 原 著

絨毛癌細胞株 (BeWo, GCH-2, SCH) の細胞増殖, HCG, β -HCG 分泌能について

旭川医科大学産婦人科学教室

 牟禮 一秀 山下 幸紀 林 博章
 佐川 正 清水 哲也

北海道対ガン協会

清野 邦義

妊娠性絨毛癌細胞株 (BeWo, GCH-2) および胃原発絨毛癌細胞株 (SCH) に対して, 細胞形態, 増殖動態, HCG, β -HCG の産生動態を比較し, かつ Methotrexate (MTX) 添加によるそれらの変化を観察した. いずれの細胞株も Papanicolaou 染色では, 細胞質は淡青色でうすく, 核は巨大で 100μ にも及び, 多数の核小体を有していた. 増殖速度は, BeWo, GCH-2, SCH の順に速く認められた. HCG, β -HCG 産生は, ほぼ平行して推移し, いずれの株も, 増殖遅延期に一時亢進し, 対数増殖期には減少, 定常増殖期に再び産生亢進した. その産生量は BeWo, GCH-2, SCH の順に認められた. $10^{-5}M$ — $10^{-8}M$ MTX を培養4日目に24時間添加したが, $10^{-5}M$, $10^{-6}M$ で細胞数の著明な減少が認められ, $10^{-7}M$, $10^{-8}M$ では, その効果は一時的ですぐに増殖の開始が観察された. HCG, β -HCG の産生は, MTX 添加により一時的に亢進し, 臨床的に観察される, いわゆる“細胞効果”が細胞学的にも確かめられた. これらの結果から, 3株は程度の差は認められるとはいえ, いずれも共通した細胞学的特性を備えていることが明らかにされた.

Key words : Choriocarcinoma cell line—Papanicolaou staining—HCG— β -HCG—Methotrexate (MTX)

I. はじめに

In vitro におけるヒト悪性腫瘍細胞についての研究は, George Gey (1952) によって樹立された子宮頸癌

Studies on cell growth and hormon (HCG and β -HCG) production of three choriocarcinoma cell lines (BeWo, GCH-2 and SCH)

Kazuhide MURE, M.D., Kohki YAMASHITA, M.D., Hiroaki HAYASHI, M.D., Tadashi SAGAWA, M.D., Tetsuya SHIMIZU, M.D., Kuniyoshi SEINO*, C.T., I.A.C. Department of Obstetrics and Gynecology, Asahikawa Medical College

* Hokkaido Cancer Society

論文別刷請求先 ☎078-11 旭川市神楽4線5の3の11 旭川医科大学産婦人科学教室

昭和57年12月22日受付

HeLa 株により道がひらかれたが, 絨毛性腫瘍の研究においてもその病態を解明する上で, 培養細胞を用いた研究はきわめて重要である. Pattillio et al (1968) によって樹立された BeWo 株⁹⁾以降, 各地において次々と絨毛癌細胞株が樹立され報告されているが^{2,5,7,9)}, これらはいずれも別個に維持されているため, 同一条件下でのおおの細胞学的特徴も相互に十分解明されているとはいいがたい.

現在著者らは, 数種の培養株を維持しており, 多面的な絨毛性腫瘍病態解明のための研究を行っている. 今回はそのうち3種類の絨毛癌細胞株 (BeWo, GCH-2, SCH) を用いて, それぞれの細胞形態, 細胞増殖動態, HCG, β -HCG 産生動態の比較を試みたので報告する.

II. 研究材料ならびに方法

1) 研究材料

今回研究の対象とした培養絨毛癌細胞株は、次の3種類である。

① BeWo 株⁶⁾: Dr. Pettillo, (Wisconsin 大) から供与された。

② GCH-2 株⁹⁾: 田中憲一博士 (新潟大) から供与された。

③ SCH 株^{3,5)}: 大星らにより樹立された男性胃原発の絨毛癌で、田中憲一博士 (新潟大) から供与された。

2) 培養方法

培養液として RPMI 1640 (10% FCS および 150 IU/ml Penicillin を加えた) を用い 37°C にて 5% CO₂ incubator (Hot Pack) 内で培養し、培養液は 24 時間ごとに交換した。

3) 研究方法

3 種類の細胞について、それらの細胞増殖様式、それらに伴う形態変化、および HCG, β -HCG の産生動態などを検討し、さらに MTX 添加によりそれらがどのような変化をうけるかについて分析した。

