The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	単層培養細胞の増殖速度が分割照射後の細胞生存率におよぼす影響
Author(s)	竹政, 和彦
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1992, 52(7), p. 1007-1015
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/18912
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：52（7），1007—1015，1992（平4）

単層培養細胞の増殖速度が分割照射後の細胞生存率におよぼす影響

慶応義塾大学医学部放射線科学教室（指導：橋本省三教授）
竹　政　和　彦

（平成3年4月2日受付）
（平成3年11月11日最終原稿受付）

Effect of Growth Rate of Monolayer Cells on Survival after Fractionated Irradiation

Kazuhiko Takemasa
Department of Radiology, Keio University, School of Medicine

Research Code No. : 407.2

Key Words : Fractionated irradiation, Monolayer cells, Growth rate, Recovery between split doses

This study was performed to determine the effect of the growth rate of monolyer cells on survival following fractionated irradiation. HeLa and RMUG cells that had different radiosensitivities and growth rates (Do value: 2.3 vs 1.5 Gy, doubling time: 17 vs 46 hours) were irradiated with 2 Gy every day. The fractions surviving after fractionated irradiation were compared with those given single doses. The dose modifying factor for fractionated irradiation was larger in RMUG than HeLa: 1.7 and 1.2, respectively. Two clones from ADGU cells that had the same radiosensitivity but different growth rates were also given fractionated irradiation, but there was no difference in surviving fractions. When recovery following two split doses was determined in each type of cell, the results of the fractions surviving after fractionated irradiation were correlated only with recovery between split doses. These suggest that the growth rates of monolayer cells may not modify the fractions surviving after fractionated irradiation, and the monolayer cell system is not suitable for determining the effect of growth rates on survival following fractionated irradiation.

はじめに

放射線治療による癌制御の可能性は，多種の因子により左右されるが，臨床上重要なものとして，腫瘍サイズ，腫瘍の発生部位，組織型と分化度，患者年齢などがあげられている[1)2)]．これらの因子の多変量解析の結果から，放射線治療効果を予測する数式モデルも作成されている[3)]．しかし，このモデルは現状の放射線治療の有効性を推測するもので，放射線治療を修飾して，治療効果を改善する目的には適さない．放射線治療を修飾するためには，腫瘍細胞の放射線感受性や放射線照射後の回復，腫瘍の増殖速度などの因子を腫瘍毎に解析する必要がある[4)~6)]．例えば腫瘍の増殖速度を放射線治療に加味した場合，増殖が速い腫瘍にはaccelerated fractionationが有効と言われている[7)]．しかし，腫瘍細胞の増殖速度が分割照射時の細胞生存率に及ぼす影響は，十分に解明されておらず，Fowlerは放射線治療法を改善するためには，早急に解決すべき重要な課題の1つとしている[8)]．

本研究は，臨床材料より樹立された放射線感受性と増殖速度の異なる2種の腫瘍細胞株，および1つの腫瘍細胞株より分離された増殖速度の異なる2種のクローンを用いて，腫瘍細胞の増殖速度

が分割照射時の細胞生存率に及ぼす影響を検討し，若干の知見を得たので報告する．

材料と方法

1．培養細胞

本実験には，放射線医学総合研究所より分与された子宮頸癌由来細胞株 HeLaS3[9]，慶応義塾大学医学部産婦人科より分与されたヒト卵巣癌由来株 RMUG[10]，およびヒト甲状腺癌由来株 ADGU を用いた．継代培養，実験に用いた細胞はいずれも，37℃，5％炭酸ガス培養器の中で静置培養した．HeLa と RMUG には，10％牛胎児血清（Gibco）添加 F-10培地（Gibco）を，ADGU には15％牛胎児血清添加 MEM-alpha 培地（SIGMA）を用いた．

ADGU は以下のようにして樹立された．甲状腺癌患者より採取された手術検体を細切後，dish に移して静置培養した．コロニーの形態から鑑別可能な線維芽細胞をラバースクレーパーで物理的に除去した後，再び培養を続けた．この操作を繰り返した後，クローニングにより甲状腺癌細胞の親株（ADGU-P : parent）を樹立した．親株はコロニーの形態が上皮様で，甲状腺上皮組織由来を示唆していた．培養上清の定性検査ではサイロキシンの分泌を認め，ヌードマウスへ移植して癌腫を形成した．この親株を96穴 microplate にて培養し数種のクローンを分離した．この中から安定した増殖曲線を描き増殖速度の速い細胞（ADGU-R : rapid）と，遅い細胞（ADGU-S : slow）を選んで実験に供した．増殖曲線と生存曲線の作成には，Coster tissue culture dish（3060）を使用した．

