

Title	単層培養細胞とSpheroidによる分割照射(split dose irradiation)の効果に関する研究
Author(s)	中山, 俊威
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1991, 51(1), p. 79-87
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/14966
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

単層培養細胞と Spheroid による分割照射（split dose irradiation）の効果に関する研究

慶応義塾大学医学部放射線科学教室（指導：橋本省三教授）

中山 俊 威

（平成2年3月20日受付）

（平成2年6月5日最終原稿受付）

Effects of Split Dose Irradiation on Monolayer Cells and Multicellular Tumor Spheroid

Toshitake Nakayama

Department of Radiology, Keio University, School of Medicine

Research Code No. : 402.9

*Split dose irradiation, Multicellular tumor spheroid,
Recovery from radiation damage,
Spheroid control dose-50*

Human neuroblastoma (GOTO) and squamous cell carcinoma (SQ5), grown as the monolayer cells or as the multicellular tumor spheroid (MTS) were irradiated. GOTO cells were radiosensitive, while SQ5 cells were moderately radioresistant. Cells were irradiated by the single or the split doses and the recovery between split doses were investigated. The recovery ratio (R.R.) of monolayer cells were calculated by the procedure A: the dose ratio at the same survival levels or by the procedure B: the survival rates ratio at the same doses. The therapeutic response of MTS was determined by the method of spheroid control dose-50 (SCD50) and R.R. of MTS was calculated by the ratio of the values of SCD50. R.R. of GOTO-monolayer cells was 1.1 (by the procedure A) and 1.6 (by the procedure B). GOTO-MTS did not show the significant difference between SCD50 of single dose irradiation and that of split doses one. When SQ5 cells were irradiated by the split doses, R.R.s obtained by the procedure A and B were 1.3 and 2.1, respectively. R.R. of SQ5-MTS was not different from that of monolayer cells obtained by the procedure A. MTS with two different sizes were irradiated by the single or split doses, and there was no remarkable difference with respect to the radiocurability and R.R. Although the number of cell lines were limited, their growth condition did not affect the capacity of recovery from radiation damage

はじめに

癌の放射線治療における最大の問題点は腫瘍に放射線が本当に有効であるか否かである。その解析の一手段として、腫瘍細胞の放射線感受性を検討する方法が確立されてきた。最近の臨床材料由来の腫瘍細胞に対する研究では、同一部位の同一組織型の腫瘍細胞でも、個々の腫瘍毎に放射線感

受性が著しく異なることが明らかにされている¹⁾。腫瘍細胞の放射線感受性に関与する主な因子として、(1) Do, Dq により示される細胞の本質的感受性と、(2) 亜致死障害 (SLD), 潜在的致死障害 (PLD) の回復能力があげられる²⁾。一方, in vivo の腫瘍になるとさらに多くの関与因子があり、低酸素細胞の存在や再酸素化の問題, contact

effect, そして宿主の反応も加味されてくる³⁾.

multicellular tumor spheroid (MTS) は, in vitro の単層培養細胞と, in vivo の腫瘍の中間的性格を持つと言われ, 小さな固型腫瘍のモデルとして考えることができる⁴⁾とされている。すなわち MTS には単層培養細胞の特長に加えて, contact resistance の存在や細胞の kinetics や代謝の不均一性がみられるが, in vivo の腫瘍に比べて各種の定量法が容易である⁵⁾.

臨床上的放射線治療は分割照射で行なわれるが, 1 回照射と分割照射では, これらの関与因子相互の影響も異なってくる。最近の放射線治療の分割法は, 主に正常組織における α/β 比が, 腫瘍の α/β 比と異なることを利用して, sparing effect を大きくする工夫がされている⁶⁾。しかし, 正常組織の α/β 比は比較的研究されているが, 腫瘍に関する研究は十分とは言えない。

本研究は, 放射線感受性の極めて高い神経芽細胞腫由来の培養細胞と, 頭頸部扁平上皮癌由来の細胞を用い, 単層培養と MTS で 1 回照射と分割照射の放射線に対する反応を検討し, 若干の知見を得たので報告する。

実験材料及び方法

1. 腫瘍細胞

本実験に用いた腫瘍細胞は cell line として確立された神経芽細胞腫由来の培養細胞 GOTO と, 扁平上皮癌の細胞 SQ5 である。両者ともヒト由来の細胞で, 単層培養細胞として継代されている。