① 細胞増殖動態の観察

3 者の細胞数の経日的変化を観察するために、それぞれを $1 \times 10^6/3 \text{ ml}$ (LUX 社 50 ml Plastic Flusk) に調整して培養を開始し、24 時間ごとに 0.2% Trypsin+0.02% EDTA にて細胞を膜面から剥離し、よく混和した後、血球計算盤にて細胞数を連日算定した。

② 細胞形態の観察

$1 \times 10^6/10 \text{ ml}$ に調整したそれぞれの細胞を、スライドグラスを静置した直径 90 mm の円形ガラスシャーレ内で培養し、経日的にスライドグラスを取り出し、その表面に張り付いた細胞をただちに 90% エチルアルコールで固定し、Papanicolaon 染色を行い、光顕的に細胞質および核内構造を観察した。

特に MTX 非添加時には、培養 1 日目、4 日目、8 日目のものにつき、BeWo, GCH-2, SCH の標本上 100 個の細胞を数え、その核最大径、核小体最大径を計測、また核小体数、分裂細胞数を観察した。MTX 添加時においても、非添加時と同様の観察を試みたが、細胞変性が強くかつ広範に及ぶため、それらは観察方法として不適当と判断し、MTX 添加時については、添加前、添加後 1 日目、3 日目、5 日目の 3 者の標本について弱拡大 ($100 \times$) 10 視野中の変性細胞の出現率、および強拡大 ($400 \times$) 10 視野中の多核細胞の出現率を観察した。

③ HCG, β -HCG の測定

いずれも Radioimmunoassay (RIA) 法により測定を行った。HCG, β -HCG とともに CIS 社 RIA Kit を用い、いずれも duplicate で測定した。

i) 細胞外に放出された HCG, β -HCG は、24 時間ごとに採取した培養液を 2,000 rpm, 10 分間遠沈し、得られた上清を -40°C で凍結保存しておき、測定時に解凍して測定した。

ii) 細胞内貯留量の測定には 24 時間ごとに 0.2% Trypsin+0.02% EDTA にて採取した細胞を FCS free RPMI 1640 で 2 回洗浄後、2,000 rpm, 10 分間遠沈し、沈渣を -40°C で凍結保存しておき、測定時これに生理的食塩水 1 ml を加えて解凍し、ソニケーター (大冢社) にて 150 W, 30 秒間超音波破碎し 1,500 rpm, 10 分間遠沈し、その上清について測定を行った。

④ Methotrexate (MTX) 添加方法

細胞形態観察のためのシャーレには培養 3 日目に、また増殖動態および HCG, β -HCG 産生動態観察のための Plastic Flask には培養 4 日目に 10^{-5}M , 10^{-6}M , 10^{-7}M , 10^{-8}M の MTX を 24 時間添加し、以後、再び MTX free の培養液を用いて培養を続けた。これらの経日的な細胞数、形態の変化、HCG, β -HCG の産生動態の観察は、上記①②③と同様の方法により行った。

III. 研究結果

1) 細胞増殖動態

① MTX 非添加時

経日的な細胞数の変動をみると、BeWo, GCH-2, SCH, いずれも培養開始後 3 日目頃まで細胞数は変化なく、あるいは若干減少し (増殖遅延期)、4 日目頃から著明な増加を示した (対数増殖期)。以後ほぼ直線的に増殖するが、7~8 日目頃にピークに達しフラスコ内は、confluence となり細胞数の増加は認められなかった (定常増殖期) (図 1, 2, 3)。

② MTX 24 時間添加時

MTX 10^{-5}M 添加後は 3 者とも細胞数はいずれも著明に減少し、72 時間後では培養開始時の約 1/2 まで、また MTX 添加前細胞数の約 1/8 まで減少した。しかし BeWo 株はその後再び細胞数の増加がみられ、120 時間後には MTX 添加前細胞数の約 1/3 まで回復した。

MTX 10^{-6}M 添加時、BeWo, GCH-2 では 10^{-5}M 添加と同様に明らかな細胞数の減少がみられたが、 10^{-5}M の場合と比較するとその減少の割合は少なく、MTX 添加前細胞数の約 1/2 程度にとどまった。また SCH では明

