

子宮頸癌由来細胞株に対する5-FUの感受性に関する基礎的検討 —扁平上皮癌と腺癌の比較—

大阪医科大学産科婦人科学教室 (主任: 杉本 修教授)

植田 政嗣 御前 治 山田 隆司
岡本 吉明 後藤 真樹 前田 隆義
岡村 信介 植木 実 杉本 修

In Vitro Studies of 5-FU Sensitivity on Uterine Cervical Cancer Cell Lines

—Comparison between Squamous Cell Carcinoma and Adenocarcinoma—

Masatsugu UEDA, Osamu MISAKI, Takashi YAMADA,
Yoshiaki OKAMOTO, Masaki GOTO, Takayoshi MAEDA,
Shinsuke OKAMURA, Minoru UEKI and Osamu SUGIMOTO
Department of Obstetrics and Gynecology, Osaka Medical College, Osaka
(Director: Prof. Osamu Sugimoto)

概要 教室では頸癌術後患者に対する Tegafur による oral adjuvant chemotherapy の有用性を報告してきたが、頸部腺癌は依然予後不良である。そこで頸部腺癌細胞に対する5-FUの効果を明らかにする目的で、扁平上皮癌細胞との比較を中心に以下の基礎実験を行った。

頸部扁平上皮癌株 (OMC-1) および同腺癌株 (OMC-4) を用いた。これらの5-FU感受性を増殖曲線抑制法により検討し、0.1~10 μ g/mlの5-FU 96時間作用後の殺細胞効果を調べた。また0.1 μ g/mlの5-FU 96~192時間作用後の両細胞の形態学的変化を観察した。5-FU 96時間作用後の両細胞に対するDNA合成抑制効果は、de novo経路の前駆体である³H-deoxyuridineの取り込み動態を Ball et al.の方法で測定した。さらに0.1 μ g/mlの5-FU 96時間作用後の両細胞内FdUMP量およびthymidylate synthetase (TS) 阻害率を³H-FdUMPを用いた radioassay法により測定した。

増殖曲線抑制法から求めた5-FUの50%増殖抑制濃度はOMC-1 0.13 μ g/ml, OMC-4 9.1 μ g/mlで、OMC-4の5-FU感受性はOMC-1に比べ極めて低く、形態学的にも5-FUによる変性所見はOMC-1で著明であった。また、核酸前駆物質取り込み率をcontrolを100%として求めると、0.1 μ g/mlの5-FUでOMC-1では50%以下に抑制されたが、OMC-4では75%であった。一方5-FU作用後の細胞内FdUMP量はOMC-1 4.7pmol/g, OMC-4 2.6pmol/g以下であり、TS阻害率はOMC-1 58.7%, OMC-4 60.0%であった。

以上から、in vitroにおいても頸部腺癌細胞の5-FU感受性は扁平上皮癌細胞に比べ低いことが判明した。また低用量の5-FU投与下で両細胞のde novo経路の抑制率に相違が認められたが、TS阻害率には差がなく、これらの5-FU感受性を左右する因子としては細胞内FdUMP量が重要であることが示唆された。

Synopsis In order to improve the postoperative survival rate of patients with cervical cancer, we have treated them with adjuvant chemotherapy (oral Tegafur) and proved this treatment to be useful. However, the prognosis of cervical adenocarcinoma cases has not been improved yet.

In this study, 5-FU sensitivity, morphological changes and DNA metabolism of cultured cervical cancer cells were examined using OMC-1 and OMC-4 cell line originating from cervical squamous cell carcinoma and adenocarcinoma, respectively.

The EC 50 (Effective Concentration for 50% Cell Kill) of 5-FU on OMC-1 and OMC-4 cells after 96 hours of incubation with 5-FU was 0.13 μ g/ml and 9.1 μ g/ml, respectively. The morphological changes were more prominent in OMC-1 cells than in OMC-4 cells after 192 hours of incubation with 0.1 μ g/ml of 5-FU.

The incorporation of ^3H -deoxyuridine into the DNA was inhibited more significantly in OMC-1 cells than in OMC-4 cells even at a low concentration of 5-FU. The intracellular FdUMP and thymidylate synthetase (TS) inhibition rate of OMC-1 and OMC-4 after 96 hours of incubation with $0.1\mu\text{g/ml}$ of 5-FU was 4.7pmol/g and $<2.6\text{pmol/g}$, 58.7% and 60.0%, respectively.

These results suggest that 5-FU sensitivity of cervical adenocarcinoma cell line (OMC-4) is lower than that of cervical squamous carcinoma cell line (OMC-1) and it may owe much not to the TS inhibition rate but to the intracellular FdUMP.

