

RECOVERY FROM RADIATION-INDUCED DAMAGE IN PRIMARY CULTURES
OF HUMAN EPITHELIAL THYROID CELLS

ヒト甲状腺上皮細胞の初代培養におけるX線誘発損傷の回復

RICHARD C. MILLER Ph.D.

TOSHIO HIRAOKA, M.D. 平岡敬生

MASUMI ENNO 遠野真澄

NOBUO TAKEICHI, M.D. 武市宣雄



RADIATION EFFECTS RESEARCH FOUNDATION

財団法人 放射線影響研究所

A Cooperative Japan - United States Research Organization

日米共同研究機関

A paper based on this report was accepted for publication by
The Journal of Radiation Research (Tokyo)

本報告に基づく論文は Journal of Radiation Research (Tokyo) に受理された。

RERF TECHNICAL REPORT SERIES

放影研業績報告書集

The RERF Technical Reports provide the official bilingual statements required to meet the needs of Japanese and American staff members, consultants, and advisory groups. The Technical Report Series is not intended to supplant regular journal publication.

放影研業績報告書は、日米専門職員、顧問、諮問機関の要求に応えるための日英両語による公式報告記録である。業績報告書は通例の誌上発表論文に代わるものではない。

The Radiation Effects Research Foundation (formerly ABCC) was established in April 1975 as a private nonprofit Japanese Foundation, supported equally by the Government of Japan through the Ministry of Health and Welfare, and the Government of the United States through the National Academy of Sciences under contract with the Department of Energy.

放射線影響研究所(元 ABCC)は、昭和50年4月1日に公益法人として発足したもので、その経費は日米両政府の平等分担により、日本は厚生省の補助金、米国はエネルギー省との契約に基づく米国学士院の補助金とをもって運営されている。

RECOVERY FROM RADIATION-INDUCED DAMAGE IN PRIMARY CULTURES
OF HUMAN EPITHELIAL THYROID CELLS

ヒト甲状腺上皮細胞の初代培養における X 線誘発損傷の回復

RICHARD C. MILLER, Ph.D.¹; TOSHIO HIRAOKA, M.D. (平岡敬生)²;
MASUMI ENNO (遠野真澄)¹; NOBUO TAKEICHI, M.D. (武市宣雄)³*RERF Department of Pathology¹; Department of Human Oncology and Radiology, University of Wisconsin²; and Second Department of Surgery, Hiroshima University School of Medicine³*
放影研病理部¹, Wisconsin 大学ヒト腫瘍・放射線学部門², 及び広島大学医学部第二外科学教室³

SUMMARY

Human thyroid epithelial tissue from 23 individuals was obtained from surgical tissue, and cultured in vitro. Dose-response survival curves showed thyroid cells, when compared to mammary epithelial and skin fibroblast cells of human origin, to be only slightly more radio-sensitive to X rays. Cell survival curves from the cell strains showed wide variability in radiation sensitivity. Of the 23 cell strains tested, 21 strains displayed significant shoulders (nonzero quasi-threshold (D_q) values and extrapolation number (n) values greater than 1)* at low dose exposures. The ability of human cells to recover from radiation damage was further studied by dose fractionation. Two cell strains were given a total X-ray dose of 304 cGy in two equal fractions separated by varying time intervals. Maximal cell survival was observed when the time interval exceeded two hours. When the two cell strains were exposed to 152 cGy of X rays followed four hours later by second graded doses, cell survival was enhanced as compared to survival after single dose exposures. However, no benefit of dose splitting was observed when cells were exposed to low second doses. These results support previous studies showing that human cells are capable of repair but require relatively large doses to elicit a repair response.

要約

外科手術を受けた23人から得た甲状腺上皮組織の試験管培養を行った。線量反応生存曲線から、甲状腺細胞の X 線に対する放射線感受性はヒトの乳腺上皮細胞及び皮膚線維芽細胞に比べて、ごくわずかに高くはないことが明らかになった。細胞生存曲線は、細胞によって放射線感受性に大きな変動が認められた。検査した細胞23種のうち21種は、低線量域で有意な肩状を示した〔類閾値 (D_q) は 0 でなく、外挿値 (n) が 1 以上〕。*線量分割照射法を用いて、ヒト細胞の放射線損傷回復能を更に研究した。X 線の総線量 304 cGy を二等分し、種々の時間間隔で 2 種の細胞に照射した。細胞の生存率は、時間間隔が 2 時間以上になったときに最も高くなった。また 152 cGy の X 線をあらかじめ照射した細胞に、更に 4 時間後に 2 回目の照射を種々の線量を用いて行うと種々の線量を 1 回だけ照射したときの生存率と比べて細胞の生存率は増大した。しかし 2 回目に与えた線量が少ない場合には、その差はほとんど認められなかった。これらの結果は、ヒト細胞は回復能があるが、回復反応を引き出すには比較的少量の線量を必要とするという以前の研究結果を支持している。

* n - the extrapolation number, is the value obtained by extrapolating the exponential portion of the survival curve to the zero dose intercept; D_q - quasi-threshold dose. 1 Gray = 1 Gy = 100 cGy = 100 rad

n -外挿値は生存曲線の指数関数部分を延長(外挿)して Y 軸と交わった点の値を示す。 D_q -類閾値線量。 1 Gray = 1 Gy = 100 cGy = 100 rad

INTRODUCTION

In vitro cellular studies have used fibroblast cells almost exclusively to examine the response of human cells to ionizing radiation because of the ease of establishing and maintaining fibroblast cultures. While the results of radio-sensitivity studies have relevance to the understanding of the response to radiation of actively proliferating fibroblast cells in vivo, most human cancers are of epithelial cell origin. The recent technological advances¹⁻⁷ of in vitro culturing of human epithelial cells have enabled investigators to study epithelial cell responses to ionizing radiation directly.