図1 BeWo

MTX 無添加時における細胞増殖動態および HCG, β -HCG の産生動態

図2 GCH-2

MTX 無添加時における細胞増殖動態および HCG, β -HCG の産生動態

図3 SCH

MTX 無添加時における細胞増殖動態および HCG, β -HCG の産生動態

図4 BeWo

MTX 24時間添加による細胞増殖動態

らかな減少はみられなかったが、増殖抑制は著明で、細胞数は72時間後まで MTX 添加前細胞数とほぼ同じ値を示した。

MTX $10^{-7}M$, $10^{-8}M$ 添加では3者ともに添加後一時的に増殖抑制がみられたが、48時間後には増殖能の回復がみられ、その後細胞数は増加を続けた。特に GCH-2 では MTX $10^{-8}M$ 添加後も非添加時とほぼ変わらない増殖動態を示した(図4, 5, 6)。

2) 細胞形態の変化

① MTX 非添加時

BeWo は、肉眼的にはシート状に増殖し、上皮性配列をとり、光顕上 Langhans 型細胞(L 型細胞)と考えられる単核細胞が大部分を占め、一部に Syncytium 型細胞(S 型細胞)と考えられる多核細胞が混在していた。単核細胞は Papanicolaou 染色でライトグリーンに染まる比較的豊かな、菲薄な境界不鮮明な細胞質を持ち、一部で胞体中に小さな空胞様にみえる部位をもつものも認められた。核は巨大で 100μ にも及ぶものもあり、その形は主として類円形であるが、不正形のものも多い。クロマチンは細顆粒状、一部粗顆粒状で核縁の肥厚はみら

図 5 GCH-2

MTX 24 時間添加による細胞増殖動態

図 6 SCH

MTX 24 時間添加による細胞増殖動態

れなかった。分裂像を示すものも多く、核小体は明瞭で大きな不正形のものが複数認められた（写真 1）。

GCH-2 も単層性に増殖するが、一部重積もみられた。大部分が単核細胞によって占められるのは BeWo と変わらなかった。Papanicolaou 染色では BeWo と同様にライトグリーンに染まる菲薄な細胞質を持ち、細胞境界は明らかではないが、より小型で N/C 比は高かった。巨大な核は一部で 50μ にも及び類円形で、クロマチンは細顆粒状、著明な核小体を複数認めた。核分裂像を示す細胞も多数認められた（写真 2）。

SCH も前 2 者と同様に単層性増殖をするが、重積傾向

写真 1 BeWo

Pap. 染色, $\times 400$

写真 2 GCH-2

Pap. 染色, $\times 400$

写真 3 SCH

Pap. 染色, $\times 400$

が強かった。細胞は GCH-2 よりもさらに小型であるが、N/C 比は高く、ライトグリーンに染まる比較的厚い細胞質を持ち、胞体中に大きな空胞様にみえる部位をもつものも多くみられた。核は主として類円形、クロマチンは細顆粒状で核縁の肥厚は BeWo, GCH-2 に比べて強く、類円形、一部不正形を示す明瞭な核小体を複数認めた

表1 培養細胞の核および核小体の経日的変化

BeWo

	核最大径(μ) ($m \pm SD$)	核小体数 ($m \pm SD$)	核小体最大径(μ) ($m \pm SD$)	MI
1日目	20.3 $\pm$ 6.4	2.4 $\pm$ 1.9	5.8 $\pm$ 2.7	6
4日目	23.6 $\pm$ 6.6	3.6 $\pm$ 2.0	5.1 $\pm$ 1.9	10
8日目	21.7 $\pm$ 5.9	2.3 $\pm$ 1.1	5.1 $\pm$ 1.7	6

GCH-2

	核最大径(μ) ($m \pm SD$)	核小体数 ($m \pm SD$)	核小体最大径(μ) ($m \pm SD$)	MI
1日目	12.8 $\pm$ 2.6	1.9 $\pm$ 1.1	3.4 $\pm$ 1.2	2
4日目	17.4 $\pm$ 5.6	2.5 $\pm$ 1.4	3.9 $\pm$ 1.3	4
8日目	16.0 $\pm$ 5.5	2.0 $\pm$ 1.4	3.9 $\pm$ 1.3	2

SCH

	核最大径(μ) ($m \pm SD$)	核小体数 ($m \pm SD$)	核小体最大径(μ) ($m \pm SD$)	MI
1日目	17.4 $\pm$ 3.9	2.3 $\pm$ 1.3	4.1 $\pm$ 1.4	2
4日目	16.3 $\pm$ 4.2	2.7 $\pm$ 2.0	3.6 $\pm$ 1.1	2
8日目	17.3 $\pm$ 4.6	3.1 $\pm$ 2.2	3.8 $\pm$ 1.6	2

(写真3).

