

Title	光学的細胞密度計測法による細胞生存率算出-Colony法との比較-
Author(s)	西口, 郁; 尾川, 浩一; 伊東, 久夫 他
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1994, 54(1), p. 67-75
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/20584
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

光学的細胞密度計測法による細胞生存率算出

—Colony 法との比較—

西口 郁 尾川 浩一 伊東 久夫 橋本 省三

慶應義塾大学医学部放射線科学教室

Evaluation of Surviving Fraction Using Nonclonogenic Staining Densitometry Method

Iku Nishiguchi, Koichi Ogawa,
Hisao Ito and Shozo Hashimoto

This study was performed to compare our nonclonogenic survival assay (densitometry assay, DM assay) with the widely used clonogenic assay. The established cell lines (HeLa, RMUG, IMR, GOTO) were grown in F10 medium. The cells were spread in 24-well plates, irradiated with different doses, cultured for about one week and stained with crystal violet after the culture period. Taking the transparent images of the stained well on the light source with the CCD camera, the images were collected with the matrix size 64×64, and the integrated optical density of the entire surface of each well was determined by computer with our original program. As the number of cells in the well is reflected by its staining density, the surviving fraction was calculated as the fraction of growth in the irradiated wells relative to controls. The survival curves obtained by the densitometry method showed good correlations with those obtained by clonogenic assay. It is possible to predict intrinsic radiosensitivity with this assay, even if the cells do not form good colonies. However, this method is based on measurements in cultures which

depend on the metabolism and growth kinetics of the irradiated cells. Cells should grow exponentially in the same manner in any well to obtain a result similar to that of clonogenic assay, although growth kinetics may be altered by irradiation. Thus, the endpoint must be strictly standardized.

はじめに

放射線治療による癌根治の可能性は各種の因子に左右され、重要なものとしては、腫瘍サイズ、腫瘍発生部位、組織型と分化度、患者年齢、性別、ヘモグロビン量などがあげられる^{1)~5)}。これらの因子の多変量解析から、頭頸部腫瘍の放射線治療効果に対する数学的モデルが作成されている⁶⁾。しかし、臨床上放射線治療法の修飾を考える場合、このモデルでは選択の余地が少なく、現状の治療法の効果予測に役立っても、放射線治療法の改善にはあまり有効ではない。個々の患者の放射線治療法を個別化し、治療成績の向上をはかるためには、腫瘍毎に放射線感受性を明確にする必要がある。腫瘍の放射線感受性は各種の因子により変化するが、重要な因子の1つは腫瘍細胞の持つ内因性放射線感受性である^{7)~9)}。しかし、個々の患者で放射線治療前あるいは治療開始直後までの短期間に、内因性放射線感受性を明らかにすることは容易でない。

Brockらは生検材料を用いて、細胞生存率を光学的解析により測定し、2週間の培養期間で癌細胞の放射線感受性を検定する手技を報告している^{9),10)}。本研究は、放射線照射後一定期間培養し、再増殖した細胞数を細胞密度の画像情報とし

Research Code No.: 402.3

Key words: Radiotherapy, Radiosensitivity, Cultured Cell, Prediction, Nonclonogenic assay

Received Nov. 9, 1992; revision accepted Apr. 23, 1993

Department of Radiology, School of Medicine, Keio University

て採取し、我々の開発したコンピュータ解析システムで解析して（光学的細胞密度計測法, densitometry method: DM法）、従来行われてきたコロニー法による細胞生存率算出法の代用になるか否かを検討し、若干の知見を得たので報告する。

材料と方法

1. 培養細胞と放射線照射

本検討にはヒト悪性腫瘍より樹立され放射線感受性が異なる各種の培養細胞（神経芽細胞腫由来のGOTOとIMR, 子宮癌由来のHeLa, 卵巣癌由来のRMUG）を用いた。

細胞培養は、神経芽細胞腫にはRPMI-1640培地（Gibco）に15% fetal bovine serum（Gibco）を、その他の細胞にはF-10培地（Gibco）に10% fetal bovine serumを添加した培地を使用し、37°C, 5%炭酸ガス培養器の中で静置培養した。DM法では、24 wellマイクロプレート（Falcon）に1 well当たり $10^2 \cdot 3 \times 10^3$ 個の細胞を播種し、24時間後の対数増殖期にある細胞を照射した。