各実験点の算出には3～5枚の dish を使用し，実験は2回以上繰り返した．

2．増殖曲線

RMUG は8.0×10^4，HeLa，5.0×10^4，ADGU，1.0×10^4個の細胞を dish に播種し，培養開始後24時間毎に血球算定板にて細胞数を算定した．培養液は3日毎に新鮮な培地に交換し，細胞は0.1％トリプシンを約10分間作用させて剥離した．各々の細胞の doubling-time は細胞数―時間曲線から求めた．

放射線照射後の細胞数の変化を検討した実験では，それぞれの最終照射終了24時間後に単一細胞浮遊液を作成し算定した．

3．生存曲線

生存曲線の作成には2×10^5個の細胞を dish に播種し2日間培養後，対数増殖期にある細胞を用いた．1回照射の場合は，照射後直ちにトリプシン処理により単一細胞浮遊液を作成し，dish あたりのコロニー数が50～100になるように，適当数を dish に移した．コロニーの算定は14～18日間37℃，5％炭酸ガス培養器で静置培養後，0.5％クリスタル・バイオレットにより染色して行った．

分割照射の場合は，1回線量1～3Gy を1日1～2回（8時間間隔）連日照射し，それぞれの総線量に応じて最終照射終了後直ちにトリプシン処理により単一細胞浮遊液を作成し，上記の方法に従って生存率を求め，総線量と生存率から生存曲線を作成した．

一回照射時の生存曲線からは Do, n 値を求めて指標とした．均等分割照射時には照射回数に応じた総線量とその時の生存率から，Peters らの方法により Do (eff) 値を算出して生存曲線の指標とした．Do (eff) 値は Do 値と同様生存率を0.37にする線量であるが，1回照射時の Do 値と異なり単に細胞の放射線感受性を示す値ではなく，分割照射の間に起こる回復を加味した値となる．さらに分割照射中生存細胞に増殖がおこっている場合は，Do (eff) 値はさらに大きくなると考えられている[11]．分割照射による細胞生存率の上昇は，1回照射時の Do 値と分割照射時の Do (eff) を比較し，線量修飾係数(DMF)を算出して指標とした．

4．Split-Dose Irradiation の間に起こる回復の検討

2×10^5個の細胞を dish に播種し2日間静置培養後，対数増殖期の細胞を30分～9時間間隔で，細胞生存率が0.01となる線量（HeLa：10.6Gy，RMUG：7.6Gy，ADGU：5.0Gy）を均等2分割で照射した．2回目の照射後直ちにトリプシン処理により単一細胞浮遊液を作成し，生存曲線作成と同様の方法で生存率を求めた．回復は1回照射による生存率と比較し，相対生存率にて表わした．

5. 放射線照射

200kVp, 20mA の X 線(島津製信愛号, 半価層 1.5mm Cu)を, 線量率0.9Gy/min, あるいは Co-60γ 線を線量率1.2Gy/min にて照射した. いずれの場合も照射は室温で行った.

結　果

1. 細胞増殖

HeLa, RMUG および ADGU (P, R, S) 細胞の非照射時の増殖曲線を Fig. 1 に示した. HeLa は細胞播種 4 日後に plateau に達し, 対数増殖期の細胞の doubling time (Td) は17時間であったが, RMUG は増殖速度が遅く plateau に達するま