Key words: Cervical cancer • Cultured cells • 5-FU sensitivity • DNA metabolism

緒 言

教室では、子宮頸癌術後患者に対して Tegafur による oral adjuvant chemotherapy (adj. chem) を行い、その優れた再発抑制効果を証明してきた³⁾⁴⁾⁶⁾¹¹⁾¹²⁾¹⁵⁾¹⁹⁾。また基礎的には、Tegafur の活性型である 5-fluorouracil (5-FU) の低用量持続投与が頸癌培養細胞の増殖を *in vitro* で抑制し得ることを報告してきた⁴⁾¹⁰⁾。しかし、これまでの検討は主として扁平上皮癌に対するものであり、頸部腺癌に対する本療法の効果に関しては、症例数も扁平上皮癌に比べて少ないことからいまだ十分には解明されていなかった。一方、adj. chem の効果は risk (Z) 値、とりわけ遺残癌組織量に大きく左右されるが、組織型にも関連することが判明している。すなわち扁平上皮癌に比べて腺癌では adj. chem の効果がやや劣り、その予後も依然不良であることが今後の本療法施行上の問題点となつて⁶⁾¹²⁾。したがって、扁平上皮癌と腺癌での 5-FU 感受性の相違とその原因を明らかにしていくことが現在極めて重要である。そこで、本研究ではまず *in vitro* において頸部扁平上皮癌および腺癌細胞の 5-FU 感受性を比較するとともに、5-FU が両者の DNA 合成経路に対していかなる作用機転を有するかを解析した。

研究方法

使用培養株：当研究室で樹立した頸部扁平上皮癌株 (OMC-1)⁹⁾ および頸部腺癌株 (OMC-4)²⁰⁾ を用いた。

培養法：10% 新生仔牛血清（三菱化成，東京）および $25\mu\text{g/ml}$ Kanamycin（明治製菓，東京）を添加した Ham's F-12 培地（Flow Laboratories Inc., U.S.A.）を培養液として用いた。すべて 37°C 、5% 炭酸ガス培養器中で静置単層培養した。

使用薬剤：Tegafur の活性型である 5-

fluorouracil (5-FU)（協和発酵，東京）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 vivo* における血中および組織中濃度¹¹⁾¹²⁾を参考にして 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, $10.0\mu\text{g/ml}$ に設定した。

実験方法：

1. 5-FU 感受性の測定

OMC-1 および OMC-4 を各濃度の 5-FU 加培養液中で培養し生残率を測定した。すなわち、 3.5cm 径の plastic dish (Falcon, U.S.A.) に各々約 1×10^5 個/2ml の細胞を植え込み 72 時間培養後、対数増殖期に入つた時点で各濃度の 5-FU 加培養液に交換した。48, 96, 144 時間後に 2 dish の細胞数を算定し、その平均をもつて対照群、薬剤負荷群の増殖曲線を作成した。また細胞数算定時に残りの dish すべての培地交換を行つた。次に 5-FU 96 時間作用後における薬剤負荷群細胞数の対照群細胞数に対する割合を Surviving 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。各々の細胞について得られた dose response curve より 50% 増殖抑制濃度 (EC 50; Effective Concentration for 50% Cell Kill) を求め、それらの 5-FU 感受性を比較した。

2. 形態学的観察

OMC-1 および OMC-4 約 5×10^4 個/ml を Lab-Tek 2 chamber slide (Lux, U.S.A.) に植え込み、72 時間培養後 $0.1\mu\text{g/ml}$ の 5-FU 加培養液に交換した。さらに 96~192 時間培養後、エーテル・エタノール等量混合液で固定し、Papanicolaou 染色を行つて検鏡した。

3. 核酸前駆物質取り込み動態

5-FU 作用後の OMC-1 および OMC-4 の核酸前駆物質取り込み動態を、*de novo* 経路の前駆体である ^3H -deoxyuridine (^3H -dUrd) (New England

Nuclear Corp., U.S.A.) を用い, Ball et al. の方法¹³⁾に従って検討した. すなわち, 滅菌した scintillation vial (Weaton, U.S.A.) に各々約 1×10^5 個/2ml の細胞を植え込み72時間培養後, 対数増殖期に入つた時点で各濃度の5-FU 加培養液に交換しさらに96時間培養した. これらをリン酸緩衝液 (PBS) で洗浄後, ^3H -dUrd $1\mu\text{Ci/ml}$ を添加して 1 時間細胞 DNA をパルスラベルした. 冷 PBS 次いで冷1.5%過塩素酸で洗浄した後, 純 ethanol 10ml を添加し10分後に除去した. さらに 5 %過塩素酸1ml を添加し80℃, 40分間加温後 4℃で冷却した. これらに Triton-X scintillator 10ml を添加し細胞中に取り込まれた ^3H -dUrd の放射活性を liquid scintillation counter (TRI-CARB 300c, Packard, U.S.A.) で測定した.