培養1日目, 4日目, 8日目の細胞を比較すると, BeWo, GCH-2では4日目核最大径はそれぞれ23.6 $\pm$ 6.6 μ , 17.4 $\pm$ 5.6 μ と最も大きく, 核小体数も3.6 $\pm$ 2.0個, 2.5 $\pm$ 1.4個と多く, また分裂指数(mitosis index; MI)も10.4と高かったが, 核小体最大径ではむしろ35.1 $\pm$ 1.9 μ , 3.9 $\pm$ 1.3 μ と小さかった. 一方, SCHではBeWo, GCH-2のような関係は認められなかった(表1).

② MTX 24時間添加時

BeWo, GCH-2, SCHのいずれもMTX添加24時間以後, 細胞質空胞化, 染色性の異常, 核膨化, 核内空胞, 核破碎, 核濃縮, 細胞崩壊などのさまざまな変性細胞が多数認められた. それら変性細胞の出現率をみると, MTXの濃度により差を認めるが,それほど著明ではなく, 24時間後では, 50~75%を示し, 以後経日的に順次変性細胞の出現率は減少した. またMTX 10⁻⁵M, 10⁻⁶M添加では, 10⁻⁷M, 10⁻⁸M添加の細胞に比べ核破碎, 核濃縮, 細胞崩壊など, より高度の変性所見が目立った. さらに変性細胞となれば多核細胞の出現も著明に認められた(写真4). この多核細胞は2~3核のものから10数核に及びいわゆるS型細胞様のものに至る細胞で, これら多核細胞の出現率をみるとMTX添加前に1~2%であっ

写真4 多核細胞

BeWo MTX 10⁻⁶M 添加24時間後 (Pap. 染色, $\times 400$)

たものがMTX添加後24時間で5~10%と著明に増加し, 以後経日的に出現率は減少, MTX添加後72~120時間後ではほぼ添加前の状態(1~2%)まで減少した. またMTXの濃度による出現率の差は, 変性細胞の場合と同様著明ではなかった. ただSCHにおいてMTX 10⁻⁵M添加では, 添加後120時間後も6%と高値を示した.

分裂細胞は, MTX添加24時間後では3者ともにほとんど認められないほどに減少したが, 72時間後には再び増加した. しかし, 標本上変性細胞が多数出現し, 正常細胞もしくは生細胞と変性細胞を必ずしも明確に判定し得なかったため, 生細胞中の分裂細胞が占める割合などについては計数化できなかった.

3) HCGの産生動態

① MTX 非添加時

BeWo, GCH-2の培養液中のHCG量は, 増殖遅延期から対数増殖期に移行するところにピークをもち, 対数増殖期にはむしろ抑制された. SCHでは培養液中HCG量が増殖遅延期から対数増殖期にかけて測定域を超えたため, ピークは不明であったが, 対数増殖期における産生抑制は認められた. またBeWoでは, 定常増殖期にHCG産生増加が認められた(図1, 2, 3).

② MTX 24時間添加時

MTX 10⁻⁶M添加では, 培養液中HCGは, 添加前と比較するとSCHで約3倍, BeWoは約5倍, GCH-2では約6~7倍の産生亢進がみられた. 細胞内HCGは添加前と比較するといくぶん増加はしているものの培養液中ほど明らかではなかった.

MTX 10⁻⁷M添加ではBeWo, GCH-2の培養液中においてはMTX添加の翌日, すなわち48時間後にピークを持つが, その後増殖の回復に伴いHCGの産生量は減少した. しかしSCHにおいては, MTX添加後引き続

図 7 BeWo

MTX 24 時間添加による HCG 産生動態の経日の動態

図 8 GCH-2

MTX 24 時間添加による HCG 産生動態の経日の変動

図9 SCH

MTX 24時間添加による HCG 産生動態の経日的変動

き HCG は高値を示し、増殖能の回復から対数増殖期と考えられる時期にもいぜんとして高値を示した。BeWo, GCH-2 の細胞内 HCG は著変を示さなかったが, SCH では培養液中と同様, MTX 添加後 3~4 日目に高値を示した (図 7, 8, 9)。

4) β -HCG の産生動態

① MTX 非添加時

BeWo, GCH-2, SCH の培養液中 β -HCG 量は, BeWo, GCH-2 における HCG の場合と同様で, 増殖遅延期から対数増殖期に移行するところにピークをもち, 対数増殖期に減少した。また BeWo では定常増殖期に産生増加がみられた (図 1, 2, 3)。