コロニー法による細胞生存率は以下のごとく算出した。直径60 mmプラスチックシャーレ（Falcon 3002）に 10^6 個の細胞を播種し、24-36時間後の対数増殖期細胞を照射した。照射後0.1%トリプシン液処理により細胞浮遊液を作成し、23ゲージの注射針を用いて4回ピペッティングを行い単離細胞浮遊液を作成した。その一部をプラスチックシャーレ（Falcon 3002）に移しコロニーを形成させた。移植する細胞数は、生存細胞がシャーレ当たり40-70個になるように希釈調整した。HeLa, RMUG, IMRは8日間, GOTOは14日間, 37°C, 5%炭酸ガス培養器の中で静置培養した。ただし, GOTO細胞は培養期間が長いため, 8日目に新鮮な培地と交換した。

培養細胞の照射は、200 kVp, 20 mAのX線（島津製信愛号, 半価層1.5 mm Cu）を線量率90 cGy/minにて使用し、室温で行った。

細胞の染色は、培地を吸引、PBSで洗浄した後、95%エタノール中に0.4%クリスタルバイオレットを含む染色液を用いた。染色性を一定にす

るために染色液の量は各wellで同一とし、各plateの染色時間も一定としている。plate間の染色性の差をなくするためにplate毎に無照射のwellを設け、その染色度を測定し、ほぼ同一のものにつき染色度を測定している。

2. DM法の原理

生存細胞数を増殖したコロニーの数で計測する手技がコロニー法とすれば、その細胞数を体積として測定するのがDM法となる。コロニー法では特定の構成細胞数を持つ細胞群が1個の生存細胞から形成されたと仮定している。これに対しDM法では、生存細胞によって形成された細胞群の全体の体積を測定するため、細胞の分裂および成長に関する因子までも含めた形で評価されることになる。

以下に、この計測法の原理に関して述べる。

単位面積当たりで計測される細胞の個数は染色作用で色の濃度に変換される。

細胞数(N)と本DM法システムで計測される濃度値(D)の間には直線関係

$$D = aN$$

が成立する。

濃度をCCDカメラで定量する際には透過光強度(I), すなわち撮像系のCCDからの電流値が測定され、濃度値(D)に変換されるが、両者の間には一般的に非線形関係

$$I = f(D)$$

が成立する。これを補正するためには $f(\cdot)$ の逆関数 $f^{-1}(\cdot)$ を用いて

$$D = f^{-1}(I)$$

を求めることで、濃度値に変換できる。

実際には細胞はwellの培地内で成長するので、これらの培地やwellなどのバックグラウンド成分を考慮し、単位面積当たりの細胞数を求める必要がある。実際に測定された透過光強度(I)およびバックグラウンド(Ib)を上記の補正式で補正し濃度値を求め、濃度値(D')からバックグラウンド成分のみに関する濃度値(Db)を引いたものが細胞に関する濃度値(D)となる。

$$D' = f^{-1}(I), \quad Db = f^{-1}(Ib)$$

$$D = D' - Db$$

上に示したように単位面積当たりの細胞染色濃度値とその部位の細胞数は直線関係にあるので、各ピクセルの細胞が関与している濃度値から細胞数が求められる。よって各ピクセル毎に細胞が関与する濃度値を求め、wellに関心領域を定め、積分すれば、well内すべての細胞濃度値が求められ、細胞数を求めることができる。

3. DM法の手技

DM法では画像データをCCDカメラで撮像し、この画像をパーソナルコンピュータに入力し解析を行った。計測システムの写真及び模式図をFig. 1に示したが、計測システムの構成は、高周波電源を有するライトボックス(SFC製)上にマイクロプレートを置き、この画像を単板型CCDカメラ(FCD-725 [池上通信機製])で撮像した。このカメラの水平解像度は450、垂直解像度は350である。また、有効画素数は横760、縦485である。レンズにはキャノンJ6X11 TV ZOOM LENSを用いた。画像の表示には20インチのカラーモニター(TM 2056 S [池上通信機製])を、フレームメモリには、8 bitのRGB画像(縦780×横525画素)を2枚記録できるBM-3182 P(池上通信機製)を用いた。画像解析のためのパーソナルコンピュータにはPC-9801 RAを用い、48 CHの平行I/OポートAB 980-04 A(アドテックシステムサイエンス製)を入出力インターフェースとし実装した。画像データの入出力ならびにデータ表示、解析のためのソフトウェアはMS-DOS上のBASIC言語で自作した。