Epidemiologic studies⁸⁻¹¹ have shown that human epithelial cells are sensitive to ionizing radiation. The incidence of both breast cancer and thyroid cancer in individuals exposed to radiation accidentally, therapeutically, occupationally, or during an act of war is increased compared to matched controls. Yang et al¹² performed in vitro studies to examine the dose response of human mammary epithelial cells to X rays and found mean lethal dose (D_0) values* within the range of values routinely observed for fibroblasts. However, the survival curves were unshouldered and therefore suggested an inability of the cells to repair sublethal damage. Studies with rat mammary¹³ and rat thyroid¹⁴ epithelial cells, on the other hand, show that cells are able to repair sublethal damage.

The present study examines the response of human thyroid epithelial cells of 23 individuals to x-irradiation. In two individuals, dose fractionation techniques were used to elucidate the radiation damage repair potential of epithelial cells.

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture

Cells, from normal tissue surrounding either papillary carcinomas or follicular adenomas, were obtained from excised tissue of the thyroid during surgical treatment of previously untreated patients at the Second Department of Surgery, Hiroshima University School of Medicine. Immediately after excision, surgical tissue was placed in a container of sterile saline surrounded with ice. Primary cultures were prepared as

緒言

ヒト細胞の電離放射線に対する反応を調べる試験管内細胞研究においては、樹立及び維持が容易なことから、ほとんど線維芽細胞のみが用いられてきた。放射線感受性研究の結果は、生体内で活発に増殖する線維芽細胞の放射線に対する反応の理解に関連したものであるが、ヒトの癌の多くは上皮細胞に由来するものである。近年の科学技術の進歩により、¹⁻⁷ ヒト上皮細胞の試験管内培養が可能となり、上皮細胞の電離放射線に対する反応を直接調査できるようになった。

疫学的調査によれば、⁸⁻¹¹ ヒト上皮細胞は電離放射線に対する感受性が高いことが認められている。事故、治療、職業により、あるいは戦争参加中に放射線に被曝した者における乳癌及び甲状腺癌の発生率は、いずれもこれに組み合わせた対照者に比べて増加している。Yangら¹²は、ヒト乳腺上皮細胞のX線に対する線量反応を調査するために試験管内研究を行い、平均致死線量(D_0)値*が線維芽細胞において通常に観察される値の範囲内であることを認めた。しかし生存曲線は肩状を示さず、したがって、この細胞には亜致死損傷を回復する能力がないことが示唆された。一方、ラット乳腺上皮細胞¹³及びラット甲状腺上皮細胞¹⁴を用いた研究では、細胞は亜致死損傷を回復できることが認められている。

今回の研究では、23例のヒト甲状腺上皮細胞のX線照射に対する反応を調べる。2例については、上皮細胞の放射線損傷回復能を解明するために、線量分割照射法を用いた。

材料及び方法

細胞培養

乳頭状癌若しくは濾胞状腺腫に付随した正常組織細胞を用いたが、これは、広島大学医学部第二外科で治療歴のない患者から外科手術によって切除された甲状腺組織から得たものである。外科組織サンプルは切除後直ちに、無菌食塩水の入った容器に入れ、それを氷中に保存した。初代培養系は以前の報告と

* D_0 - the dose required to reduce survival to 0.37 in the exponential region of the survival curve.

D_0 -生存曲線の指数関数の領域における生存率を0.37まで低下させるに必要な線量。

previously described.¹⁵ Briefly, tissue was minced and enzymatically digested with collagenase at 37°C to yield single cells and cell clumps in suspension. The suspension was filtered (53µm pore size) to remove undigested stromal tissue and then centrifuged to separate the cells from the supernatant. After removal of the supernatant, cells were reconstituted in a 1:1 mixture of αMEM and Ham's F-12 growth medium containing 2.5% fetal bovine serum, insulin (10µg/ml), hydrocortizone (20 ng/ml), transferrin (5 µg/ml), glycl-1-histidyl-L-lysine acetate (10 ng/ml), somatostatin (10 ng/ml), epidermal growth factor (10 ng/ml), glucose (2 g/liter), penicillin (100 IU/ml), and streptomycin (100 µg/ml). Cells were plated into 60 mm petri dishes, allowed to attach overnight, then washed and refeed with fresh medium. Four to seven days later, cells had amplified into numbers sufficient for experimentation.

Experimental Procedure

Subconfluent primary cultures were trypsinized and plated into dishes at various concentrations depending on the estimated amount of cell loss from plating (plating efficiency, PE)* and cell killing by radiation (surviving fraction, SF)* so that, after the two-week incubation period, about 50 macroscopic colonies would appear in each dish. After 18 hours incubation, attached cells were x-irradiated at room temperature using a Softex X-ray machine operated at 40 kVp, 5 mA, with 0.2 mm aluminum external filtration (786 cGy/min calculated dose rate). Due to the poorly penetrating X rays produced from this machine, medium was removed from the dishes prior to irradiation and replaced with fresh medium immediately after the exposure. For both single and split dose exposures, cells were returned to the incubator immediately after each irradiation. After one week's incubation cells were refeed with fresh medium. At the end of the two-week incubation period, cells were fixed in 10% formalin and stained with Giemsa.