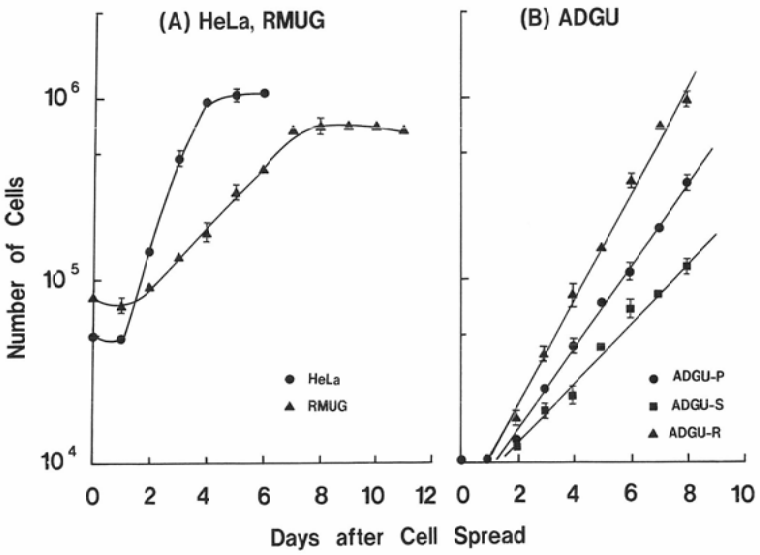

Fig. 1 Growth curves for HeLa. RMUG (panel A; left) and ADGU (panel B; right). Bars are SD of the mean.

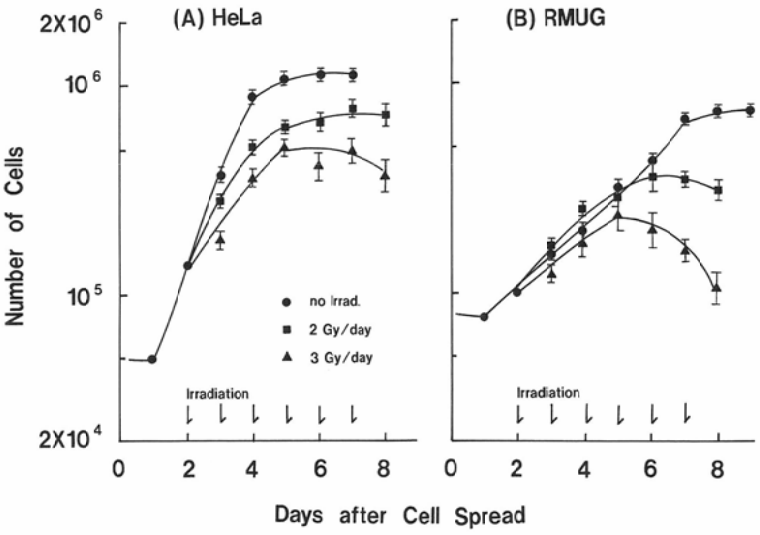

Fig. 2 Growth curves for HeLa and RMUG after irradiation. Cells were irradiated daily with 2 or 3Gy. Bars are SD of the mean.

でに8日かかり，Tdは46時間となった（Fig. 1A）．ADGU-PはTdが33時間であったのに対し，ADGU-Rは22時間，ADGU-Sは43時間となっていた（Fig. 1B）．

2．分割照射時の細胞数の変化

HeLaおよびRMUGに対して，1回線量2あるいは3Gyを1日1回連日照射した場合，照射後のdish中の総細胞数の変化をFig. 2に示した．いずれの細胞も照射開始後3日間は細胞数の増加を認めた．しかし，4日以後は2Gyの照射ではplateauになり，見かけ上の細胞数は変化しなかったが，3Gy照射の場合は時間の経過と共に減少した．非照射対照群と細胞数増加曲線の傾きを比較すると，照射群ではやや緩やかになり，dishあたりの最大細胞数は1回線量の増加とともに減少していた．しかし，細胞数は照射開始後も一定期間は増加し続けていたため，多くの細胞は照射されても増殖を続けていたと考えられた．

3．生存曲線

各々の細胞のplating efficiency（P.E.）は，HeLa：45～58%，RMUG：48～62%，ADGU：8～23%となった．1回照射の場合の生存曲線をFig. 3，その時のDo値とn値をTable 1に示した．放射線感受性はADGU，RMUG，HeLaの順になったが，HeLaとRMUGは生存曲線上shoulderが小さく，n値は1.2～1.5となった．ADGUは他の細胞より小さなDo値を示したが，n値は4.2～9.0となり，明瞭なshoulderを持つ生存曲線となった．しかし，P，RおよびSクローンの間に大きな差異は認められなかった．