GOTO 細胞は, RPMI-1640 培地 (Gibco) に 15% fetal bovine serum を加えて培養を行ない, SQ5 細胞は, 10% fetal bovine serum を添加した F10 (Gibco) 培地を用いて培養を行なっている。1×10⁶個の細胞を直径 60mm プラスチックシャーレ (Costar 3060) に播種し, 原則として対数増殖期 (proliferative phase), 定常期 (plateau phase) それぞれの時期について実験を行なった。細胞は 5%CO₂, 37℃ で培養を行なった。

spheroid の作成には, 単層培養した細胞をトリプシン処理で剥離し, 1×10⁶個の細胞を 0.5% の agar (Gibco) で coating したプラスチックシャー

レで 2～3 日培養し, 径の小さな spheroid の形成が認められた後, spinner flask (Corning) に移し, 1 分間約 84 回転の連続回転で 1～2 週間の培養を行ない, 一定の size に達した所で実験に供した。spinner flask 内の培地は 2～3 日毎に交換した。spheroid の screening には目的とする pore size を持つナイロンメッシュを用いた。

2. 放射線照射

単層培養細胞と spheroid の照射には, 200KVp, 20mA の深部治療 X 線 (島津社, 信愛号, 半価層 1.5mmCu) を線量率 60～90cGy/min で使用した。大量の照射線量が必要な実験では, 6MV の高エネルギー X 線 (三菱 ML-6MA) を用い, 線量分布を均一にするためシャーレの底部に 15mm のアクリル板を置き, 蓋の上には厚さ 3cm の MixDP をのせて, 線量率 2Gy/min で底部より照射した。いずれの照射も室温で行なった。

分割照射の場合には, 一定の時間間隔を置き 2 分割, または 3 分割にて照射を行なった。1 回当りの線量は同一線量による均等分割を行なったが, 不均等分割を行なった場合もある。

3. 効果判定

放射線による抗腫瘍効果の判定は, 単層培養細胞では colony forming assay を用いた。0.5% トリプシン液処理より単一細胞浮遊液を作成し, その一部をプラスチックシャーレに移し, コロニーを形成させてその生存率により判定した。移植する細胞数はシャーレあたり形成されるコロニーが, 30～50 個になるように希釈調製した。コロニーの算定は, 肉眼的に算定できる大きさに達したところで, 95% エタノール中に 0.4% のクリスタルバイオレットを含む液で染色し, 肉眼的に算定した。

spheroid を用いた実験では, 照射後直径 100mm のプラスチックシャーレ (Costar 3100) に, 1 シャーレあたり 30～60 個の spheroid を播種し, 1～2 日間静置培養を行ないシャーレの底部に spheroid が固着した後, spheroid に対応した位置のシャーレ底部に marking を行なった。その後さらに 14～20 日間の静置培養を続け, 生着して増殖し続ける spheroid の数を算定した。照射後シャーレに播種された spheroid 数と, 生着して増殖し続

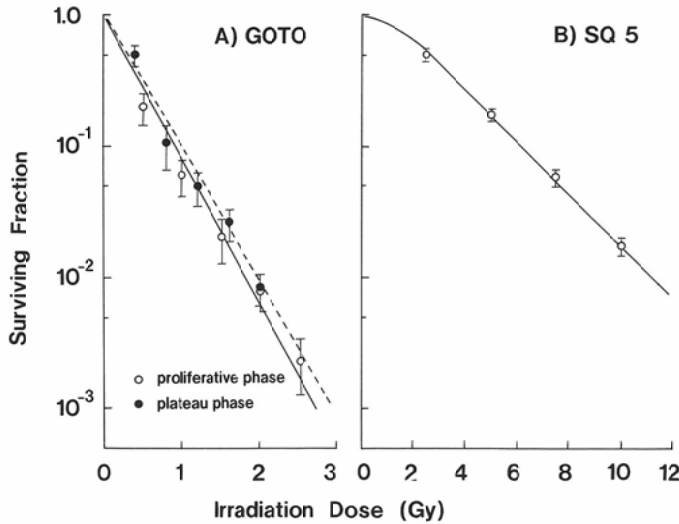


Fig. 1 Dose response curves of the two cell lines. Left panel: GOTO cells (neuroblastoma) in the proliferative phase (—○—) and in the plateau phase (—●—). Right panel: SQ5 cells (squamous cell carcinoma) in the proliferative phase (—○—). Bars are SD of the mean.