同じ方法で樹立した。¹⁵簡単に述べると、組織を細かく刻み、37°Cでコラゲナーゼにより酵素消化させ単一細胞や細胞塊を含む懸濁液を作った。消化されなかった間質組織を除くために、懸濁液を濾過し(孔の大きさは53µm)、上清と細胞を分けるために遠心分離を行った。上清を除去した後、Ham F-12とαMEMとを1:1の割合で混合した培地に2.5%胎牛血清、インシュリン(10µg/ml)、ヒドロコチゾン(20ng/ml)、トランスフェリン(5µg/ml)、グリシル-1-ヒスチジル-L-リジン・アセテート(10ng/ml)、ソマトスタチン(10ng/ml)、上皮細胞成長因子(10ng/ml)、グルコース(2g/l)、ペニシリン(100IU/ml)、及びストレプトマイシン(100µg/ml)を含む培地に懸濁した。60mmペトリ皿に細胞を播種し、一晩かけて付着させ、洗浄した後、新鮮な培地で再び培養した。4日から7日の後、細胞は実験に必要な数まで増殖した。

実験手順

定常期に達していない初代培養細胞をトリプシン処理し、培養皿に種々の濃度で播種した。各皿当たりの播種細胞数の決定は、播種効率(PE)*と放射線による細胞死(生存率, SF)*の効果を考慮に入れ、最終的に2週間の培養後、各皿50個の肉眼で確認できるコロニーが生じるようにした。18時間の培養の後、0.2mmアルミニウムフィルターを用い、40kVp, 5mAの条件でSoftex X線装置を用いて、付着細胞に室温でX線を照射した(算定線量率は786cGy/分)。この装置から生じるX線は透過力が弱いため、照射に先立って培養皿から培地を除去し、照射後直ちに新鮮な培地と取り換えた。1回照射及び分割照射いずれの実験の場合も、各照射の後直ちに細胞を恒温器へ戻した。培養1週間後、培地を新鮮なものと交換し更に培養を続けた。2週間の培養後、細胞を10%のフォルマリンで固定し、ギムザ染色を行った。

* PE - plating efficiency determined by dividing the observed number of colonies from the control group at the termination of an experiment by the original number of cells plated into the dishes; SF - surviving fraction is the fraction of radiation-treated cells that have survived the treatment divided by the original number of cells after adjusting for the PE.

PE-播種効率は、培養皿に播種した細胞のうち幾らの割合でコロニーが形成されたかを示す値。SF-生存率は、放射線照射した細胞のPEを非照射細胞のPEで割ったもの。

Statistical Analysis

For each experiment, the PE and the survival parameters D_0 , D_q , and n were determined by the method of maximum likelihood which is described elsewhere.¹⁵ Briefly, the multitarget, single hit model was fit to the data by the method of maximum likelihood assuming the numbers of colonies formed followed Poisson probability distributions.

RESULTS

The responses of human normal cells in primary culture to X-ray exposure are listed in Table 1. Normal cell strains were derived from 19 females and 4 males ranging in age from 31 to 75 years and who were being surgically treated for either papillary carcinoma or follicular adenoma of the thyroid. In addition, three individuals (83.33N, 83.40N, and 84.03N) were exposed to the Hiroshima atomic bomb.

統計的解析

各実験に関して別の論文¹⁵で説明されている最大尤度法により、PE及び生存パラメーター D_0 、 D_q 及び n を決定した。簡単に述べると、形成コロニー数がポアソン確率分布に従うと仮定して、多重標的の単一ヒットモデルを最大尤度法を用いてデータに当てはめた。

結果

初代培養におけるヒト正常細胞のX線照射に対する反応を表1に示した。これらの細胞は、甲状腺乳頭状癌か濾胞状腺腫の外科手術を受けた31歳から75歳の年齢範囲の19人の女性及び4人の男性から得たものである。しかもこのうち3人(83.33N, 83.40N, 84.03N)は広島で原爆放射線に被曝していた。

TABLE 1 NORMAL HUMAN THYROID CELL RADIOSENSITIVITY PARAMETERS
表1 ヒト正常甲状腺細胞の放射線感受性パラメーター

Cell Strains	Plating Efficiency	D_0	D_q	n
82.42N	0.038	88.4 (12.2)	0.0 (0.0)	0.9 (0.5)
83.02N	0.018	113.5 (1.4)	64.3 (6.7)	1.8 (0.1)
83.13N	0.123	93.4 (1.8)	89.0 (7.3)	2.6 (0.2)
83.18N	0.070	82.5 (3.5)	37.3 (14.3)	1.6 (0.3)
83.26N	0.073	96.8 (3.6)	88.1 (15.6)	2.5 (0.5)
83.29N	0.160	92.9 (2.3)	56.0 (10.0)	1.8 (0.2)
83.30N	0.042	72.5 (4.8)	17.9 (17.0)	1.3 (0.3)
83.33N	0.032	105.6 (9.8)	0.0 (0.0)	0.9 (0.4)
83.34N	0.115	89.2 (2.8)	74.6 (11.9)	2.3 (0.4)
83.35N	0.078	92.6 (2.5)	80.6 (11.0)	2.4 (0.3)
83.36N	0.195	113.7 (2.3)	36.7 (10.1)	1.4 (0.1)
83.37N	0.152	94.3 (2.1)	57.1 (10.3)	1.8 (0.2)
83.38N	0.056	87.3 (4.0)	106.5 (14.5)	3.4 (0.7)
83.40N	0.110	90.7 (3.0)	94.8 (11.3)	2.8 (0.4)
83.42N	0.076	98.9 (2.9)	89.1 (11.0)	2.5 (0.3)
84.03N	0.096	98.8 (3.4)	100.9 (12.8)	2.8 (0.4)
84.16N	0.063	73.1 (3.7)	88.0 (13.7)	3.3 (0.8)
84.18N	0.142	106.7 (2.8)	69.4 (10.5)	1.9 (0.2)
84.21N	0.022	70.5 (3.1)	52.5 (12.3)	2.1 (0.4)
84.23N	0.027	74.5 (4.8)	39.7 (16.8)	1.7 (0.4)
84.31N	0.088	110.9 (4.0)	0.0 (0.0)	1.0 (0.1)
84.32N	0.067	76.8 (3.7)	41.8 (13.9)	1.7 (0.3)
84.35N	0.085	91.6 (3.6)	70.4 (13.9)	2.2 (0.4)