4. 細胞内 FdUMP 量および TS 阻害率の測定

5-FU 作用後の OMC-1および OMC-4の細胞内 5-fluoro-2'-deoxyuridine-5'-monophosphate (FdUMP) 量と thymidylate synthetase (TS) 阻害率を, ^3H -FdUMP (Moravsek Biochem., U.S.A.) を用いた radioassay 法により測定した.

まず各々約 2×10^7 個の細胞を $0.1\mu\text{g/ml}$ の5-FU 加培養液で96時間培養後, 細胞を剝離, 遠沈した. 沈渣にホモジネート buffer (0.2M Tris-HCl, 20mM 2-mercaptoethanol, 15mM CMP, 100mM NaF, pH 7.4) 2ml を加え, ポリトロンホモジナイザーにて homogenize した後 sonicate (20秒間, 3回) して得られたサンプルを以下の測定に供した.

FdUMP の測定は, まず上記サンプル $500\mu\text{l}$ に $5,000\text{dpm}$ の ^3H -FdUMP, 1M 酢酸1ml を加えよく混和した後, 4℃, $3,000\text{rpm}$ で10分間遠心し上清を採取した. この上清を凍結乾燥したものを1ml の H_2O で再溶解し, DEAE セルロースカラム (3cm) に apply した後, NH_4HCO_3 で溶出させサンプル中の FdUMP を精製した. これをさらに凍結乾燥し, FdUMP測定用buffer (5mM KH_2PO_4 , pH 7.4) に再溶解した後, ^3H -FdUMP (12pmol/ml), TS, CH_2FH_4 を添加し25℃, 4 時間反応させた. DCC にて B/F 分離後 B 中の放射活性を liquid scintillation counter で測定した. TS の測

定は, 細胞を sonicate して得られたサンプルを 4℃, $16,000\text{rpm}$ で 4 時間遠心しサイトゾール画分を採取した. これに TS 測定用 buffer (0.3M NH_4HCO_3 , 100mM 2-mercaptoethanol, 100mM NaF, 15mM CMP, pH 8.0), ^3H -FdUMP (120pmol/ml), CH_2FH_4 を添加し30℃, 20分間反応させた. DCC にて B/F 分離後 B 中の放射活性を測定し, TS free^{app} (見かけの free TS) を求めた. TS total の測定は, TS 測定用 buffer 存在下で30℃, 3 時間 preincubation しサイトゾール中の TS と FdUMP の結合をあらかじめ切断後, 同様に測定した. 実際の TS free は次式により求められる.

$$\begin{aligned}\text{TS free} &= \text{TS total} - \text{TS bind} \\ &= (\text{TS free}^{\text{app}} - 0.13 \text{ TS total}) / 0.87\end{aligned}$$

TS 阻害率は TS bind の TS total に対する割合から算出した. 以上の過程は Spears et al. の方法¹⁷⁾¹⁸⁾に準じて行つた.

研究成績

1. 5-FU 感受性

OMC-1および OMC-4の5-FU による増殖抑制曲線 (図1, 2) から得られた5-FU 96時間作用後における dose response curve を図3に示した. EC50値は OMC-1で $0.13\mu\text{g/ml}$, OMC-4で $9.1\mu\text{g/ml}$ となり, OMC-4の5-FU 感受性が OMC-1に比

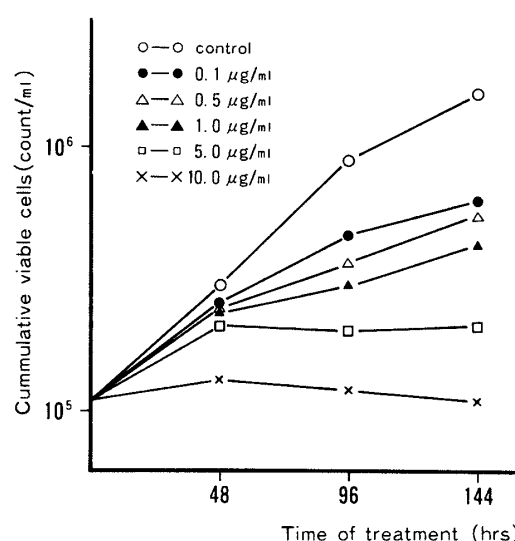


図1 OMC-1の5-FU による増殖抑制曲線: OMC-1 約 1×10^5 個を各濃度の5-FU 加培養液中で培養し, 対照群および薬剤負荷群の増殖曲線を作成した.