画像データはピクセルサイズ0.33 mm、マトリクスサイズ64×64で入力した。標本は紫系の色で染色されているが、濃度が低いところではピンク色となるため、データ収集時にはこの補色である緑のフィルタを用い、測定データのダイナミックレンジを上げた。光学系による濃度歪や測定条件を均一とするために、plateを動かしながら、1つ1つのwellの画像を同じ幾何学的な条件(視野内の位置、拡大率)のもとで収集した。レンズの絞りはF 11にして、最大の明るさに対する画素の値が測定限界である255を越えないよ

うにライトボックスの照度を調整した。

データ解析の手順は以下のごとく行った。

- (1) 細胞を播種しないwellをバックグラウンド画像 $B(i, j)$ として入力し、この中心部に24×24画素の矩形の領域を設けその平均値 m を算出した。

$$m = \sum \sum B(i, j) / 24 / 24$$

i, j

ここで $B(i, j)$ [$1 \leq i, j \leq 64$] は、バックグラウンド画像である。

- (2) 試料のwellの画像を(1)と同一の条件で入力し、この画像におけるwellの中心を決定する。この際、PC-9801のモニターに試料画像ならびにその画像データのx軸方向とy軸方向への線積分値をグラフで示し、それぞれに表示されたカーソル線をwellの外壁部にセットすることで中心を求めた。

- (3) この中心から半径28画素の円(直径19 mm: wellの外径)を描き、この領域内での濃度値 k [$0 \leq k \leq 255$] に対して濃度値ヒストグラム $H(k)$ を作成する。

- (4) カメラによって計測した濃度値 k と実際の濃度値 $D(k)$ との間の関係式を用いて、測定値の校正を行う。ここでは、実験から

$$D(k) = 5.61 \times 10^{-3} \cdot \exp [0.0203 \cdot k]$$

という式を決定し、これを利用して各濃度値に対する校正を行った。(1)で求めた平均値 m に対しても、校正を行った値 $D(m)$ を求めておく。

- (5) 校正された濃度値 $D(k)$ を用いて、

255

$$C = \sum_{k=0}^{255} (D(k) - D(m)) \cdot H(k)$$

$k=0$

を計測する。この C の値は染色された細胞の体積を表す。同様の方法で、他のwellについても C の値を計算し、放射線照射を行わなかったwellの細胞の体積を基準にすることで各々の線量に対する生存率が算出できる。

比較のために行ったコロニー法は肉眼でコロニー数を算定した。1つのサンプル点は平均値と標準偏差を示した。



Fig. 1 (A) Photograph of the densitometry system

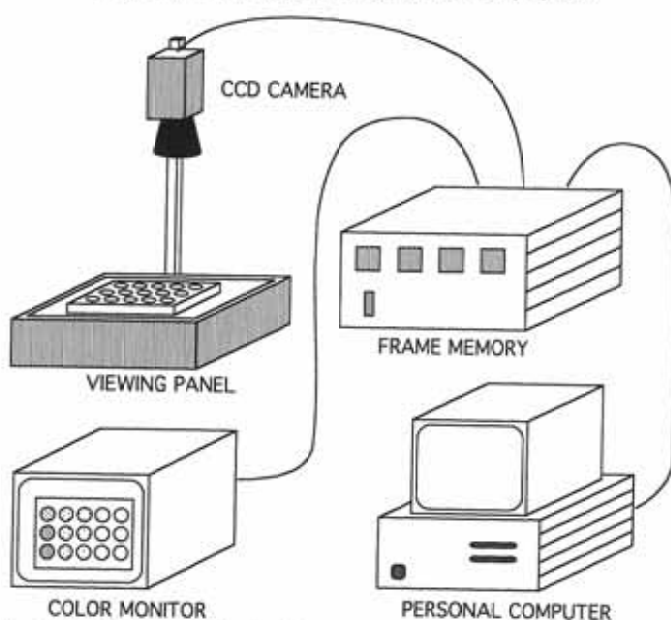


Fig. 1 (B) Schema of the densitometry system: The system is composed of a viewing panel, a CCD camera, a color monitor, a frame memory and a personal computer.