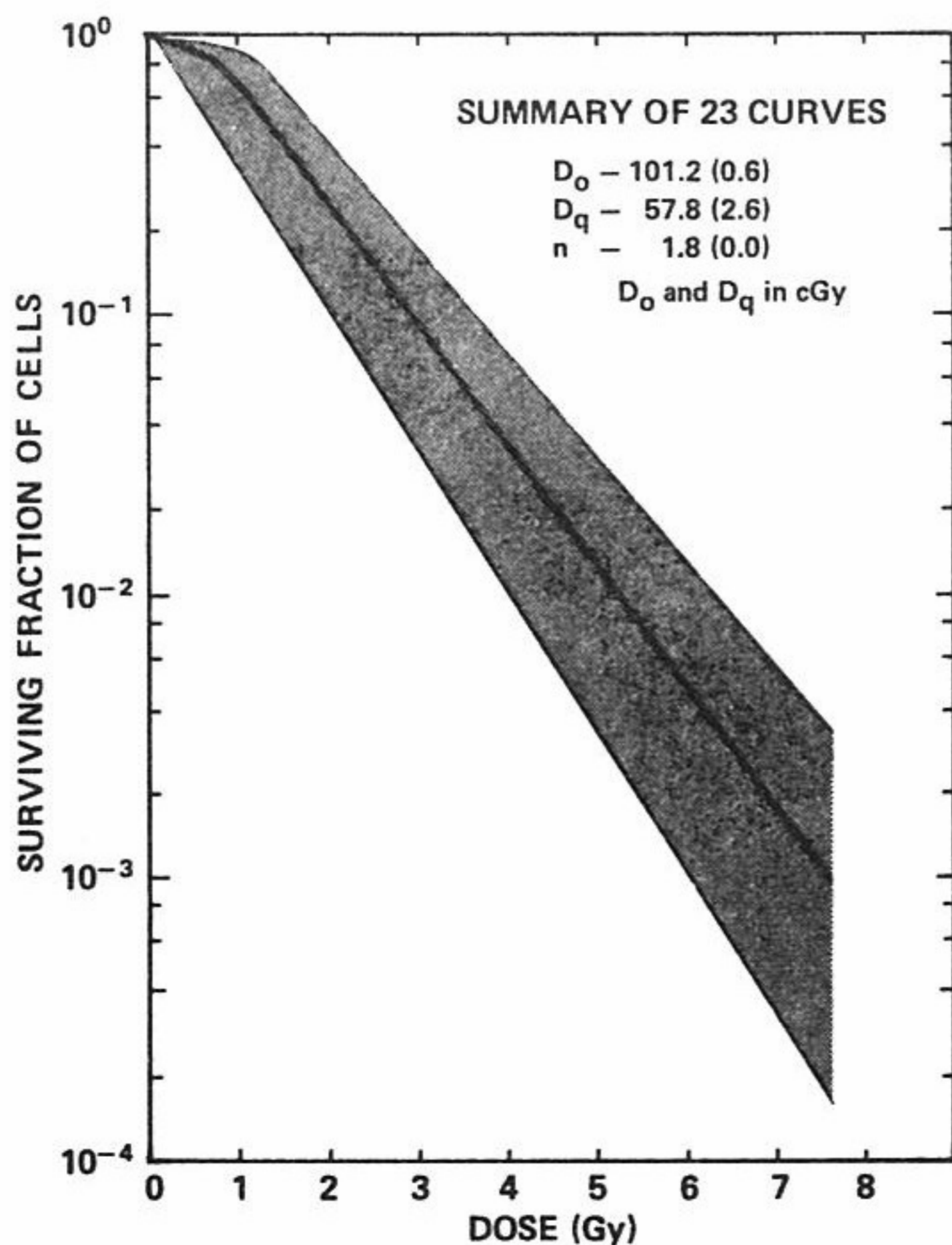
Parameter estimate (standard error of the estimate).

パラメーター推定値(括弧内は推定値の標準誤差)

D_0 and D_q values are given in cGy.

D_0 値及び D_q 値は cGy 単位で示した。

PE values for the 23 cell strains varied from 1.8% to 16%. The dose-response survival curve parameters D_0 , D_q , and n varied substantially between individuals. In all but three cases (82.42N, 83.33N, and 84.31N), survival curves had nonzero D_q values and n values greater than 1. The average D_0 , D_q , and n values (\pm SE) for the 23 cell strains were 101.2(0.6) cGy, 57.8(2.6) cGy, and 1.8(0.0), respectively. Figure 1 shows the survival curve (solid line) generated from the average parameter values. The shaded area surrounding the curve represents the range of actual dose-response survival curves for the 23 individuals. Single and two dose fractionation experiments for cell strains 84.21N and 84.35N are given in Figures 2a and b, respectively. The results of both cell strains exposed to single graded doses of X rays (labeled as "single dose") show survival curves with shoulders at low dose exposures having D_q values of 52.5 cGy and 70.4 cGy, respectively. At high doses, the terminal slopes have D_0 values of 70.5 cGy and 91.6 cGy. For two-dose fractionation experiments, cells were exposed to two equal doses of 152 cGy X rays separated by various time intervals from 0.5 to 5 hours. Immediately after each exposure, cells were returned to the incubator. As seen in Figures 2a and b, cell survival was maximal when the time interval exceeded two hours.



23例の細胞についてのPE値は1.8%から16%まで様々であった。線量反応生存曲線パラメーターの D_0 , D_q 及び n 値は、個人間で大きく異なっていた。3例(82.42N, 83.33N, 84.31N)以外の全例における生存曲線は D_q 値は0でなく、 n 値は1より大であった。23例の D_0 , D_q 及び n 値(\pm SE)の平均はそれぞれ101.2(0.6) cGy, 57.8(2.6) cGy, 1.8(0.0)であった。図1は、パラメーター平均値から求めた生存曲線(実線)を示したものである。生存曲線を囲む色の濃い部分は、23例に関する実際の線量反応生存曲線の範囲を示している。84.21N及び84.35Nの細胞に対する1回照射及び2回の分割照射実験については、それぞれ図2a及びbに示した。2種の細胞に対して種々のX線線量1回照射("1回線量"と図中に表示)を行った結果では、それぞれ52.5cGy及び70.4cGyの D_q 値をもち、低線量において肩状を呈する生存曲線が認められた。高線量においては、末端の傾きの D_0 値は70.5cGyと91.6cGyである。2回照射の分割実験では、0.5時間から5時間までの様々な時間間隔において、等量の152cGyのX線を2回細胞に照射した。細胞は各照射の直後恒温器へ戻した。図2a及びbに示すように、細胞生存率は照射間隔が2時間を超えたときが最大であった。

Figure 1. The average-dose response survival curve of 23 cell strains. Shaded area shows the range of survival curves for the individuals.