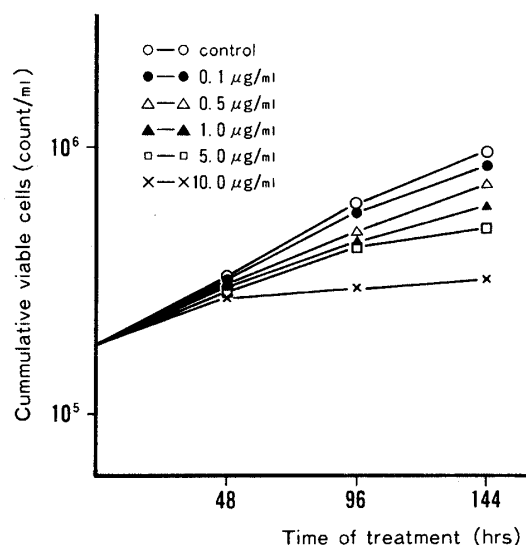


図2 OMC-4の5-FU による増殖抑制曲線：OMC-4 約 1×10^5 個を各濃度の5-FU 加培養液中で培養し、対照群および薬剤負荷群の増殖曲線を作成した。

べて極めて低いことが判明した。

2. 形態学的変化

0.1 $\mu\text{g/ml}$ の5-FU 192時間作用後の OMC-1 および OMC-4 の細胞形態を写真 1 および 2 に示した。OMC-1 では control に比べて核は膨化し、核小体の明瞭化、核小体周辺の空隙形成などが観察

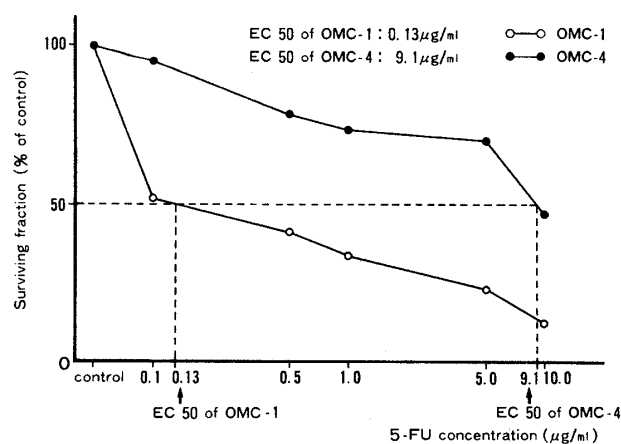


図3 5-FU の OMC-1 および OMC-4 に対する殺細胞効果：OMC-1 および OMC-4 の5-FU による増殖抑制曲線から、5-FU 96時間作用後における dose response curve を作成し、各々の EC 50 値を求めた。

され、低濃度の5-FU でも長時間作用させることにより OMC-1 では著しい変性所見がみられた。一方 OMC-4 ではやや核の膨化がみられるもののその変化は極めて軽度であり、形態学的にも OMC-4 の5-FU 感受性が OMC-1 に比べて低いことが判明した。

3. 核酸前駆物質取り込み動態

OMC-1 および OMC-4 の5-FU 96時間作用後に

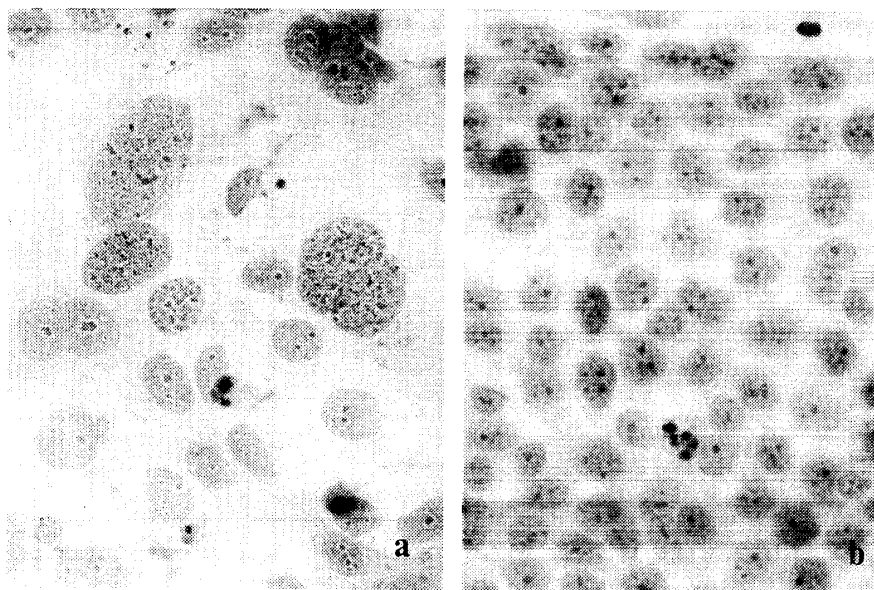


写真1 培養細胞所見 (OMC-1) (Pap. 染色, $\times 400$) : 0.1 $\mu\text{g/ml}$ の5-FU 192時間作用後の OMC-1 の形態学的変化を示した (a)。control (b) に比べて核は膨化し、核小体の明瞭化、核小体周辺の空隙形成、細胞質の融解など、著しい変性所見がみられた。