② MTX 24 時間添加時

MTX 10⁻⁶M 添加後 24 時間では, BeWo, GCH-2 の培養液中 β -HCG 量は添加前の約 6~7 倍の高値を示した。SCH では 24 時間後に約 2 倍, 48 時間後には 4 倍の産生亢進がみられた。細胞内 β -HCG についても, BeWo, GCH-2 では, 24 時間後に増量し, SCH では 24 時間, 48 時間後と引き続き産生亢進がみられたが, 培養液中の変化ほど著明ではなかった。

MTX 10⁻⁷M 添加では, 培養液中, 細胞内ともに BeWo, GCH-2 は MTX 非添加時の産生動態と比較して大きな差異を認めなかったが, SCH においては細胞数の

増加と平行して産生増加が認められた。

IV. 考 案

今回, 著者らが用いた BeWo, GCH-2, SCH は, それぞれ異なる origin から樹立された絨毛癌細胞株で, BeWo, GCH-2 は妊娠性の, SCH は男性胃原発の絨毛癌より分離されたものである。形態をみると, 細胞の大きさ, 細胞質, 核の光顕所見で若干の差異を認め, また増殖形態においても SCH ではやや pile up 傾向が強く認められるものの, いずれも単層性に増殖する。光顕レベルで観察するかぎりでは, 3 者ともに比較的均一な形態の単核細胞が大半を占め, ところどころに大型の S 型細胞と思われる多核細胞が混在し, 全体としては非常に類似した形態を示している。ただ, 核最大径などの培養 1 日目, 4 日目, 8 日目の 3 者の比較において, SCH のみ異なるパターンを示すことは, 標本上細胞重積が強く個々の細胞を観察することが困難なため, 重積の少ない部分および散在する細胞を主として観察したためかも知れない。

MTX を添加した時の形態学的変化をみても 3 者に特異的な変化はなく, 細胞崩壊に至る非特異的な変性が主体で, 種々の変性細胞出現率の消長パターンは 3 者ともに同様と考えられる。また本実験中, MTX 添加後に多

核細胞の増加が認められた。この多核細胞の出現率消長パターンについても、MTX添加24時間後にピークを示し、以後経日的に減少するというパターンをとり、3者間に大きな差は認められなかった。多核細胞には、数個の細胞の fusion によるものと、核分裂と細胞分裂の不均衡により生ずるものがあるといわれている。本実験中にみた多核細胞が、いずれのメカニズムによって生じたものは明確にし得なかった。MTX 添加後の標本上には確かに核の不分離像を散見し、核分裂と細胞分裂の不均衡に基づく多核細胞の出現を示唆するが、それだけ1細胞中に10数個に及ぶ多核をもつ細胞を説明することは困難と思われる。いずれにしても、この多核細胞が蔵本ら⁴⁾のいうL型細胞からS型細胞への変換という積極的な意味をもつものか、それとも単に細胞崩壊に至る一つのパターンであるのかは今後の検討をまたねばならない。

増殖曲線とHCG, β -HCGの産生動態をみると、MTX非添加時においていずれも対数増殖期の直前に産生のピークがあり、対数増殖期にはその産生が抑制される。さらにBeWoにみるように定常増殖期にはいと、HCG, β -HCGともに産生が増加する。従来の報告によれば^{2,3)}、HCG, β -HCGともに対数増殖期には産生の抑制があり、定常増殖期に至って産生の増加がみられるという。しかし、著者らの実験結果にみるように対数増殖直前のHCG, β -HCG産生のピークを指摘した報告はない。これが、従来の報告と使用した株の差によるものであるのか、または実験条件の違いによるものであるのかは明らかではない。

MTX添加による細胞増殖動態は、3者ともにdose dependentの反応を示し、MTX 10^{-6} M以上の濃度では著明な細胞数減少をみるが、MTX 10^{-7} M, 10^{-8} Mでは一過性の増殖抑制がみられるもののすぐに増殖を開始し、3者の増殖曲線パターンは類似している。HCG, β -HCGの産生については、MTX 10^{-7} M添加で、BeWo, GCH-2とSCHとの間にその産生動態パターンの差が認められるが、MTX 10^{-6} M添加では3者の産生動態パターンに大きな差は認められない。MTX 10^{-6} M添加24時間後から認められる培養液中HCG, β -HCG量の増加は、細胞内HCG, β -HCG量の増加とあわせ、MTX添加により産生が亢進したものと考えられ、これはいわゆる細胞効果と呼ばれている現象と思われる。細胞効果については、Hussa, et al¹⁾や、Speeg, et al⁸⁾によりMTXやAct-Dによる細胞自身のHCG産生能の亢進によるものであることが明らかにされてきたが、今回の実験結果も同様の成績を示している。また、絨毛癌細胞は妊娠

