫の化学療法. 産婦治療, 42: 63, 1981.
 8. 高見沢裕吉, 小林 治, 加藤孝子, 城武昇一, 遠藤信夫, 石毛英雄: 絨毛性疾患再発に関する研究. 日産婦誌, 34: 1729, 1982.
 9. 高見沢裕吉, 小林 治, 城武昇一, 石毛英男, 関谷宗英: 絨毛癌の再発と治療. 産婦の実際, 33: 197, 1984.
 10. 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.
 11. Bagshawe, K.D.: Treatment of trophoblastic tumors. Anñ. Acad. Med., 5: 273, 1976.
 12. Ball, C.R., Poynter, R.W. and Berg, H.W.: A novel method for measuring incorporation of radioactive precursors into nucleic acids and proteins of cells in monolayer culture. Anal Biochem., 46: 101, 1972.
 13. Bertino, J.R., Perkins, J.P. and Johns, D.J.: Purification and properties of dihydrofolate reductase from Ehrlich ascites carcinoma cells. Biochemistry, 4: 839, 1965.
 14. Nakamoto, O.: Properties of strain cells of the uterine invasive mole and its metastatic choriocarcinoma. Asia-Oceania J. Obstet. Gynecol., 6: 177, 1980.
 15. Newlands, E.S.: New chemotherapeutic agents in the management of gestational trophoblastic disease. Semin Oncol., 9: 239, 1982.
 16. Newlands, E.S. and Bagshawe, K.D.: The role of VP16-213 (etoposide: NC-141540) in gestational choriocarcinoma. Cancer Chemother Pharmacol., 7: 211, 1982.
 17. Niethammer, D. and Jackson, R.C.: Changes of molecular properties associated with the development of resistance against methotrexate in human lymphoblastoid cells. Eur. J. Cancer, 11: 845, 1975.
 18. Ohnoshi, T., Ohnuma, T., Takahashi, I., Scanlon, K., Kamen, B.A. and Holland, J.F.: Establishment of methotrexate-resistant human acute lymphoblastic leukemia cells in culture and effects of folate antagonists. Cancer Res., 42: 1655, 1982.
 19. Sekiya, S., Kaiho, T., Shirotake, S., Iwasawa, H., Takeda, B. and Takamizawa, H.: Establishment and properties of a human choriocarcinoma cell line of ovarian origin. In vitro, 19: 489, 1983.
 20. Sekiya, S., Shirotake, S., Kaiho, T., Iwasawa, H., Kawata, M., Higaki, K., Ishige, H., Takamizawa, H. and Minamihisamatsu, M.: A newly established human gestational choriocarcinoma cell line and its characterization. Gynecol. Oncol., 15: 413, 1983.
 21. Sirotnak, F.M., Urita, S. and Hutchison, D.J.: On the nature of a transport alteration determining resistance to amethopterin in the L-1210 leukemia. Cancer Res., 28: 75, 1968.
 22. Surwit, E.A. and Hammond, C.B.: Treatment of metastatic trophoblastic disease with poor prognosis. Obstet. Gynecol., 55: 565, 1980.
(No. 5982 昭61・6・3受付)