1回線量2Gyで1日1回連日照射を行った場合と，1回照射の生存曲線をFig. 4に示した．Fig. 4AにはHeLaとRMUG細胞の1回照射の生存曲線をclosed symbolで，2Gy連日照射の生存曲線はopen symbolで示した．HeLaは1回照射時のDo値は2.3Gyであったが，分割照射によるDo（eff）値は2.8Gyとなり，Do値の比較では分割照射による線量修飾係数（DMF）は1.2であった．RMUGは1回照射によるDo値1.5Gyに対して，分割照射のDo(eff)値が2.5Gyとなり，DMFは1.7となった．すなわち，2Gyの照射を連日繰り

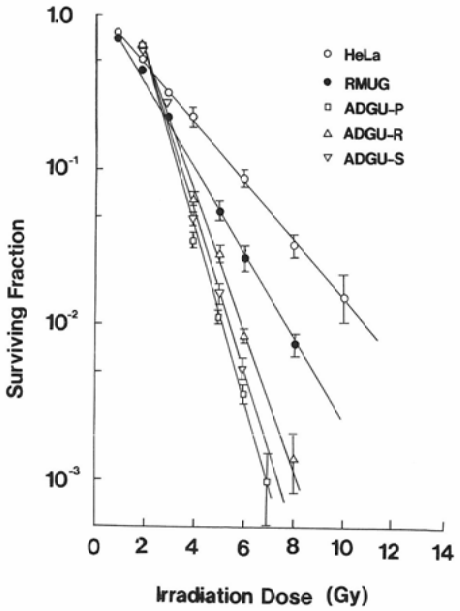

Fig. 3 Single-dose survival curves of five cell lines in the proliferative phase. HeLa and RMUG have a small initial shoulder. ADGUs have a large initial shoulder. Bars are SD of the mean.

Table 1 Plating Efficiency, Do and n Values of HeLa, RMUG and ADGU Cells

	HeLa	RMUG	ADGU		
			Parent	Rapid	Slow
P.E.(%)	45-58	48-62		8-23	
Do(Gy)	2.3	1.5	0.8	1.0	0.8
n	1.2	1.5	9.0	4.2	7.5

返した場合の生存曲線と1回照射の生存曲線を比較すると，同一線量照射時の分割照射による細胞生存率の上昇は，細胞増殖速度の遅いRMUGの方が大きくなり，生存細胞の増殖速度がDMFにおよぼす影響は不明であった．

HeLaとRMUGの比較では両者の放射線感受性が異なっていたため，放射線感受性が同一なADGUのクローンを用いて同様の実験を行った．1回線量2Gyで連日照射した場合の生存曲線をopen symbol，1回照射の生存曲線をclosed symbolを用いてFig. 4Bに示した．分割照射が生存率に及ぼす影響はHeLaやRMUGより大きく，Do値の比較によるDMFはP：1.9，R：2.3，S：

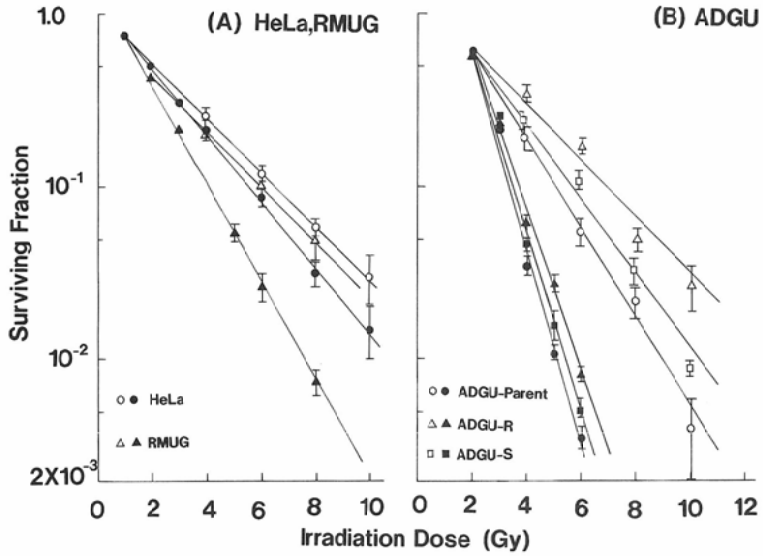

Fig. 4　Single-and fractionated-dose survival curves (2Gy daily) for HeLa, RMUG and ADGU. Panel A (left); single dose for HeLa (●) and RMUG (▲), 2Gy daily for HeLa (○) and RMUG (△). Panel B (right); single dose for ADGU-parent (●), -R (▲) and -S (■), 2Gy daily for ADGU-parent (○), -R (△) and -S (□). Bars are SD of the mean.

