The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

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	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

日本医放会誌：51（1），79—87，1991（平3）

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とされている[4]．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]．

臨床上の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．1×10^6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%CO_2，37℃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，1×10^6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

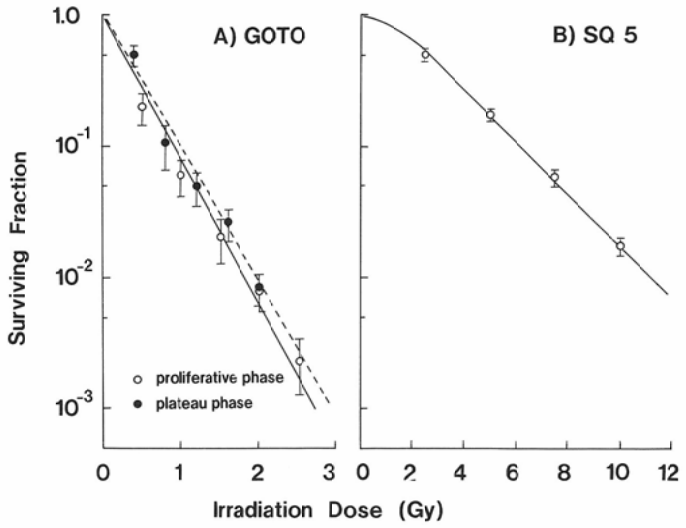

Fig. 1　Dose response curves of the two cell lines. Left panel: GOTO cells (neuroblastoma) in the proliferative phase (—○—) and in the plateau phase (--●--). Right panel: SQ5 cells (squamous cell carcinoma) in the proliferative phase (—○—). Bars are SD of the mean.

ける spheroid 数より治癒率を算出し，照射線量との関係よりTCD_{50}に準じてspheroid control dose 50 (SCD_{50}) 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，D_0値が0.4Gy となり，定常期でもほぼ同じ曲線を示した(D_0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，D_0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 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．

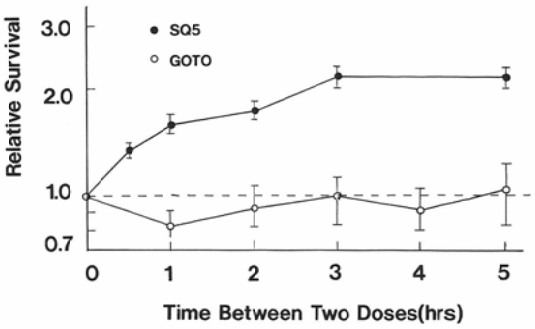

Fig. 2　Recovery between the split-doses in the two cell lines, those are GOTO cells (●) and SQ5 cells (○) in the proliferative phase. Bars are SD of the mean.

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 として，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．

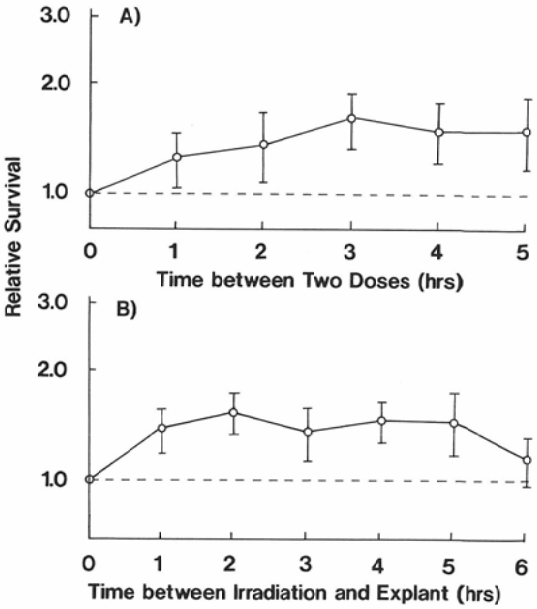

Fig. 3　Relative survivals of GOTO cells in the plateau phase. Panel A : recovery between split doses and panel B : repair of the potentially lethal damage. Bars are SD of the mean.

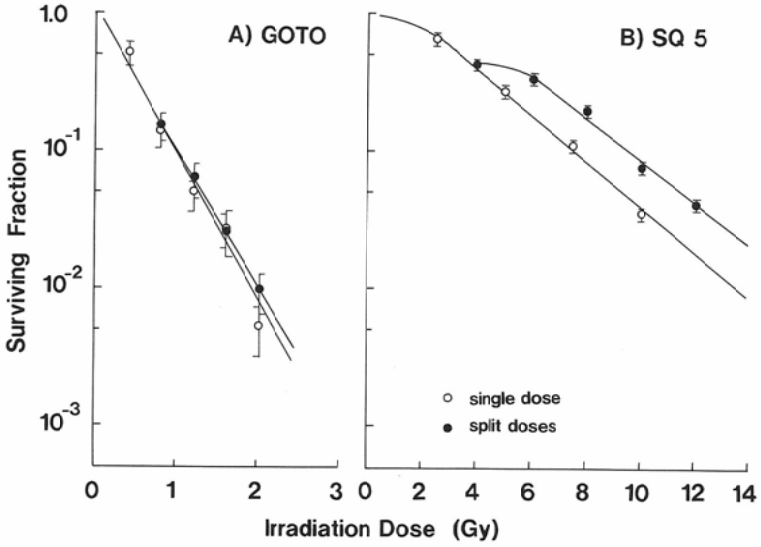

Fig. 4　Dose response curves of split dose experiment. Irradiation was given as single doses (○) or split doses (●). Panel A : 0.8Gy was delivered first and 0.4～1.2Gy were added 5 hours after first irradiation. (GOTO cells plateau phase) Panel B : 4Gy was delivered first and 2—8Gy were added 5 hours after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