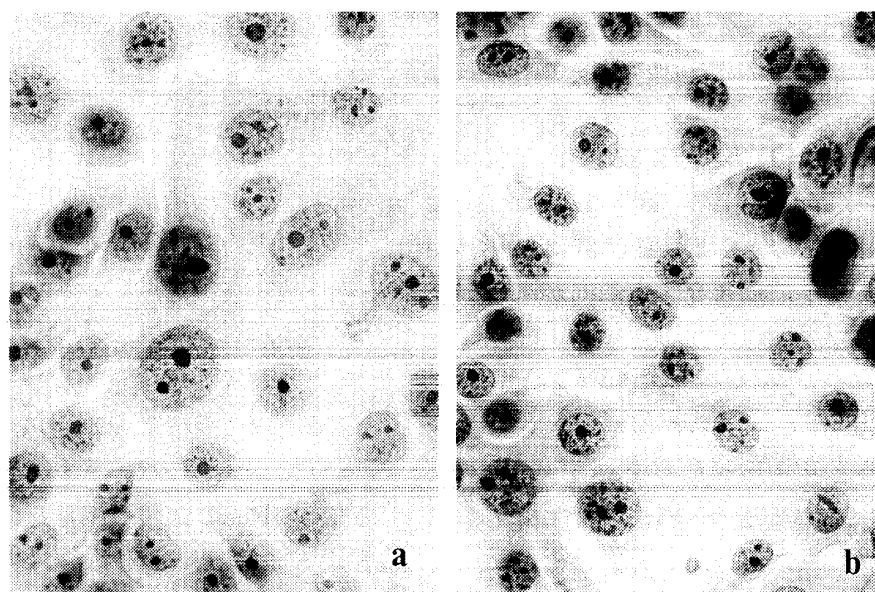


写真 2 培養細胞所見(OMC-4) (Pap. 染色, $\times 400$): $0.1 \mu\text{g/ml}$ の 5-FU 192 時間作用後の OMC-4 の形態学的変化を示した (a), control (b) に比べてやや核の膨化がみられるものの核小体や細胞質の変化は軽度であり, 著しい変性所見はみられなかった。

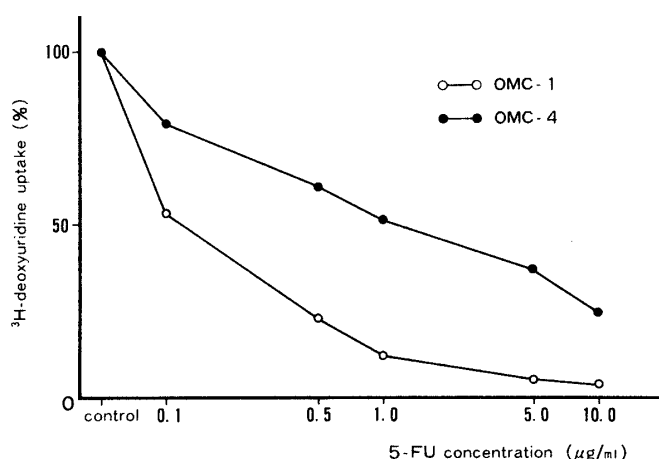


図 4 5-FU 作用後における OMC-1 および OMC-4 に対する ^3H -deoxyuridine の取り込み: OMC-1 および OMC-4 約 1×10^5 個を各濃度の 5-FU 加培養液中で 96 時間培養後, 対照群および薬剤負荷群に対する ^3H -deoxyuridine の取り込みを測定し, 対照群を 100% として示した。

おける核酸前駆物質取り込み率は, control を 100% として示した(図 4), $0.1 \mu\text{g/ml}$ では OMC-1 で 53%, OMC-4 で 79%, $0.5 \mu\text{g/ml}$ ではそれぞれ 23%, 61% であり, 5-FU 作用後の ^3H -dUrd の細胞 DNA への取り込みは, 低濃度においても OMC-1 でより強く抑制された。