ける spheroid 数より治癒率を算出し、照射線量との関係より TCD₅₀ に準じて spheroid control dose 50 (SCD₅₀) を求めた⁷⁾。spheroid の算定にもクリスタルバイオレットによる染色を使用した。

実験結果

1. 単層培養における放射線感受性

1) 1 回照射に対する反応

シャーレに播種 2 日後の対数増殖期と 6 日目の定常期にある単層培養細胞を用いて、1 回照射に対する dose-response curve を作製し Fig. 1 に示した。

GOTO 細胞は非常に放射線感受性が高く、対数増殖期では N 値が 1、D₀ 値が 0.4Gy となり、定常期でもほぼ同じ曲線を示した (D₀ 値 0.45Gy、N 値 1)。すなわち、dose-response curve 上 shoulder を示さない。linear-quadratic model を用いた解析では、 α/β 値を算出すると負の値を示した。

対数増殖期の SQ5 細胞では多くの細胞の dose-response curve にみられるように shoulder を示し、N 値は 1.8 で、D₀ 値が 2.4Gy となり、 α/β 値では 11Gy となった。

単層培養細胞の実験結果からは、分割照射を行なった場合、GOTO 細胞よりなる腫瘍は sparing

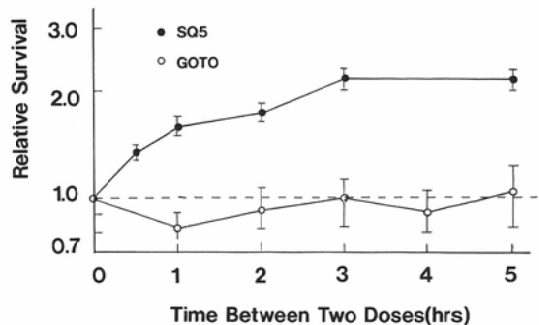


Fig. 2 Recovery between the split-doses in the two cell lines, those are GOTO cells (●) and SQ5 cells (○) in the proliferative phase. Bars are SD of the mean.

effect が小さく、SQ5 の腫瘍は分割照射時に通常の sparing effect が存在することが推測される。

2) split-dose に対する反応

GOTO, SQ5 いずれの細胞も、播種 2 日後の対数増殖期を用いて、2 分割照射時の回復を生存率により検討した (Fig. 2)。GOTO 細胞では、総線量を 1.5Gy とし、0.75Gy 2 回の照射を行なったが、5 時間までの間隔では回復は認められなかった。

一方、SQ5 細胞は総線量を 8Gy とし、4Gy の 2 分割を行なったところ、3 時間で plateau に達

する回復が認められ回復率は2.1となった。

GOTO 細胞の対数増殖期では, split-dose による回復が認められなかったため, 5日間毎日新鮮な培地に交換し, 定常期になった細胞を用いて, 1回線量0.8Gy, 2回照射時の split-dose に対する回復を検討した (Fig. 3a). 定常期にすると GOTO 細胞も3時間で plateau に達する回復が認められ, 回復率は1.6となった. この定常期の細胞を用いて, 1Gy の1回照射を行い, 時間の経過に伴う回復を検討した (Fig. 3b). GOTO 細胞は軽度の PLD 回復を示し, 回復率は1.6と1回線量0.8Gy の split-dose の場合と同じ値になった.

GOTO, SQ5細胞における回復率を, 分割照射時の線量の差異により求めるため以下のような検討を行なった. すなわち, 定常期の GOTO 細胞は0.8Gy 照射5時間後に, 0.4~1.2Gy の照射を行ない, 対数増殖期の SQ5細胞では, 4Gy 照射5時間後に2~8Gy の照射を行なって生存曲線を作製した (Fig. 4). 1回照射, 分割照射のいずれの場合も, 照射5時間後にトリプシン処理を行ない, PLD 回復がおこった後に生存率を算出した.

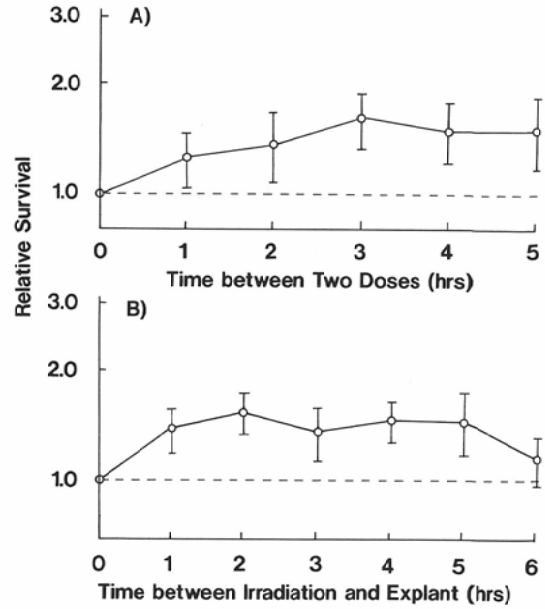


Fig. 3 Relative survivals of GOTO cells in the plateau phase. Panel A : recovery between split doses and panel B : repair of the potentially lethal damage. Bars are SD of the mean.