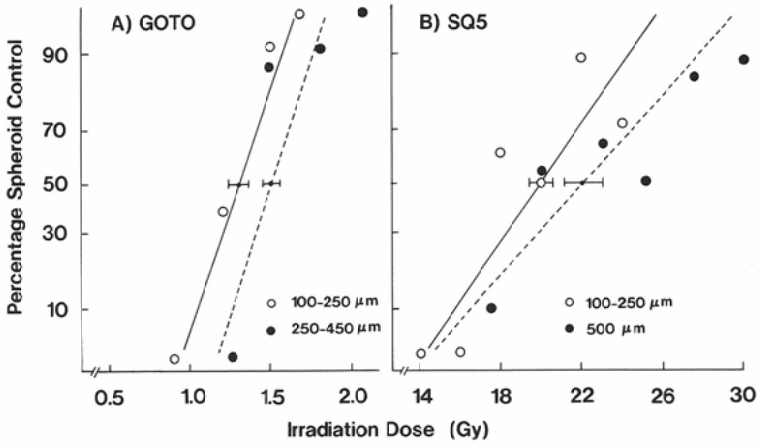

Fig. 5 Percentage spheroid control with the single doses. Panel A: GOTO spheroids in the small sizes (100～250μm) (○) and in the large sizes (250～340 μm) (●). Panel B: SQ5 spheroid in the small sizes (100～250μm) (○) and in he large sizes (500μm) (●). Bars are SD of the mean.

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，SCD_{50}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，SCD_{50}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SCD_{50}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SCD_{50}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，SCD_{50}値に大きな影響を与えなかった．

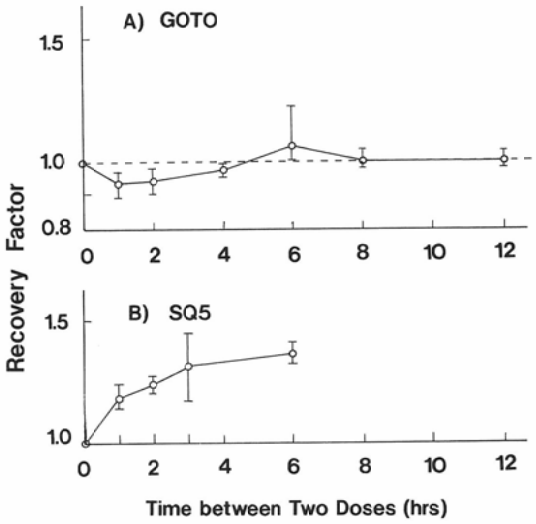

Fig. 6 Recovery between split doses in the two kinds of spheroid (100～250μm), those are, GOTO spheroids and SQ5 spheroids. Bars are SD of the mean.

2) split-dose に対する反応

100～250μm の GOTO spheroid のSCD_{50}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，SCD_{50}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 SCD_{50} 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 (100-250μm)

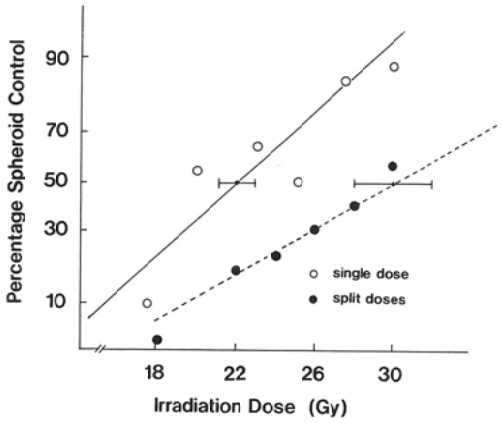

Fig. 7 Percentage spheroid of large size SQ5 spheroids (500μm). Irradiation was delivered as single doses (○) or split doses (●). Bars are SD of the mean.

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SCD_{50}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SCD_{50}値を求めてTable 1に示した．3，4分割にするとSCD_{50}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．100～250μm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500μm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．500μmのspheroidの場合も，回復率は1.3で100～250μmのspheroidと同様であった．しかし，SCD_{50}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[8]．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TCD_{50}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と判定されれためには，spheroid表面に移動して増殖する必要があり，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か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[4]．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SCO_{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．100～250μm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170μm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SCD_{50}の線量で0.2Gyしか違わず，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SCD_{50}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SCD_{50}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 radotherapy. 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 intercellulr contact on repair of radiation damage. Exp Cell Res 71: 75—80, 1972
4) Mueller-Klieser W: Multicellualr 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 tumours: 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 Rdioresistance. New York: Masson Publishing USA Inc, p383—390, 1983
9) Pourreau-Schneider N, Malaise EP: Relatonship between surviving fractions using the colony method, the LD_{50}, 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 sublehal 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