実験結果

1. 濃度値校正曲線

濃度値校正曲線を求めるため、0.4%クリスタルバイオレットを濃度1とし、希釈度1倍から100倍の濃度の異なる染色溶液を各wellに0.5mlずつ入れ撮像した。この画像に対して中心部

で 24×24 画素の矩形領域の平均値を求めた。Fig. 2 (A)に染色液の濃度とカメラによって計測した濃度値の関係を示し、この濃度-測定値関係から計算した校正曲線 ($D = 5.61 \times 10^{-3} \cdot \exp [0.0203 \cdot k]$) を用いて、測定濃度値を補正し、Fig. 2 (B)に示した。補正後は測定値と実際の濃度の関係をほぼ直線にすることが可能となり、測

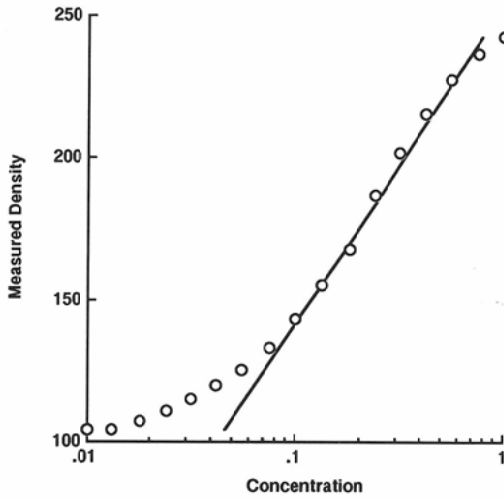


Fig. 2(A) Correlation between the concentration of the die and the actual measured density: The function for the correction ($D(k)=5.61 \times 10^{-3} \cdot \exp [0.0203 \cdot k]$) was determined from this curve.

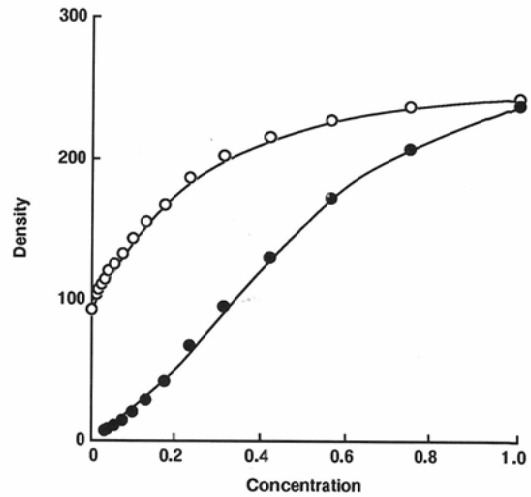


Fig. 2(B) Uncorrected curve and corrected curve: The uncorrected curve is shown with (○). The corrected curve (with the former function) is shown with (●). After the correction, there is an almost linear relation between the concentration of the die and the staining density below the level of 0.75.

定値 93 (バックグラウンド) ~238 は, 相対濃度値 0~0.75 に対応し, この範囲でほぼ直線が保たれた。

染色溶液の容量を 0.5 ml にしたのは, 少なすぎると撮像した well の画像における濃度分散が大きくなり, また多すぎると well 内における染色溶液の高さの影響が測定値にあらわれ, 精度が低下するためである。

2. 無照射群の標準曲線

細胞数と染色度は 1 次の相関を有しているが, 異なる細胞数を well に播種し, 一定期間培養した後染色, 画像解析システムで染色度を計測し, 細胞数と染色度の関係を検討した。Fig. 3 のごとく, それぞれの cell line で, 細胞数と画像解析システムで求めた染色度は, 一定期間の培養後も, ある細胞数以下では良好な 1 次の相関を有し, その領域以上では plateau となっていた。

3. DM法による生存曲線

Fig. 4 に照射された 24 well culture plate の写真を示した。各 well に同数の細胞を播種し, 24 時間後に 200 kVp X 線の異なった線量で照射した。照射後 8-14 日培養を続け, 0.4% クリスタルバイオレットで固定染色した後, 画像解析システ