Table 2　Do and Do (eff) Values by Fractionated Irradiation

Treatment	Do and Do(eff) value(Gy)				
	HeLa	RMUG	ADGU		
			Parent	Rapid	Slow
single	2.3	1.5	0.8	1.0	0.8
2Gyx2/day	2.5 (1.1)*	1.8 (1.2)*	0.9 (1.1)*	1.0 (1.0)*	1.0 (1.3)*
3Gyx1/day	2.6 (1.1)*	2.0 (1.3)*	1.3 (1.6)*	1.2 (1.2)*	1.2 (1.5)*
1.5Gyx2/day	2.7 (1.2)*	2.3 (1.5)*	1.5 (1.9)*	1.6 (1.6)*	2.0 (2.5)*
2Gyx1/day	2.8 (1.2)*	2.5 (1.7)*	1.5 (1.9)*	2.3 (2.3)*	2.0 (2.5)*
1Gyx2/day	3.0 (1.3)*	3.0 (2.0)*	2.1 (2.6)*	2.4 (2.4)*	2.1 (2.6)*

(　)*：The value shows DMF

2.5となっていた．Pに比べてR，Sクローンはやや大きな値を示したが，生存細胞増殖速度の差異はDMFに反映されなかった．

1回線量を1～3Gyとして1日1～2回の分割照射を行った場合，分割照射の生存曲線よりDo(eff)値を算出してTable 2に示した．DMFは1回照射の生存曲線より求めたDo値との比で求めた．いずれの細胞も1日の総線量が多くなると，分割照射によるDMFは小さくなった．同一線量の場合は，分割回数が少ない方がDMFは小さかった．しかし，HeLaとRMUGの比較では分割方法が変わっても，分割照射が生存率におよぼす影響は細胞増殖の速いHeLaの方が受けにくいことに変わりがなかった．同一細胞由来で細胞増殖速度を異なるADGU-R，Sで比較した場合もHeLaやRMUGと同様な傾向が認められ，1回線量あるいは1日の総線量を多くすると分割照射によるDMFは小さくなった．しかし，細胞増殖速度の違いによるDMFの差異は認められなかった．

4. Split-Dose Irradiationの間に起こる回復

細胞生存率が0.01となる線量(HeLa：10.6Gy，RMUG：7.6Gy，ADGU：5.0Gy)を均等2分割して，30分～9時間の間隔でsplit-dose irradiationを行い，相対生存率の変化をFig. 5に示した．放射線感受性の低いHeLaは1時間で最大の回復に達し，その後はplateauになり最大回復係数は1.4であった．その他の細胞は6時間以内にほ

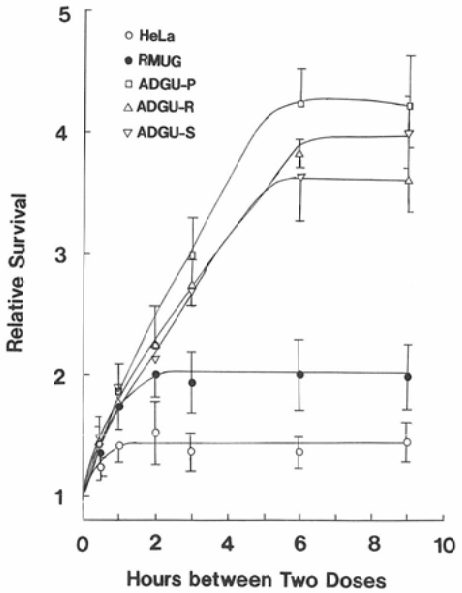

Fig. 5 Recovery between split-doses in the five cell lines, those are HeLa (○), RMUG (●), ADGU-P (□), -R (△) and -S (▽). The data are plotted in terms of the relative survival, defined as the ratio of surviving fractions for a given dose delivered as two fractions compared with a single exposure. Bars are SD of the mean.