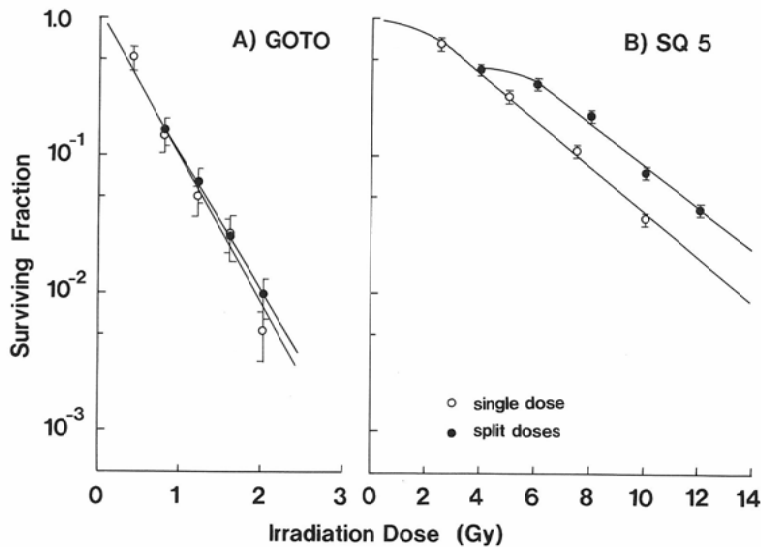


Fig. 4 Dose response curves of split dose experiment. Irradiation was given as single doses (○) or split doses (●). Panel A : 0.8Gy was delivered first and 0.4~1.2Gy were added 5 hours after first irradiation. (GOTO cells plateau phase) Panel B : 4Gy was delivered first and 2~8Gy were added 5 hours after first irradiation (SQ5 cells proliferative phase). Bars are SD of the mean.

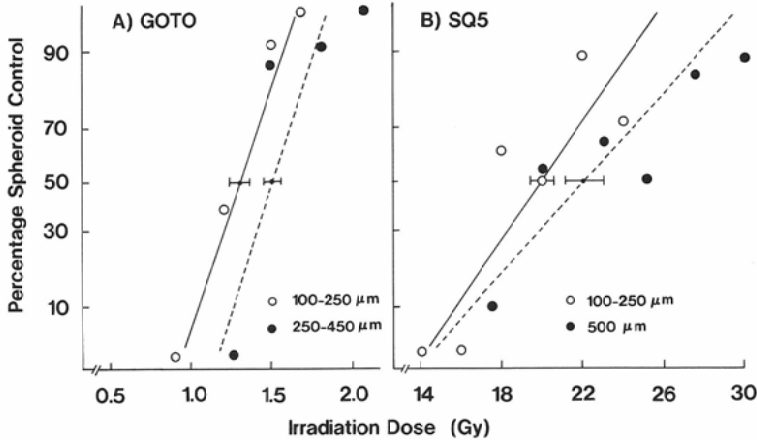


Fig. 5 Percentage spheroid control with the single doses. Panel A: GOTO spheroids in the small sizes (100~250µm) (○) and in the large sizes (250~340 µm) (●). Panel B: SQ5 spheroid in the small sizes (100~250µm) (○) and in he large sizes (500µm) (●). Bars are SD of the mean.