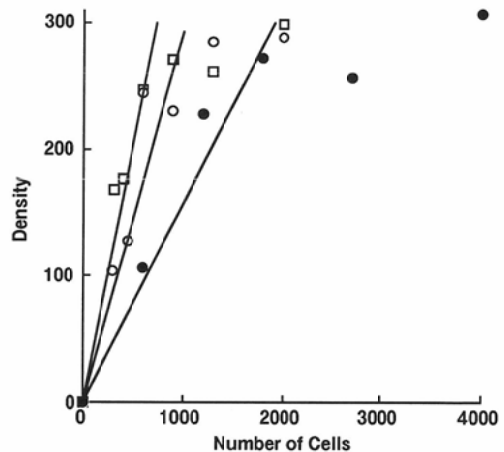


Fig. 3 Correlation between the number of cells and the staining density: (○), (●) and (□) show different cell lines, which are HeLa, IMR and RMUG, respectively. Staining density after 8 days of culturing period showed good correlation with the number of cells below the certain numbers.

ムで処理し染色性を数値化し染色度を求めた。各々の well 内のコロニー数は明瞭には同定できないが, 線量の増加とともに染色度が低下している。上述のごとく, 標準曲線の直線領域では細胞数と染色度は比例していると考えられるため, 無

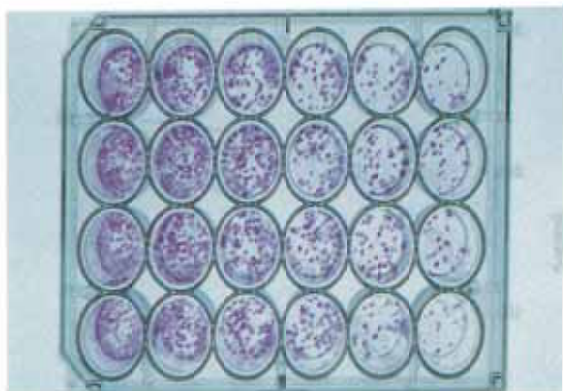


Fig. 4 24-well culture plate: Cells were spread in the wells and were irradiated. They were stained with the crystal violet after a week of culturing period. As the radiation dose increased, the staining density decreased.

照射対照群の染色度に対する照射群の染色度の比を求めることにより各照射線量における生存率が得られる。4種類の異なる放射線感受性を持つ細胞に対して、DM法で生存率を求めた結果をFig. 5に示した。放射線感受性はGOTO, IMR, RMUG, HeLaの順になっていた。

4. コロニー法による生存曲線

各種細胞に放射線1回照射を行い、従来のコロニー法で求めた生存曲線と、DM法より求めた生存曲線をFig. 6に示した。GOTO細胞は放射線感受性が極めて高く、生存曲線上shoulderを示さなかったが、その他の細胞はshoulderを持っていた。コロニー法とDM法の生存曲線を比較すると、照射線量が大きな領域ではDM法はコロニー法よりも曲線の傾きが小さくなっていたが、両者はほぼ良好な相関を示した。

考 察

悪性腫瘍の放射線治療に際し、あらかじめ治療前に腫瘍の放射線感受性を知ることができれば、腫瘍の放射線感受性が高い場合は照射線量を減らして、周囲の正常組織の慢性障害を軽減でき、一方、腫瘍が放射線抵抗性の場合は化学療法など他の治療法との集学的治療の適応や、重粒子治療などの異なる治療法を考慮することができる。生検材料を用いて腫瘍細胞の内因性放射線感受性を検定する方法の中で、in vitro assayとしてはヒト

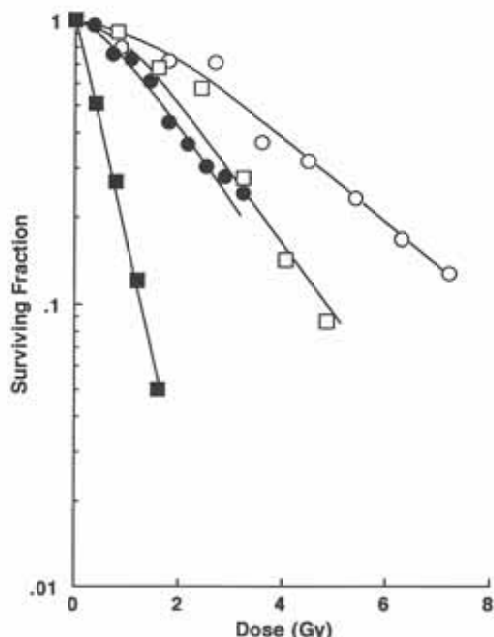


Fig. 5 Survival curves of the cells measured by the DM method: Using four cell lines (HeLa, RMUG, IMR and GOTO), surviving fractions were calculated with the system. According to this result, GOTO(■) was most radiosensitive and IMR(●), RMUG(□), HeLa(○) were less sensitive in this order.