ぼ plateau に達した．RMUG の回復係数は2.0となった．ADGU は P, R, S で比較したが，いずれも回復係数は3.8～4.2の間になり，クローンによる明らかな差異は見られなかった．すなわち，2分割時の相対的回復は，HeLa, RMUG, ADGU-P, R, S の順に大きくなり，1回照射と分割照射時の生存曲線から求めた DMF の大きさの順位と一致していた．

考　察

固形腫瘍の放射線治療を行う場合，腫瘍の放射線感受性に関与する多くの因子が解明されてきている．その中でも，実験移植腫瘍を放射線治療した場合，治癒に関する最も重要な因子は，腫瘍の持つ本質的放射線感受性であると報告されている[12]．臨床上も，同一部位の同一組織型腫瘍細胞でも，本質的放射線感受性は著しく異なることが知られてきた[13]．

臨床の放射線治療ではこれら腫瘍細胞の放射線感受性に関与する因子以外に，分割照射が行われるため派生する因子がある．すなわち，放射線治療期間は数週間にわたるため，治療期間中にも腫瘍細胞は増殖し，特に腫瘍細胞の増殖が速い場合には，放射線治療で腫瘍細胞を殺しても増殖によりその効果は相殺される可能性がある．通常の分割照射を変更し，1日の照射線量を多くして治療期間を短縮すると，治療効果の改善する腫瘍が臨床上も報告されている[7]．最近は，多くの腫瘍で治療期間の短縮が良好な治療成績に結びつく可能性が示唆されている[14)15]．また，同一細胞より作成した spheroid の増殖速度を変化させると，放射線感受性も変化することが報告され[16]，腫瘍細胞の増殖速度と放射線治療効果の関係の検討が必要となっている．

本研究では doubling time が17時間の HeLa と，43時間の RMUG という増殖速度が異なる2種の細胞を単層培養で使用し，分割照射に生存細胞増殖速度が及ぼす影響を検討した．いずれの細胞も照射後の細胞増殖速度は非照射対照群に比べるとやや低下したが，HeLa は RMUG よりも速い増殖速度を維持していた（Fig. 2）．照射線量が少ない場合は，細胞数は一定期間後 plateau になったが，線量が多くなると時間の経過とともに総細胞数は減少した．放射線照射を受けた細胞と受けなかった細胞のいずれも照射後増殖を続けるが，死滅した細胞は一定期間後 dish より剝離し，他方生存した細胞の増殖は続き，総細胞数はこの両者のバランスにより見かけ上の変化を形成すると思われる．移植腫瘍を照射した場合も照射後数日間は腫瘍サイズが増大し，照射線量が多いとその後縮小するようになる[17]．照射直後の腫瘍が増大している時期に clonogenic 細胞数を算定すると，生存した細胞は極めて急速に増殖しており，照射により死滅した細胞の脱落により腫瘍が縮小している時期も，clonogenic 細胞の増殖は続いている[17]．したがって，単層培養細胞でも腫瘍と類似した経過を示すと考えられる．

分割照射時の細胞生存を考えた場合，放射線照射期間中も生存細胞の増殖が維持されるとすれば，放射線による殺細胞効果が相殺されることになる．したがって，同一総線量で一回照射と分割

Table 3　Surviving Fractions of HeLa and RMUG Cells Irradiated of 8-9Gy

Treatment		Surviving Fraction	
		HeLa	RMUG
8Gy single dose		0.032	0.008
2Gyx4	experimental	0.059	0.043
	estimated	0.063	0.036
9Gy single dose		0.021	0.004
3Gyx3	experimental	0.031	0.016
	estimated	0.027	0.011

照射の生存率を比較すると，生存細胞の増殖速度が速い細胞では両者の差異が大きくなり，分割照射では生存曲線の勾配が緩やかになると推測される．しかし，1回照射の生存曲線のDo値と分割照射のDo(eff)から算定した線量修飾係数は，増殖速度の速いHeLaの1.2に対して遅いRMUGは1.7となり，増殖速度の遅い細胞の方が分割照射の影響を大きく受けていた（Table 2）．