図1 23種の細胞の平均線量反応生存曲線。色の濃い部分は、各症例の生存曲線の範囲を示す。

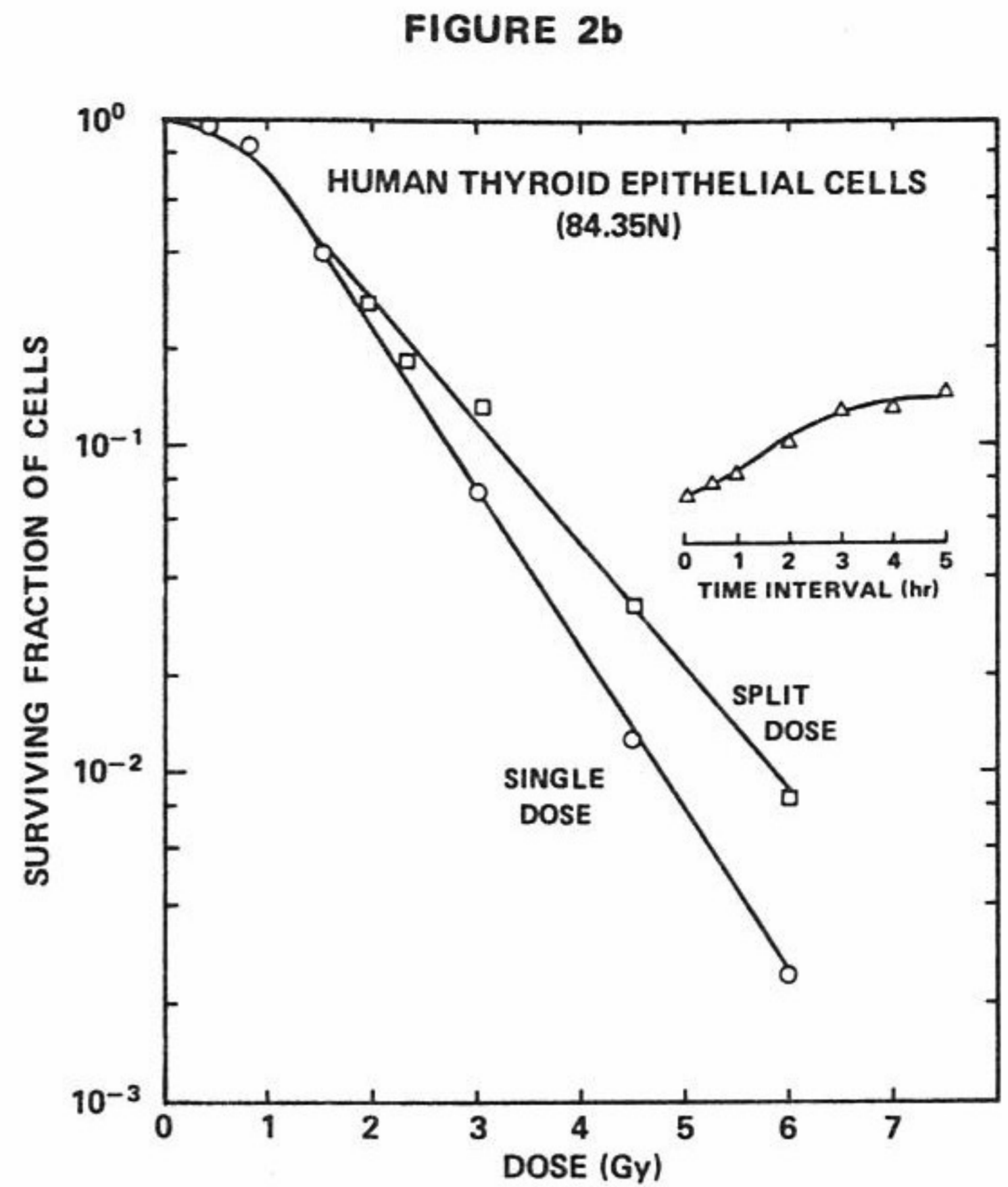
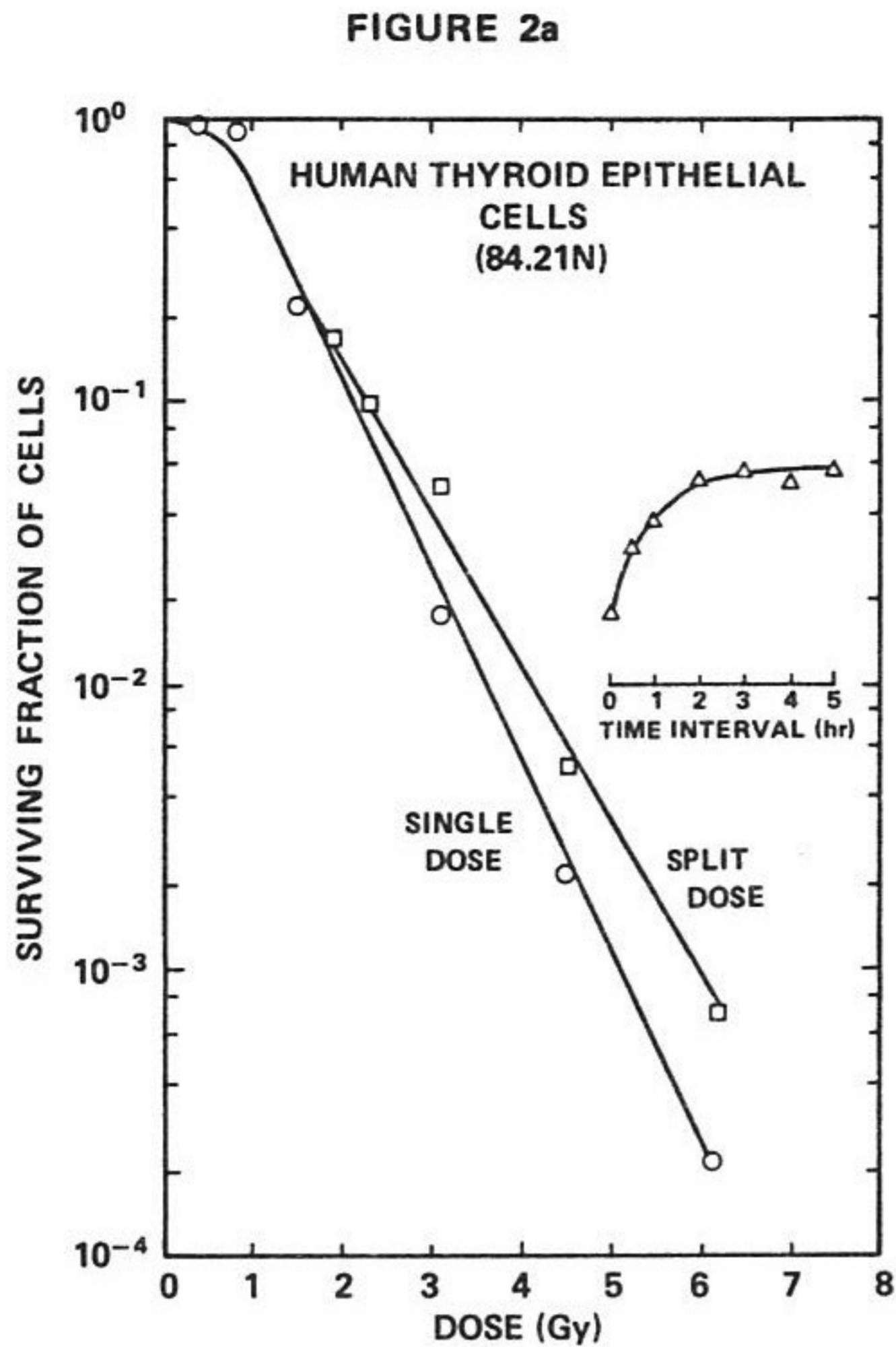