性であれ胃原発であれ細胞形態学的にはきわめて類似した性格を有するものと思われるが、低濃度MTX添加実験からみてHCG, β -HCGの産生動態については、種々の点でこれらの間に差のあることが確かめられた。これらが単に量的な差であるのか、また質的な差であるのかはさらに検討の必要があると思われる。

V. 結 語

妊娠性絨毛癌細胞株(BeWo, GCH-2)および胃原発絨毛癌細胞株(SCH)の細胞学的特性を、細胞形態、増殖様式、ホルモン産生様式の面から検討し、さらにMTXによるこれらの変化を観察した結果、これらはいずれも程度の差は認められるものの、共通した細胞学的特性を備えていることが明らかとなった。

Summary

Two gestational choriocarcinoma cell lines (BeWo and GCH-2) and non-gestational — gastric origin — choriocarcinoma cell line (SCH) were analyzed with respect to morphology, cell growth, and hormone (HCG and β -HCG) production. In addition, effects of Methotrexate (MTX) were observed.

Each cell line showed a thin cytoplasm in light green, and a huge ($\sim 100 \mu$) nucleus with many distinct nucleoli in papanicolaou staining. Growth curve of each cell line showed a similar pattern. With HCG and β -HCG, the production increased in lag phase, decreased in logarithmic growth phase, and re-increased in stationary phase.

MTX of several concentrations such as 10^{-5} M, 10^{-6} M, 10^{-7} M and 10^{-8} M were administered at day 4, for 24 hours respectively. Basically three cell lines demonstrated non-specific cytologic changes. Inhibition of cell growth was revealed strongly by 10^{-5} M and 10^{-6} M-MTX, and temporarily by 10^{-7} M and 10^{-8} M-MTX. HCG and β -HCG production increased by MTX, which established so called "cellular effect", was observed directly in vitro.

The present results suggest that three cell lines keep a similar cytologic characteristics in spite of a different origin.

文 献

- 1) Hussa, R.O., Pattillo, R.A., Delfs, F.E., Facog and Richard, R.: Actinomycin D Stimulation of HCG Production by Human Choriocarcinoma, Obstet.

- Gynecol., 42 : 651~657, 1973.
- 2) Kohler, R.O. and Bridson, W.E. : Isolation of Hormone-Producing Clonal Lines of Human Chorionic carcinoma, J. Clin. Endocrin., 32 : 683~687, 1971.
 - 3) 蔵本博行, 見常多喜子, 鈴木健治 : 絨毛上皮腫 (SCH) 細胞の増殖動態と Human Chorionic Gonadotropin 分泌能, 日産婦誌, 26 : 411~412, 1974.
 - 4) 蔵本博行, 浜野美恵子, 鈴木光明・他 : 絨毛癌に対する Methotrexate の所謂細胞効果の本態とその発現機構に関する研究, 日産婦誌, 34 : 187~195, 1982.
 - 5) 大星章一, 清藤 勉, 吉田絃一・他 : 胃悪性絨毛上皮腫の組織培養, 日病会誌, 61 : 146~147, 1972.
 - 6) Pattillo, R.A. and Gey, G.O. : The Establishment of Cell Line of Human Hormone-synthesizing Trophoblastic Cells in Vitro, Cancer Res., 28 : 1231~1236, 1968.
 - 7) Pattillo, R.A., Hussa, R., Bernstein, R. and Delfs, E. : The Jar Cell Line-Continuous Human Multi-hormone Production and Controls, In Vitro, 6 : 398~399, 1971.
 - 8) Speeg, K.V.Jr., Azizkhan, J.C. and Stromberg, K. : The Stimulation by Methotrexate of Human Chorionic Gonadotropin and Placental Alkaline Phosphatase in Cultured Choriocarcinoma Cells, Cancer Res., 36 : 4570~4576, 1976.
 - 9) 田中憲一, 片野 彰, 清藤 勉・他 : 悪性絨毛上皮腫の異種移植と培養, 第36回日本癌学会総会記事, 36, 486, 1977.
-