単層培養細胞に分割照射を行った場合，細胞の生存率に影響する因子として，従来よりsplit-dose irradiationで見られる回復が知られている[5]．本実験に用いた細胞では，生存率を0.01とする線量を均等2分割照射した場合，相対生存率による回復係数は，HeLaが1.4，RMUG，2.0で，RMUGの方が大きくなっていた．HeLaおよびRMUGに1回8～9Gy照射した場合と，1回線量2～3Gyを1日1回，総線量8～9Gyの分割照射を行った場合の生存率をTable 3に示した．HeLaは2あるいは3Gy一回照射における生存率がそれぞれ0.50，0.30となり，RMUGは0.44，0.22となっていた．それぞれの細胞に分割照射を行った後，照射毎に完全回復が起こったとして，推測生存率を算定してTable 3に示した．分割照射の間隔を回復がplateauに達する時間以上にした場合，分割照射の間に回復と生存細胞増殖が起こっていれば，分割照射による生存率は回復のみから算定される生存率より上昇するはずである．しかし実際はいずれの細胞でも回復単独より推測される値と同等になっていた．分割照射期間にcell cycleの変化がおこり放射線感受性が異なることや，実際に回復が毎回同程度におこっているか否かという問題はあるが，実験結果は毎回回復が同程度におこっていたと考えた場合と同様の結果となり，分割照射中の生存細胞の増殖が生存率に明らかな影響を与えていたとは判定出来なかった．

HeLaとRMUGではoriginが異なり，放射線感受性と分割照射時の回復係数も異なるため，これらの因子を除く目的で，ADGUより放射線感受性は同一で増殖速度の異なる2種のクローンを選択した．ADGU-RとS細胞に分割照射を行いDo(eff)値を算出すると，1回線量，分割回数に関わらず両者は同様の生存曲線を示し，細胞の増殖速度は生存曲線に反映されなかった．一方，ADGU-R，SはHeLaやRMUGより分割照射の影響を大きく受け，Do値の比較によるDMFは2.3～2.5となっていた．ADGUのsplit-dose irradiation時にみられる回復係数は，他の細胞より大きく3.8～4.2となっており，やはり分割照射中の生存率には，放射線損傷の回復が大きく関与することを示唆していた．ADGU-Sは増殖が遅く分割照射中にPLD repairが生じて生存に影響する可能性も考えられるが，ADGUの3種細胞のPLDRの程度は同一であった（未発表）．

臨床上は，照射中の生存腫瘍細胞の増殖が治療効果に影響すると報告されているが[7]，本研究結果は臨床上の経験を支持するものとはならなかった．その理由として，本検討は細胞生存曲線のDo値を指標としたため，照射後の生存細胞の増殖が生存率に反映されず，固形腫瘍における生存細胞の増殖による経時的生存細胞数の変化を示すことが出来なかったと考えられる．したがって，単層培養細胞で照射後生存細胞の増殖が生存細胞数に及ぼす影響を検討するには，dishあたりの総細胞数と生存率を経時的に検討することが必要と思われる．さらに，本実験に比べると臨床の分割照射は治療期間が著しく長いことも一因と考えられる．動物実験では照射後の生存細胞増殖は，治療開始後数日から数週間を経過して開始するとされているが[18][19]，dishを使用した場合は細胞増殖に限界があるため，in vitroで行える観察期間では生存細胞の増殖が生存率に反映されにくいと思われる．また，腫瘍と単層培養細胞はcell contactの

状態が全く異なり，in vivo での tumor bed effect 等も出現しないため[20]，培養細胞を用いて，生存細胞増殖速度が生存率におよぼす影響を検討することを困難にしていると考えられる．

まとめ

増殖速度の異なる単層培養細胞に分割照射を行い，細胞の増殖速度と分割照射による細胞生存率の関係を検討した．

1．doubling time が17時間で Do 値が2.3Gy の HeLa と各々43時間と1.5Gy の RMUG に2Gy の連日照射を行い，生存曲線を1回照射と比較したところ，分割照射による dose modifying factor (DMF)は，RMUG が1.7，HeLa 1.2と増殖速度の遅い RMUG のほうが分割照射の影響を大きく受けていた．