Figure 2. Dose-response survival curves for cells exposed to single or two dose fractions of X rays. a) cell strain 84.21N; b) cell strain 84.35N

図2 X線の1回照射又は2回の分割照射を行った場合の細胞の線量反応生存曲線,
a) 細胞 84.21N b) 細胞 84.35N

Two-dose fraction exposures are also shown for the two cell strains in Figures 2a and b. Cells were irradiated with a first dose of 152 cGy X rays, allowed to incubate at 37°C for four hours, and then given second graded X-ray doses from 38 to 453 cGy. At low doses, cells appear to benefit little from the four hours interval between dose fractions. However, at increasingly higher doses, cell survival is significantly enhanced by fractionation of exposure. By dividing the amount of survival after dose fractionation by survival after a single exposure for each dose, the degree of recovery as a function of dose can be evaluated.¹⁶ Figure 3 presents the recovery ratio over a range of doses for the two cell strains. Cellular recovery after a four-hour time interval between the two doses is minimal at low doses but rises sharply for cells exposed to doses above 250 cGy.

図2a 及び b では、2種の細胞に対する2回線量の分割照射結果も示した。1回目にまず152cGyのX線で細胞を照射し、37°Cで4時間培養した後、2回目に38cGyから453cGyのX線を照射した。低線量では、線量分割照射間隔が4時間あっても、細胞にはあまり影響がみられないようである。しかし、高線量になるにつれ、細胞生存率は分割照射により有意に上昇する。各線量について、線量分割照射後の生存率を1回照射後の生存率で割ることにより、線量の関数としての回復度を求めることができる。¹⁶ 図3は、各線量における2種の細胞の回復率を示したものである。分割照射の間隔が4時間の場合、細胞の回復は低線量ではほとんどみられないが、250cGy以上の線量を照射された細胞では、急速に上昇する。