GOTO 細胞では、0.8Gy, 2 回照射(1.6Gy)と同一の生存率は、1 回照射の場合には1.5Gy で得られたため、線量の比較による回復率は1.1となった。同様にして SQ5細胞でも検討すると4Gy, 2 回(8Gy)と6.2Gy 1 回照射が同一の生存率を示し、回復率は1.3であった。

2. spheroid の放射線感受性

1) 1 回照射に対する反応

GOTO 細胞由来の spheroid に対して、SCD₅₀ 値の算出から 1 回照射の放射線感受性を検討した。低酸素細胞が存在しないと考えられる直径 100~250µm と、多少出現していると考えられる直径250~430µm の 2 種のサイズの spheroid を用いたが、SCD₅₀ 値はそれぞれ1.3Gy と1.5Gy となり、両者の間に大きな差異は認められなかった (Fig. 5a)。

SQ5細胞でも spheroid を用いて、GOTO 細胞の場合と同様に SCD₅₀ 値を求めると、100~250 µm の spheroid は20Gy, 500µm の spheroid でも22Gy であった (Fig. 5b)。GOTO spheroid では SCD₅₀ 曲線の傾きは急峻となり、1.0~1.6Gy の間で control rate が10~90%に変化していたが、SQ5 spheroid での control rate の変化は緩慢で、16~25Gy の間で変化していた。しかし、spheroid のサイズの違いは、SCD₅₀ 値に大きな影響を与え

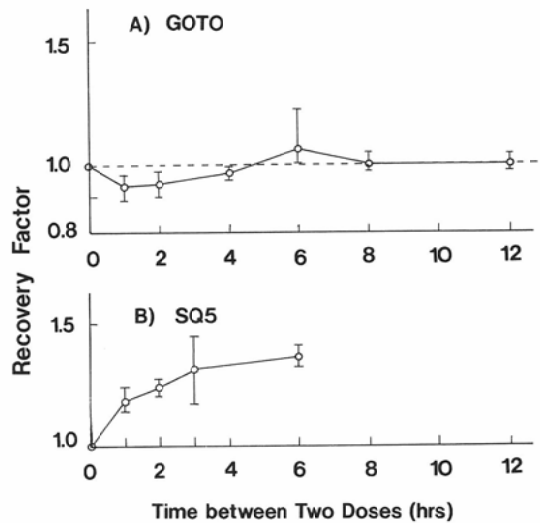


Fig. 6 Recovery between split doses in the two kinds of spheroid (100~250µm), those are, GOTO spheroids and SQ5 spheroids. Bars are SD of the mean.

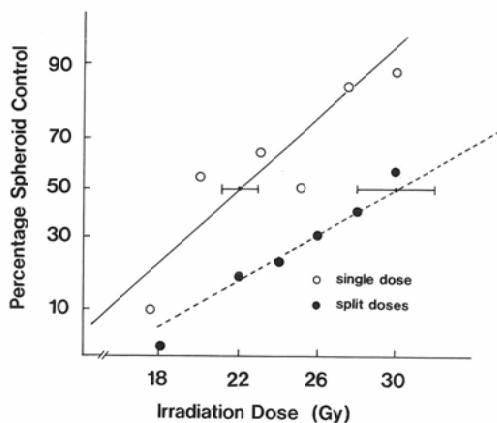
なかった。

2) split-dose に対する反応

100~250µm の GOTO spheroid の SCD₅₀ 値を用いて、均等 2 分割照射時の回復について検討した。2 分割の間隔を12時間までとしたが、SCD₅₀ 値はいずれも1.3Gy 前後となり、split-dose による回復は認められなかった (Fig. 6a)。すなわち定常

Table 1 SCD₅₀ values of GOTO spheroid in split-dose irradiation

fraction number	Interval between split-doses			
	0	4hrs.	8hrs.	12hrs.
1	1.3Gy
2	...	1.3Gy	1.3Gy	1.3Gy
3	...	1.5Gy	1.4Gy	...
4	...	1.5Gy	1.4Gy	...

GOTO small size spheroid (100-250 μ m)Fig. 7 Percentage spheroid control of large size SQ5 spheroids (500 μ m). Irradiation was delivered as single doses (○) or split doses (●). Bars are SD of the mean.

期の GOTO 細胞では split-dose の照射の場合、軽度の回復が認められていたが、spheroid にして SCD₅₀ で検討すると、明らかな回復は認められなかった。

split-dose 照射後の回復は線量との関数になるとされているため、1 回線量を変化させて 2 分割～4 分割とし、4～12 時間間隔で照射して SCD₅₀ 値を求めて Table 1 に示した。3, 4 分割にすると SCD₅₀ 値は 1.4～1.5Gy とやや大きな値を示したが、split-dose による明らかな回復を示唆する結果とはならなかった。100～250 μ m の SQ5 spheroid による 2 分割照射の場合は、照射間隔が長くなると明らかに回復が認められ、6 時間間隔の回復率は 1.3 となった (Fig. 6b)。