癌コロニー形成法 (HTCA) が代表的である¹¹⁾。しかし、実際には、増殖能を持つ単一細胞が常に容易に得られるとは限らず、コロニー形成率も腫瘍間で大きな差があり、コロニー法が必ずしも行えるとは限らない。コロニー法以外にも、種々の方法が開発されており、色素染色排除試験¹²⁾、MTT法^{13,14)}、micro-nucleus assay¹⁵⁾などがある。しかし、高い再現性を有し、簡便、正確、迅速に検定できる有効な方法は確立されていないのが現状である。Brockらは生検材料を用いて、腫瘍細胞の持つ内因性放射線感受性をコンピュータ支援の画像解析システムを用いて検定する方法を開発してきた^{9,10)}。今回我々はBrockらの方法をもとに、彼らのイメージ収集法に改良を加え、パーソナルコンピュータ上でBASIC言語による独自のプログラムによるシステムを開発し、生検材料による検討を目標とし、基礎的検討として確立された培養細胞を用いて、従来行われていたコロニー法とDM法の比較を行った。コ

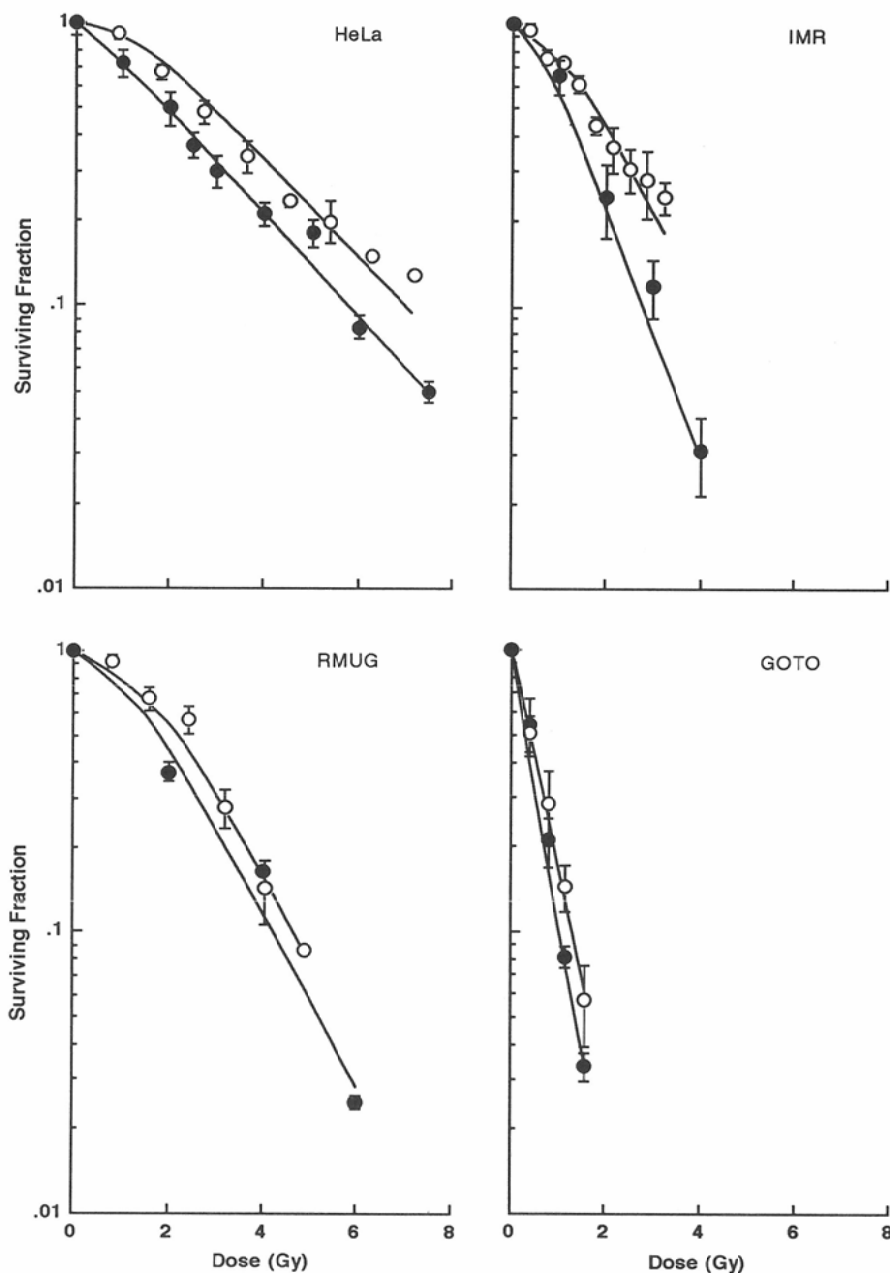


Fig. 6 Survival curves of the cells measured by the DM method comparing with those by the clonogenic assay: Comparing the survival curves by the DM method (○) with those by the clonogenic assay (●), they were almost the same when the radiation doses were low. When the higher doses were given, there was a tendency that the surviving fractions obtained by the DM method were higher than those by the clonogenic assay.

ロニー法は照射後生存細胞が増殖し、集落を形成したとき、その構成細胞の多寡にかかわらず50個以上の細胞からなる集落を1個の生存細胞と見なし生存率を求めているのに対し、DM法は照射