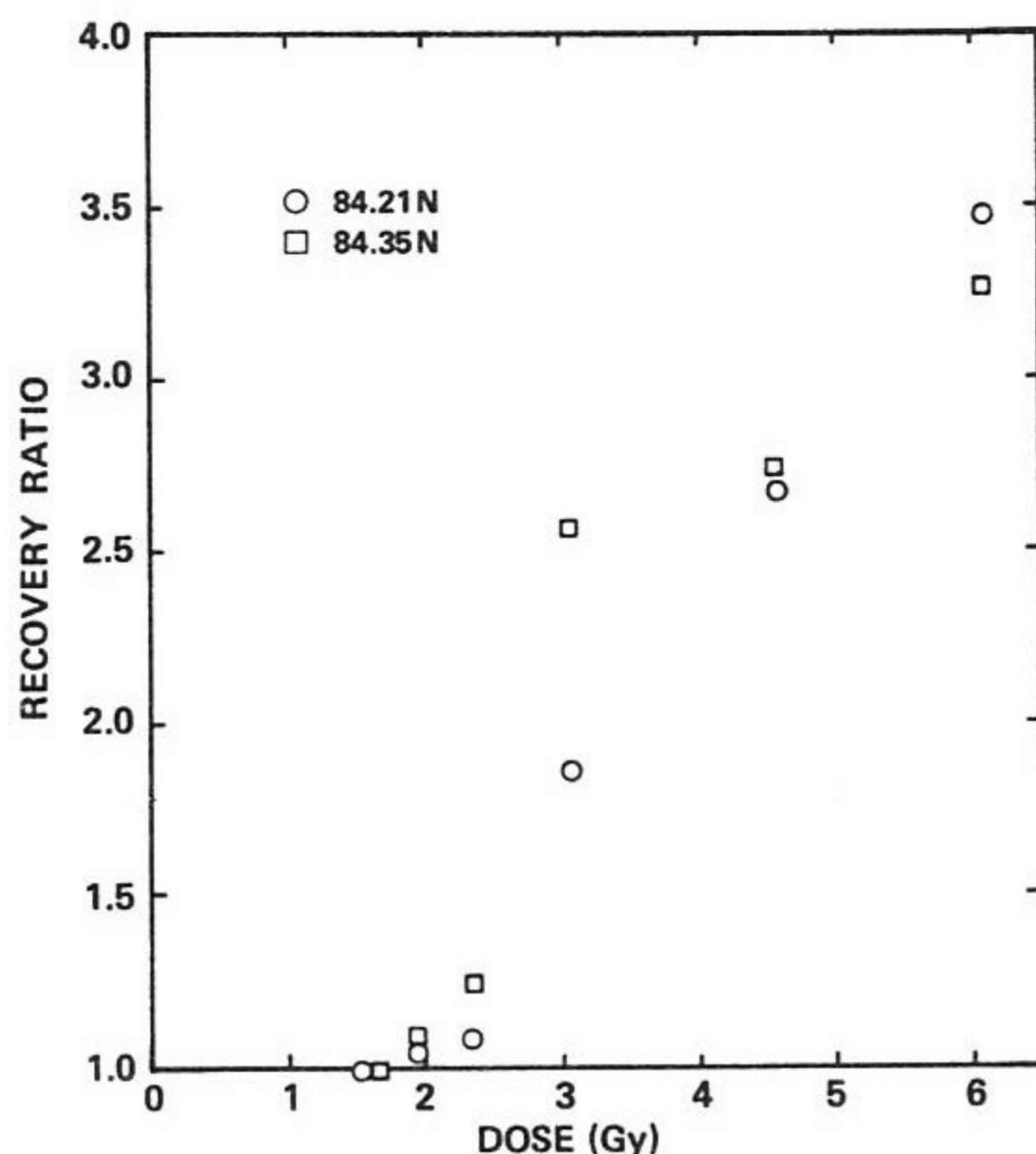


Figure 3. Recovery ratios as a function of dose for two cell strains (84.21N and 84.35N). Recovery ratio is expressed as an ratio of surviving fractions after single and fractionated X-ray exposures.

図3 2種の細胞(84.21N及び84.35N)における回復率と線量との関係。回復率は1回照射と分割照射の生存率の比で表される。

DISCUSSION

Dose-response survival curves show that for the 23 cell strains tested in this study, individual variability results in a wide range of survival parameter values. D_0 values range from 70.5 to 113.7 cGy, D_q values vary from 0 to 106.5 cGy, and n values vary from 0.9 to 3.4. Except for three cell strains (82.42N, 83.33N, and 84.31N), survival curves had initial shallow slopes (shoulders) at low doses and steeper slopes at higher doses. Previous studies have shown no correlation between patient age at the time of surgery,^{12,15} sex,¹⁵ or A-bomb history¹⁵ and the in vitro generated survival curves. Additionally, the disease state of the patients undergoing surgery had no significant influence on cell survival parameters.¹⁵

Although the range of D_0 values suggests that these cell strains are somewhat radiosensitive, it is prudent to mention that the cells were exposed to soft X rays. Zeitz et al¹⁷ have reported a relative biological effectiveness (RBE) of approximately 1.4 when comparing D_0 values between ^{60}Co γ rays and soft X rays. Therefore, an RBE effect may account for at least some of the apparent sensitivity of human thyroid cells to X rays.

考 察

今回の研究で検査した23例の細胞についての線量反応生存曲線は、個体間の変動性により、生存パラメーター値が多様なものになることを示している。 D_0 値は70.5cGyから113.7cGy、 D_q 値は0cGyから106.5cGy、また、 n 値は0.9から3.4までの値を取っている。3種の細胞(82.42N, 83.33N, 及び84.31N)を除き、生存曲線は最初低線量で浅い傾き(肩状)を示し、高線量で急な傾きを示した。過去の研究では外科手術時の患者の年齢,^{12,15} 性別,¹⁵ あるいは原爆被爆歴¹⁵と、試験管実験から得られた生存曲線との間に相関関係はないことが示されている。加えて、外科手術を受けた患者の疾病状態が、細胞の生存パラメーターに有意な影響を与えないことも述べられている。¹⁵

上記の D_0 値の範囲は、これらの細胞はやや放射線感受性が高いことを示唆するが、ここで用いた放射線は軟X線であることを述べておくことは賢明であろう。Zeitzら¹⁷は、 ^{60}Co γ 線と軟X線の D_0 値を比較して、約1.4の生物学的効果比(RBE)を報告している。したがって、本研究で観察されたヒト甲状腺細胞のX線に対する感受性と思われるものの少なくとも一部については、RBEの影響によって説明ができる。

The significant nonzero D_q values and n values greater than 1 for most of the cell strains suggest that human epithelial cells have the ability to recover from radiation damage. Split dose experiments with 2 of the 23 cell strains show that these cells, when given sufficient time between dose fractions, can recover from the effects of the first dose before receiving the second. It is interesting to note that if the second dose fraction is small, there is little or no apparent repair of damage by the second dose. This is illustrated in Figure 3 where, at low doses, very little enhancement in survival is observed with dose splitting. However, at high doses significant recovery ratios are apparent.