4. 細胞内 FdUMP 量および TS 阻害率

$0.1 \mu\text{g/ml}$ の 5-FU 96 時間作用後の細胞内 FdUMP 量は OMC-1 が 4.7 pmol/g , OMC-4 が 2.6 pmol/g 以下であり, TS 阻害率は OMC-1 が 58.7%, OMC-4 が 60.0% であつた。このように両細胞間で TS 阻害率にはほとんど差が認められなかったが, 5-FU 感受性の高い OMC-1 で細胞内 FdUMP 量がより多いことが判明した。

考 案

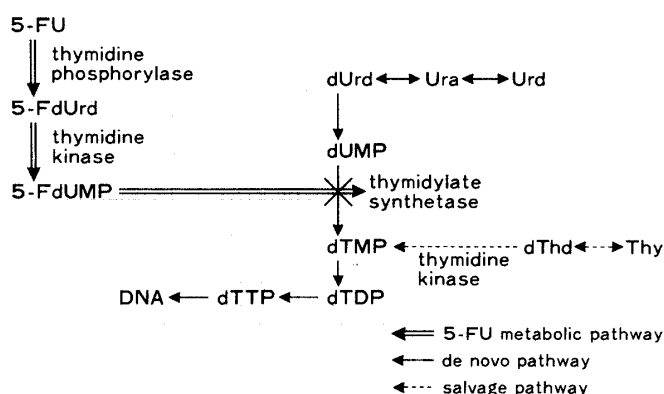
教室では子宮頸癌術後患者の治療成績を向上させる目的で, 臨床進行期 Ib 期以上の症例を再発のリスクに応じて群別管理し, 再発の可能性の高い症例には Tegafur の経口投与による adj. chem を行い効果を上げてきた³⁾⁴⁾⁶⁾¹¹⁾¹²⁾¹⁵⁾¹⁹⁾。また低用量 5-FU の長期投与下において癌細胞の cell cycle や増殖速度が遅延すること, および耐性化も生じにくいことを頸部扁平上皮癌培養細胞 (SKG-IIIb)¹⁶⁾ を用いた in vitro 実験で証明し, adj. chem が術後の遺残病巣の再増殖を細胞レベルで長期間にわたって抑制し得ることを基礎的に裏づけた⁴⁾¹⁰⁾。しかし頸部腺癌に関しては依然予後不良であり, 今後の本療法施行上の問題点であると考えられる⁶⁾¹²⁾。実際昭和 53 年以降, われわれの判別式

により high risk group (risk II, III 群) と判定され, adj. chem を行つて prospective に予後追跡した全322症例での再発率を扁平上皮癌と腺癌で比較してみると, risk II+III 群全体ではそれぞれ 40%, 56%, risk III 群では40%, 60%であつた。また risk 値が同程度であつても腺癌症例は扁平上皮癌症例に比べより早期に再発する傾向がみられている。

このような観点から, 頸部腺癌に対する adj. chem の効果とその問題点を明らかにしていくことが現在急務であると考えられたので, まず, in vitro における頸部腺癌細胞の5-FU 感受性を扁平上皮癌細胞と比較した。in vitro 実験を行うためには origin の明確な培養細胞株が必須である。頸部腺癌株については本邦でも最近樹立の報告が散見されるようになったが²⁷⁾, その数は少なく, 多数の株について検討することはまだ困難である。そこで本研究では同一施設で樹立され, かつ同一条件で維持・継代されている当研究室の OMC-1および OMC-4を比較に適した実験モデルとして用いた。

その結果, 増殖曲線抑制法から求めた5-FU の 50%増殖抑制濃度は OMC-1 0.13 μ g/ml, OMC-4 9.1 μ g/ml で, OMC-4の5-FU 感受性は OMC-1に比べて極めて低いことが判明した。これは5-FU 作用後の形態学的変化からも裏づけられた。したがって in vitro においても頸部腺癌細胞の5-FU 感受性は低いと考えられたが, adj. chem の原理から言うと, 低濃度の5-FU 存在下で持続的に培養した場合に細胞がいかなる増殖動態を示すかがむしろ重要である。われわれは SKG-IIIb 細胞を 0.1 μ g/ml の5-FU 加培養液で 2年以上の長期間にわたって培養した結果, その5-FU 感受性は変化しないが, 増殖速度は著しく遅延することを報告した¹⁰⁾。この点に関して, OMC-4を同様の条件下で約 1年間培養したが, OMC-4ではその5-FU 感受性はもとより増殖速度もほとんど変化しなかつた(未発表データ)。これらの事実から, 少なくとも in vitro においては, 頸部腺癌細胞に対する5-FU の増殖抑制効果は扁平上皮癌細胞に比べて劣るものと考えられた。