2．放射線感受性と分割照射時の回復は同一であるが，増殖速度の異なる ADGU 細胞由来の2種のクローンに分割照射を行った場合も，生存率に差異を認めなかった．分割照射と1回照射の生存率の差異は，増殖速度より split-dose irradiation 時に観察される回復と明瞭な関連を示した．

以上のことから，単層培養細胞を用いた場合，生存曲線の勾配の変化から増殖速度が分割照射時の細胞生存率におよぼす影響を検討することは難しいと考えられた．

本研究の一部は，文部省科学研究費（課題番号：平成2年度，01480275）および伊藤テルミー研究助成金によったことを記して謝意を表します．

稿を終えるにあたり，御指導御校閲を頂いた慶應義塾大学放射線科学教室橋本省三教授及び伊東久夫助教授に深謝致します．

文献

1) Withers HR, Peters LJ: Basic principles of radiotherapy. (In) Textbook of radiotherapy (3rd ed), Fletcher GH (ed), p192—206, Lea & Febiger, Philadelphia, 1980
2) Fletcher GH, Jessee RH: The place of irradiation in the management of the primary lesion in head and neck cancers. Cancer 39: 862—867, 1977
3) Griffin TW, Pajak TF, Gillespie BW, et al: Predicting the response of head and neck cancers to radiation therapy with a multivariate modelling system: An analysis of the RTOG head and neck registry. Int J Radiat Oncol Biol Phys 10: 481—487, 1984
4) Fertil B, Malaise EP: Inherent cellular radiosensitivity as a basic concept for human tumour radiotherapy. Int J Radiat Oncol Biol Phys 7: 621—629, 1981
5) Elkind MM, Sutton-Gilbert H, Moses WB, et al: Radiation response of mammalian cells in culture. Radiat Res 25: 359—376, 1965
6) Dale RG: Time-dependent tumour repopulation factors in linear quadratic equations: Implications for treatment strategies. Radiother Oncol 15: 371—382, 1989
7) Norin T, Onyango J: Radiotherapy in Burkitt's lymphoma. Conventional and superfractionated regime. Early results. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2: 399—406, 1977
8) Fowler JF: What next in fractionated radiotherapy? Brit J Cancer 49(Suppl): 285—300, 1984
9) Puck TT, Marcus PI: Action of X-rays on mammalian cells. J Exp Med Biol 7: 3—28, 1956
10) Nozawa S, Nakazawa Y, Sakayori M, et al: Characterization of a newly established ovarian cancer cell line (RMUG). Human Cell 1: 342—343, 1988
11) Withers RH, Peters LJ: Basic principles of radiation therapy (3rd ed). (In) Textbook of Radiotherapy. Fletcher GH (ed), p114—116, Lea & Febiger, Philadelphia, 1980
12) Bristow RG, 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
13) Deacon J, Peckham MJ, Steel GG: The radioresponsiveness of human tumors and the initial slope of the cell survival curve. Radiat Oncol 2: 317—323, 1984
14) Thames HD, Peters LJ, Withers HR, et al: Accelerated fractionation vs hyperfractionation: Rationales for several treatment per day. Int J Radiat Oncol Biol Phys 9: 127—138, 1983
15) Trott KR, Kummermehr J: What is known about tumour proliferation rates to choose between accelerated fractionation or hyperfractionation? Radiother Oncol 3: 1—9, 1985
16) Schwachfer JHM, Crooijmans RPMA, Hoogenhout J, et al: Radiosensitivity of human melanoma spheroids influenced by growth rate.

Int J Radit Oncol Biol Phys 19 : 1191—1197, 1990

17) Hermens AF, Barendsen GW : Changes of cell proliferation characteristics in a rat rhabdomyosarcoma before and after x-irradiation. Eur J Cancer 5 : 173—189, 1969

18) Withers HR, Mason KA : The kinetics of recovery in irradiated clorogenic mucosa of the mouse. Cancer 34 : 896—903, 1974

19) Moulder JE, Fischer JJ : Radiation reaction of rat skin : The role of the number of fractions and the overall treatment time. Cancer 37 : 2762—2767, 1976

20) Ito H, Barkley HT Jr, Peters LJ, et al : Modification of tumor response to cyclophosphamide and irradiation by preirradiation of the tumor bed : Prolonged growth delay but reduced curability. Int J Radiat Oncol Biol Phys 11 : 547—553, 1985