低酸素細胞が存在すると思われる 500 μ m の SQ5

spheroid を用いて、3 時間間隔で 2 分割照射を行なった場合の生存率を Fig. 7 に示した。500 μ m の spheroid の場合も、回復率は 1.3 で 100～250 μ m の spheroid と同様であった。しかし、SCD₅₀ 曲線の傾きは 1 回照射に比べて緩慢となった。

考 察

単層培養細胞に比べて、in vivo の腫瘍状態に近いと考えられる multicellular tumor spheroid (MTS) の治療効果判定法には、各種の定量法がある。代表的なものは、spheroid より単一細胞液を作製して、単層培養細胞と同様に生存曲線を求める方法である⁵⁾。この方法は MTS を処理して単一細胞浮遊液が作製できる細胞では最良の放射線感受性の指標になるとされている。しかし、しばしば plating efficiency が低く、実験操作の間に人工的細胞死を起こし易く手数がかかる欠点がある⁶⁾。spheroid の発育を計測する方法も頻用されるが、spheroid 内部における変化を反映しないことがある。すなわち viable cell は少なくなっても spheroid 内に蓄積した物質や壊死部分により、spheroid が増殖しているごとく観察される可能性がある⁹⁾。本研究では、in vivo における TCD₅₀ と同様に、spheroid が全体として生存するか否かを end-point にした⁷⁾¹⁰⁾。本判定法は単一細胞浮遊液を作製する方法と同様、clonogenic cell の存在を観察しているが、欠点としては spheroid 内部に存在する viable cells が viable と判定されられた場合には、spheroid 表面に移動して増殖する必要がある、しばしばこの過程に疑問がもたれている⁵⁾。さらに増殖した細胞集団が存在し、endpoint として spheroid が生存したと判定された場合、何個の生細胞が生存していたのか不明である。しかし、手技的に極めて容易であり、また、腫瘍が治癒したのか再発するのに対応して考えることができるため本研究ではこの方法を用いた。

spheroid の照射時に spinner flask より spheroid を取り出し agar で加工した dish に移して室温において照射した。この場合、培養液中の酸素の拡散が悪くなり低酸素細胞の割合が変化する可能性があり、また外側の培地に近い細胞の酸素消費率が低下し、内側の細胞が酸素化される等、spheroid

周囲の環境の変化が spheroid 内の酸素濃度に影響することが考えられる⁹⁾。したがって、照射時の放射線感受性が変化する可能性がある。しかし、分割照射時に24時間 dish 中においた spheroid と、1 回照射の時の spheroid の間に放射線感受性の差が認められなかったことから、この周囲環境条件の変化が放射線治療に与える影響は少ないかもしれない。

GOTO 細胞は単層培養細胞の対数増殖期には、split-dose 照射時に回復が認められなかったが、定常期になると回復係数1.6の回復がみられた。定常期の細胞では、split-dose 照射時に SLD repair と PLD repair の両回復が生存率に関与してくる。定常期の GOTO 細胞は PLDR の検討で回復率1.6を示しており、split-dose 照射時と同一の値を示した。PLDR の実験には1回線量1.0Gyを用い、split-dose 照射では0.8Gy 2回照射を用いたため単純には比較できないが、0.6Gy~1.0Gyの間では PLDR の回復係数1.4~1.6となっていた(伊東, 中山, 未発表)。このことは、GOTO 細胞の場合 split-dose 照射時の回復に PLDR が主に関与していることを示唆するものと考えられる。spheroid では分割数や分割間隔をいろいろと変化させたが回復を認めなかった。

SQ5細胞の場合は、対数増殖期の2分割照射で回復がみられ、回復係数は2.1となったが、spheroid の split-dose 照射では、回復係数1.3の回復となっていた。

いずれの細胞においても、単層培養細胞で認められる回復より、spheroid の回復は低下していた。しかし、単層培養細胞では生存率より回復を求め、spheroid では SCD_{50} 値の線量より回復を求めた。この方法によると、線量の変化は正常スケールだが、生存率の場合は対数スケールとなっているため、単純な比較には問題がある。したがって、単層培養細胞の場合も1回照射と分割照射が同一の生存率を示す線量を求め、線量の比で回復率を求めると GOTO 細胞では回復率は1.1、SQ5細胞の場合は spheroid で認められた回復率1.3と同じ値を示した。すなわち単層培養、spheroid とともに線量で回復率を比較すると、細胞の存在状態は回