後の培養期間に再増殖した細胞数を評価するために、細胞の分裂、増殖に関する因子をも含めて評価している。従って、増殖条件はin vivoとは大きく異なるものの、放射線照射後の分裂、増殖を

含めた効果判定という点ではコロニー法より腫瘍治療の臨床に近いと考えられる。

DM 法の利点として、(1)本研究では容易にコロニーを形成する確立された細胞群を用いたが、計数可能なコロニーを容易に形成しない細胞でも、well 内で増殖すれば検定できる。(2)すべての well に同じ細胞数が播種されており、無照射対照群と照射群の比を求めて生存率を得るため、コロニー法のように細胞数の厳密な計数や希釈の過程がなく、完全な単一細胞を得ることが困難な場合でも検定でき、より誤差の少ない検定が行える。(3)コンピュータ処理を用いていることから検者の主観、経験に左右されることがない。(4)細胞の播種、放射線照射、培養、染色、染色度測定という過程は簡潔で、細胞への操作が少なく、生存率の人工的誤差を生じる可能性が低い。等が上げられる。

一方、この方法の問題点として、(1)細胞の増殖を含めて評価しているため、コロニー法と同じ結果を得るためには、すべての well 内で生存細胞が同様の増殖を示すことが前提である。具体的には well に播種する細胞数が多過ぎる場合、培養期間が長くなると細胞密度が大きくなり、細胞の増殖速度の遅延、増殖停止あるいは細胞の剥離が認められ、無照射対照群あるいは極めて低い線量群の光学的染色度が対数増殖期にある場合より低く評価されるため、それよりやや高い線量で照射され、対数増殖期にある群の細胞数がむしろ多くなり、低線量領域の生存曲線に生存分画が相対的に 1 を越えるような肩部を生じる結果となる。従って、細胞を固定染色し判定する段階まで、well 内の細胞は対数増殖期になければならない。(2)細胞が致死線量の照射を受けた場合、照射線量に応じて 1 回ないし数回の細胞分裂をすることが知られている¹⁶⁾。コロニー法では単一細胞が増殖し、50 個以上とならなければ集落として判定されないが¹⁷⁾、DM 法では照射により死すべき細胞が培養期間中に死なずに数回の細胞分裂を繰り返し well から剥離しないと、これらの細胞も染色され生存細胞として判定される結果になる。生存細胞が十分に増殖する期間培養すれば、残存する死