表1 pyrimidine nucleotide および5-FU の代謝経路



さて, 5-FU の作用機序としては, DNA 合成を阻害する経路¹⁷⁾¹⁸⁾と RNA の代謝異常をおこす経路¹⁴⁾とが存在する。しかし低濃度有効量を維持する臨床的投与法においては, 前者の経路がより重要であると考えられている¹⁵⁾⁸⁾¹⁷⁾¹⁸⁾。すなわち表1に示したように, 5-FU は thymidine phosphorylase により 5-fluoro-2'-deoxyuridine (5-FdUrd) となり, さらに thymidine kinase によりリン酸化されて 5-fluoro-2'-deoxyuridine-5'-monophosphate (5-FdUMP) となる。この, 5-FdUMP (FdUMP) が, deoxyuridine (dUrd) を前駆体とする de novo 経路において, deoxyuridine-monophosphate (dUMP) から deoxythymidine-monophosphate (dTMP) を生成する酵素である thymidylate synthetase (TS) と結合することにより, DNA 合成阻害作用が発現される。そこで OMC-1および OMC-4に対する 5-FU の DNA 合成抑制効果について³H-dUrd の取り込み率を比較したところ, その取り込みは低濃度の5-FU においても OMC-1でより強く抑制された。したがって, OMC-1と OMC-4での5-FU 感受性の相違は5-FU による de novo 経路の阻害効果の差異によると考えられた。この点をより明確にするために, 低濃度の5-FU 作用後の細胞内 FdUMP 量および TS 阻害率を測定したところ, TS 阻害率は両細胞において差がなく, 一方5-FU 感受性の高い OMC-1において細胞内 FdUMP 量がより多いという結果が得られた。

藤田¹⁾および須賀ら⁸⁾は5-FU の生態内動態とその腫瘍への作用機序に関する検討で, 5-FU の少

量持続投与ではFdUMPのTS阻害によるDNA合成抑制が主体であり、その抗腫瘍効果を左右する因子として腫瘍組織内FdUMP量が重要であると述べている。一方中村ら⁵⁾はTS阻害率と腫瘍増殖抑制との関連を追求し、5-FUの低濃度有効量を維持する通常の臨床的投与法においては、両者が良好な相関関係を有することを報告している。このようにadj. chemを含めた5-FUの低用量持続投与法において、de novo経路の抑制効果が主体であることには異論がないようである。しかし、その抗腫瘍効果が組織(細胞)内FdUMP量とTS阻害率のどちらによく相関するかは明確ではない。今回の検討では、OMC-1およびOMC-4において³H-dUrdの取り込み率に相違がみられたにもかかわらず、TS阻害率は両細胞において差がなく、これらの5-FU感受性を左右する因子としては細胞内FdUMP量が重要であるとの結論を得た。この点については、表1に示したように、DNA合成経路にはthymidine (Thy)を前駆体としてdTMPを生成するsalvage経路も存在することに留意すべきであると思われる。すなわち5-FU負荷時の細胞のthymidine利用率が異なれば、TS阻害率が同じであつてもdUrdの利用率に変化を生じる可能性は十分考えられるからである。さらに5-FUの同化、異化過程やDNA合成経路には他の多くの酵素が関与しており、5-FU負荷時のそれらの活性値についても詳細に検討する必要がある。とくにFdUMPの生成ならびにThyを基質としてdTMP poolの補充に関与するthymidine kinase活性が重要であると考えられるので、今後の検討課題としたい。

以上、われわれの研究室で樹立した頸癌培養細胞株を実験モデルとして、その5-FU感受性を扁平上皮癌と腺癌細胞で比較するとともに、両者のDNA合成経路に対する5-FUの作用機転について基礎実験を行い報告した。今回の検討は2株のみの比較なので、無論頸部腺癌に対する5-FUの効果について確定的な結論は導き得ない。今後はより多くの頸部腺癌細胞株に関して扁平上皮癌株との比較を行っていくことは勿論であるが、それらの5-FU感受性を決定する因子として何を指標

にするのが最もよいのかを検索していきたい。他方、臨床的には、5-FU製剤をあらかじめ投与後手術摘出標本中のFdUMP量あるいはTS阻害率を測定することにより、個々の症例に対するadj. chemの効果を予測することも可能と思われる。これらの詳細な検討を通じて、頸部腺癌に対する薬剤の投与量や期間を再検討していくことが重要と考えられた。