復率に影響を与えなかった。

神経芽細胞腫の spheroid を用いた場合、分割により sparing effect が認められたという報告と認められなかったという報告がある¹²⁾¹³⁾。これは用いる線量により異なるとされ、0.5~3.5Gyの間では回復はみとめないと報告されており¹³⁾、今回の結果と一致している。扁平上皮癌の spheroid の場合、Schwachoefer らは growth curve の解析から、線量に依存して回復係数は変化し1.5~2.0になるとしている¹²⁾。今回用いた SQ5も1.3とやや小さいが大体一致していた。

従来、腫瘍の放射線抵抗性に回復の程度が大きく関与し、linear-quadratic model の β 値との関係で示されるとされてきた¹⁴⁾。一方、最近では腫瘍の放射線感受性を決定する因子としては、生存曲線の shoulder の大きさ、あるいは β 値ではなく、 α 値が大きく関与し、細胞の本質的放射線感受性に左右されると考えられるようになってきた¹⁵⁾。今回の検討では、放射線に極めて感受性の高い細胞と中程度の細胞を用いたが、split-dose 照射時の回復は spheroid にして腫瘍に近い形態にすると、単層培養細胞の生存率より求められる回復率より小さな値を示した。一方、回復率を同一効果を示す線量で算出すると、spheroid と単層培養細胞は同程度となり、回復が腫瘍の治癒に及ぼす影響はあまり大きくないと考えられる。Hill らは、多くの mouse 腫瘍の解析から、放射線による治癒に関与する主な因子は、細胞の持つ本質的放射線感受性であるとしている¹⁶⁾。

単層培養細胞から求められる生存率と、spheroid の SCD_{50} 法による生存率の間には多少の差異が認められた。100~250 μ m の GOTO spheroid では SCD_{50} が1.3Gy となり、これは single cell の場合細胞数を280分の1に減らす線量である。腫瘍の治癒のために生存腫瘍細胞が0になる必要があると仮定すると、 TCD_{50} のためには平均生存細胞数が、0.693個になる必要があるとされている¹⁷⁾。spheroid の平均径を170 μ m とすると、この spheroid には約 10^3 個の細胞が存在することになり⁸⁾、single cell の生存率より推定される残存細胞数より、はるかに多い細胞が残存しても、spheroid は

死亡している。同様のことは SQ5 細胞についても認められる。さらに、spheroid の直径を 2 倍に大きくした場合、GOTO では SCD₅₀ の線量で 0.2Gy しか変わらず、SQ5 細胞では 2Gy の差異しかない。細胞数としては 8 倍になり、内部に hypoxic cells が生じたと考えられるが、制御に必要な線量としては大きな差異を生じなかった。すなわち大きな腫瘍となって腫瘍細胞数が増加しても、腫瘍の制御に要する線量は予想される線量より少なくなっていた。この差異が SCD₅₀ 法という assay 法を用いたことによる欠点、すなわち前述した生細胞の spheroid 表面への移動の失敗によるものか、spheroid そのものが持つ性質か不明である。岡田らは、腫瘍塊の場合は viable cell が残存しても治癒となり、大きな腫瘍塊ほど多くの viable 細胞が残存しても治癒すると報告した¹⁸⁾。spheroid の中に clonogenic cells が生存しても少数の場合には死滅した細胞に取り囲まれて増殖できず、最終的に spheroid の増殖能があると判定されるために必要な最小細胞数を“p”とすると、p は細胞種による異なり MTS に特有な現象としている¹⁸⁾。spheroid の内部では、単層培養細胞と異なり、種々の細胞発育条件が生じてくる。これに関与する因子として重要なものは酸素濃度と glucose 濃度とされ、内部では拡散不良のため necrosis の状態が生じてくる。一方、代謝産物も spheroid 内部に蓄積し、細胞に対して毒性を示すことが考えられ、lactate 濃度が極めて重要な因子と考えられている⁴⁾。これらの現象が関与して、MTS 内では viable cells が少数存在しても spheroid としての増殖能が失われる可能性が考えられる。spheroid より単一浮遊細胞液を作製して生存曲線を求めた場合、viable cell と判定される細胞も、腫瘍塊として存在する場合はそのまま分裂能を失って、腫瘍全体としては治癒する可能性があることを考えておく必要が示唆されるのかもしれない。

本研究は放射線感受性の異なる 2 種の細胞のみによる検討であり、また spheroid の生存の判定に SCD₅₀ 法のみを用いているため、今後多くの異なる細胞や spheroid の assay 法を用いて更に検討を重ね、腫瘍塊として存在する細胞に分割照射の