細胞の影響を小さくしてこの問題を回避できる。しかし、上述のごとく長期の培養期間は無照射対照群の細胞が plateau 期になる危険性があることに留意していなければならない。(3)また本システムでは希釈の影響を避けるため各 well に同一細胞数を播種しているが、高線量群は低線量群に比べ生存細胞数が少なく、同一期間の培養後、増殖速度が異なると考えられ、高線量群がより大きな細胞群を形成している場合がある。(4) Fig. 2 に示したように濃度と細胞数は 1 次の関数で近似されており、補正曲線が直線となっている部分のダイナミックレンジはおよそ 10 である。従って、そのレンジを越え細胞数が多すぎる領域では濃度値が低く評価され、逆に細胞数が少なすぎる領域では濃度値が高く評価されることになる。

DM 法による生存曲線では、照射線量が大きくなるとコロニー法の生存曲線より傾きが小さくなるのは、これらの現象を反映していると考えられる。

今回の基礎実験で、DM 法はコロニー法と良好な相関を示し細胞の内因性放射線感受性を検定するのに有効な方法と考えられた。本検討で用いた方法は簡便で、確立されていない細胞でもコロニー法と同様の生存曲線を得ることができ、上述したように染色条件を一定にし、endpoint に十分な注意を払えば、臨床上有意義な検定を行うことができると考えられる。

今後生検材料を用いて、検討を重ねていく予定である。

本研究の一部は文部省化学研究費補助金 (01480275, 04670677)、資生会研究助成金 (理事長、小山節子)、および伊藤テルミー研究助成金によることを記して謝意を表します。

文 献

- 1) Fletcher GH (Ed.): Textbook of radiotherapy, 3rd edition. Philadelphia, Lea & Febiger, 1980
- 2) Wall T, Peters LJ, Brown BW, et al: Influence of lymph node status on the preliminary tumor control probability in tumors of the supraglottic larynx. Int J Radiat Oncol Biol Phys 11: 1895-1902, 1985

- 3) Bush RS, Jenkins R, Allt W, et al: Definitive evidence for hypoxic cells influencing cure in cancer therapy. *Br J Cancer* 37: 302-306, 1978
- 4) Peters LJ, Fletcher GH: Causes of failure in radiotherapy in head and neck cancer. *Radiother Oncol* 1: 53-63, 1983
- 5) Peters LJ, Withers HR, Thames HD, Jr., et al: Keynote address: The Problem: Tumor radioresistance in clinical radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 8: 101-108, 1982
- 6) Griffin TW, Pajak TF, Gillespie BW, et al: Predicting the response of head and neck cancers to radiation therapy with a multivariate modeling system: an analysis of the RTOG head and neck registry. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 10: 481-487, 1984
- 7) Fertil B, Malaise EP: Inherent cellular radiosensitivity as a basic concept for human tumor radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 7: 621-629, 1981
- 8) 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
- 9) Brock WA, Maor MH, Peters LJ: Predictors of tumor response to radiotherapy. *Radiat Res* Suppl 8: S 290-296, 1985
- 10) Brock WA, Williams M, Bhadkamkar VA, et al: Radiosensitivity testing of primary cultures derived from human tumors. In: Karcher KH, Kogelnik HD, Szepesi T, ed. *Progress in radio-oncology* III. Vienna: International Club for Radio-Oncology/ Austria; 1987: 300-306
- 11) Salmon SE, Hamburger AW, Soehnlen B, et al: Quantitation of differential sensitivity of human-tumor stem cells to anticancer drugs. *N Engl J Med* 298: 1321-1327, 1978
- 12) Kurohara W, Colman M, Nagourney RA, et al: Radiation response of cells from human tumor biopsies as assessed by a dye exclusion technique: a possible predictive assay. *Int J Radiat Biol* 56: 767-770, 1989
- 13) Mosmann T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55-63, 1983
- 14) Wasserman TH, Twentymen PR: Use of the colorimetric microtitre (MTT) assay in determining the radiosensitivity of cells from murine solid tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 15: 699-702, 1988
- 15) Midander J, Revesz L: The frequency of micronuclei as a measure of cell survival in irradiated cell populations. *Int J Radiat Biol* 38: 237-242, 1980
- 16) Jung H: Postirradiation growth kinetics of viable and nonviable CHO cells. *Radiat Res* 89: 88-98, 1982
- 17) Bettega D, Calzolari P, Ottolenghi A, Tallone Lombardi L: Growth kinetics of C3H 10 T 1/2 cells exposed to low-LET radiation. *Int J Radiat Biol* 55: 641-651, 1989