文 献

1. 藤田 浩：弗化ピリミジン化合物の生体内動態。癌と化療，11：2307, 1984.
2. 早川 修，小泉基生，山内 修，山本裕之，工藤隆一，橋本正淑：ヒト子宮頸部腺癌培養細胞株(CAC-1)の樹立と抗癌剤感受性について。日産婦誌，39：S-334, 1987.
3. 前田隆義，岡村信介，植木 実：子宮頸癌術後患者における再発関与因子に基づいた群別管理法の検討。日産婦誌，36：2106, 1984.
4. 前田隆義：子宮頸癌術後患者におけるoral-adjuvant chemotherapyに関する臨床および基礎的研究。日産婦誌，38：1515, 1986.
5. 中村秀次，王 玉琴，宮内 俊，西岡信幸，田中宏和，原田直己，白坂哲彦，藤井節郎：5-FU，FT-207およびUFTのThymidylate synthase阻害と腫瘍増殖抑制との関連性について。癌と化療，11：1049, 1984.
6. 岡村信介，前田隆義，植木 実：子宮頸癌術後のadjuvant chemotherapyの評価と再発予測曲線作成の試み。日癌治誌，22：838, 1987.
7. 坂本 優，岡部一裕，又吉國雄，根岸能之，秋谷清：ヒト子宮頸部腺癌培養細胞株(TMCC-1)の樹立とその性状。日産婦誌，39：S-334, 1987.
8. 須賀昭二，木村禰代二，久保完治，青山英昭，犬飼直也，加藤喜久子，堀内 正，澤田英夫，横山泰久：作用機序—臨床応用と関連して—。癌と化療，11：2301, 1984.
9. 植田政嗣，前田隆義，山田隆司，宮脇義隆，大槻勝紀，岡本吉明，岡村信介，佐野 隆，植木 実，杉本 修：TA-4産生能を有するヒト子宮頸部扁平上皮癌培養細胞株(OMC-1)の樹立とその性状。日産婦誌，38：1071, 1986.
10. 植田政嗣，前田隆義，山田隆司，御前 治，岡村信介，佐野 隆，植木 実，杉本 修：子宮頸癌術後のoral adjuvant chemotherapyに関する培養細胞学的研究。産婦進歩，39：261, 1987.
11. 植木 実，前田隆義，岡村信介，神田隆善，佐野隆，杉本 修：子宮頸部癌術後患者の再発risk度別管理法とそのrisk群に対するsurgical adjuvant chemotherapyの成績。日癌治誌，18：927, 1983.

12. 植木 実, 岡村信介, 前田隆義, 神田隆善, 植田政嗣: 子宮頸癌術後管理と adjuvant chemotherapy の価値. *Oncol. & Chem.*, 4: 54, 1988.
13. 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 Bioch.*, 46: 101, 1972.
14. Cory, J.G., Breland, J.C. and Carter, G.L.: Effect of 5-fluorouracil on RNA metabolism in Novikoff hepatoma cells. *Cancer Res.*, 39: 4905, 1979.
15. Maeda, T., Okamura, S., Ueki, M. and Sugimoto, O.: Prognostic factors in postoperative management of cervical cancer: A statistical study. *Bull. Osaka Medical School*, 32: 9, 1986.
16. Nozawa, S., Udagawa, Y., Ohta, H., Kurihara, S. and Fishman, W.H.: Newly established uterine cervical cancer cell line (SKG-III) with Reagan isoenzyme, human chorionic gonadotropin beta-subunit and pregnancy-specific beta-1-glycoprotein phenotypes. *Cancer Res.*, 43: 1748, 1983.
17. Spears, C.P., Shahinian, A.H., Moran, R.G., Heidelberger, C. and Corbett, T.H.: In vivo kinetics of thymidylate synthetase inhibition in 5-fluorouracil-sensitive and -resistant murine colon adenocarcinomas. *Cancer Res.*, 42: 450, 1982.
18. Spears, C.P., Gustavsson, B.G., Mitchell, M.S., Spicer, D., Berne, M., Bernstein, L. and Danenberg, P.V.: Thymidylate synthetase inhibition in malignant tumors and normal liver of patients given intravenous 5-fluorouracil. *Cancer Res.*, 44: 4144, 1984.
19. Ueki, M., Okamura, S. and Maeda, T.: Individualization of patients for adjuvant chemotherapy after surgical treatment of cervical cancer. *Brit. J. Obst. Gynaec.*, 94: 985, 1987.
20. Yamada, T., Ueda, M., Maeda, T., Miyawaki, Y., Misaki, O., Ueki, M. and Sugimoto, O.: Establishment and characterization of a cell line (OMC-4) originating from a human adenocarcinoma of the uterine cervix. *Acta Obst. Gynaec. Jpn.*, 39: 859, 1987.
(No. 6600 平1・4・11受付)