回復が及ぼす影響について検討していく予定である。

本研究の一部は、文部省科研費(課題番号 01770794)、伊藤テルミー研究助成金(平成元年度)によったことを記して謝意を表します。直接に御指導を頂いた伊東久夫助教授、照射に御協力頂いた教室員および放射線治療室の技師諸氏、ならびに実験に御協力頂いた山田佐代子さん、御指導御校閲を頂いた橋本省三教授、病理学教室の秦 順一教授、東京医科歯科大学歯科放射線科学教室佐々木武仁教授に深謝致します。

文 献

- 1) 伊東久夫, 中山俊威, 橋本省三, 他: 神経芽細胞腫の培養細胞における放射線感受性の比較検討, 癌の臨床, 34: 2031-2035, 1988
- 2) Withers HR, Peters LJ: Basic principles of radiotherapy. Biologic aspects of radiation therapy. (In) Textbook of Radiotherapy Fletcher GH (ed), p111-117, Lea & Febiger Philadelphia, 1980
- 3) Durand RE, Sutherland RM: Effects of intercellular contact on repair of radiation damage. Exp Cell Res 71: 75-80, 1972
- 4) Mueller-Klieser W: Multicellular spheroids: A review on cellular aggregates in cancer research. J Cancer Res Clin Oncol 113: 101-122
- 5) Durand RE, Sutherland RM: Radiation studies with spheroids. Recent Results Cancer Research 95: 103-115, 1984
- 6) Williams MV, Denekamp JS, Fowler JF: A review of α/β ratios for experimental tumors: Implications for clinical studies of altered fractionation. Int J Radiat Oncol Biol Phys 11: 87-96, 1985
- 7) 佐々木武仁: 線量と腫瘍制御率との関係, 放医研シンポジウムシリーズ, No 20, がん治療における放射線生物学—新しい放射線治療への展開—, p171-179, 1988
- 8) Yuhas JM: Clonogenic assay for predicting the response of solid tumor to therapy. In: Fletcher GA, Nervi C, Withers HR, eds, Biological Bases and Clinical Implications of Tumor Resistance. New York: Masson Publishing USA Inc, p383-390, 1983
- 9) Pourreau-Schneider N, Malaise EP: Relationship between surviving fractions using the colony method, the LD₅₀, and the growth delay after irradiation of human melanoma cells grown as multicellular spheroids. Radiat Res 85: 321-332, 1981
- 10) Schwachoefer JHM, Crooijmans RPMA, van

- Gastern JJM, et al: Radiosensitivity of different human tumor cell lines grown as multicellular spheroids determined from growth curves and survival data. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 17: 1015—1020, 1989
- 11) Durand RE: Repair during multifraction exposures: Spheroids versus monolayers. *Br J Cancer* 49(Suppl VI): 203—206, 1984
 - 12) Schwachoefer JHM, Crooijmans RPMA, van Gasteren JJM, et al: Repair of sublethal damage in two human tumor cell lines grown as multicellular spheroids. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 17: 591—595, 1989
 - 13) Wheldon TE, Wilson L, Livingstone A, et al: Radiation studies on multicellular tumor spheroids derived from human neuroblastoma: Absence of sparing effect of dose fractionation. *Eur J Cancer Clin Oncol* 22: 563—566, 1986
 - 14) Peacock JH, Cassoni AM, McMillan TJ, et al: The dose-dependence of split-dose recovery in human tumour cells—Implications for comparative studies of cellular recovery (Abstr). *Int J Radiat Biol* 54: 840, 1988
 - 15) Fertil B, Malaise EP: Intrinsic radiosensitivity of human cell lines is correlated with radioresponsiveness of human tumors: Analysis of 101 published survival curves. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 11: 1699—1707, 1985
 - 16) Bristow RG, Hill MSc, Hill RP: Comparison between in vitro radiosensitivity and in vivo radioresponse in murine tumor cell lines II: In vivo radioresponse following fractionated treatment and in vitro/in vivo correlations. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 18: 331—345, 1990
 - 17) Steel GG: *Growth Kinetics of Tumors*. Oxford University Press, 1977
 - 18) Kuwashima Y, Majima H, Okada S: Cure, cell killing, growth delay and fragmentation of X-irradiated human melanoma HMV-I multicellular spheroids. *Int J Radiat Biol* 54: 91—104, 1988
-