Although recovery was not observed by Yang et al¹² when they examined the response of cultured normal human mammary epithelial cells to X rays, fibroblast cells of human origin appear capable of recovery. Malcolm and Little¹⁸ showed rapid repair of sublethal damage with large dose fractions and Freeman et al¹⁶ demonstrated recovery from damage with fractionated doses and varying dose rates of X rays. In vitro studies by Deschavanne et al¹⁹ and in vivo studies by Dutreix²⁰ and Arcangeli et al²¹ suggest that repair of X-ray damage is best observed with large dose fractions.

From the large sample size reported here it is clear that human epithelial cells are capable of recovery from radiation injury. However, in a manner similar to fibroblast cells, recovery of damage by epithelial cells is difficult to detect. Dose fractionation experiments with relatively high doses are necessary to observe cellular recovery from X rays.

大部分の細胞例で有意に0でない D_q 値及び1より大きい n 値が得られていることから、ヒト上皮細胞には、放射線傷害からの回復能があることが示唆される。23種の細胞のうち2種に対して行った線量分割実験では、線量照射の間隔が十分であれば、これらの細胞は2回目の線量を受ける以前に、1回目の線量の影響から回復できることが示された。注目には、2回目の照射線量が少なければ、2回目の線量による損傷の回復がほとんど、あるいは全く認められないことである。これは、図3に示されており、低線量では、線量分割による生存率の上昇はほとんど観察されない。高線量では、回復率は明らかに有意なものである。

Yang ら¹² が行った培養正常ヒト乳腺上皮細胞のX線に対する反応検査では、このような回復は認められなかったが、ヒト線維芽細胞には回復能力があるようである。Malcolm 及び Little¹⁸ は、高線量の分割照射による亜致死損傷が急速に回復することを認め、また Freeman ら¹⁶ は、分割線量及び様々なX線線量率による損傷の回復について明らかにした。Deschavanne ら¹⁹ による試験管内研究と、Dutreix²⁰ 及び Arcangeli ら²¹ による生体内研究は、分割照射線量が高い場合にX線損傷の回復が最もよく観察されることを示唆している。

今回報告した大規模な標本から、ヒト上皮細胞には放射線損傷からの回復能があることは明瞭である。しかし、線維芽細胞と同じ方法では、上皮細胞による損傷の回復は検出が困難である。細胞のX線損傷からの回復を観察するには、比較的高い線量を用いて、線量分割照射実験を行うことが必要である。

REFERENCES

参考文献

1. DOBRYNIN YV: Establishment and characteristics of cell strains from some epithelial tumors of human origins. *J Natl Cancer Inst* 31:1173-95, 1963
2. LASFARGUES EY, MOORE DH: A method for the continuous cultivation of mammary epithelium. *In Vitro* 7:21-5, 1971
3. OWENS RB, SMITH HS, NELSON-REES WA, SPRINGER EL: Brief communication: Epithelial cell cultures from normal and cancerous human tissues. *J Natl Cancer Inst* 56:843-6, 1976
4. SMITH HS, LAN S, CERIANI R, HACKETT AJ, STAMPFER MR: Clonal proliferation of cultured nonmalignant and malignant human breast epithelia. *Cancer Res* 41:4637-43, 1981
5. STAMPFER MR, HALLOWES RC, HACKETT AJ: Growth of normal human mammary cells in culture. *In Vitro* 16:415-25, 1980
6. MILLER RC, HIRAOKA T, TENOU M, KOPECKY KJ, JONES MP, GOULD MN: In vitro culture techniques for human thyroid cells. RERF TR 10-84
7. STANLEY MA, PARKINSON EK: Growth requirements of human cervical epithelial cells in culture. *Int J Cancer* 24:407-14, 1979
8. MODAN B, MART H, BAIDTZ D: Radiation-induced head and neck tumors. *Lancet* 1:277-9, 1974
9. SOCOLOW EL, HASHIZUME A, NERIISHI S, NIITANI R: Thyroid carcinoma in man after exposure to ionizing radiation: A summary of the findings in Hiroshima and Nagasaki. *N Engl J Med* 268:406-10, 1963 (ABCC TR 13-62)
10. CONARD RA, DOBYNS BM, SUTOW WW: Thyroid neoplasia as late effect of exposure to radioactive iodine in fallout. *JAMA* 214:316-24, 1970
11. PARKER LN, BELSKY JL, MANDAI T, BLOT WJ, KAWATE R: Serum thyrotropin level and goiter in relation to childhood exposure to atomic radiation. *J Clin Endocrinol Metab* 37:797-804, 1973 (ABCC TR 29-72)
12. YANG TC, STAMPFER MR, SMITH HS: Response of cultured normal human mammary epithelial cells to x rays. *Radiat Res* 96:476-85, 1983
13. GOULD MN, CLIFTON KH: Evidence for a unique in situ component of the repair of radiation damage. *Radiat Res* 77:149-55, 1979
14. MULCAHY RT, GOULD MN, CLIFTON KH: The survival of thyroid cells: In vivo irradiation and in situ repair. *Radiat Res* 84:523-8, 1980
15. HIRAOKA T, MILLER RC, GOULD MN, KOPECKY KJ, EZAKI H, TAKEICHI N, ITO T, JONES MP, CLIFTON KH: Survival of human normal thyroid cells after X-ray irradiation. *Int J Radiat Biol* 47:299-307, 1985 (RERF TR 13-84)
16. FREEMAN ML, SIERRA E, HALL EJ: The repair of sublethal damage in diploid human fibroblasts: A comparison between human and rodent cell lines. *Radiat Res* 95:382-91, 1983
17. ZEITZ L, KIM SH, KIM JH, DETKO JF: Determination of relative biological effectiveness (RBE) of soft x-rays. *Radiat Res* 70:552-63, 1977
18. MALCOLM AW, LITTLE JB: Rapid recovery in human diploid fibroblasts. *Int J Radiat Biol* 38:439-47, 1980

19. DESCHAVANNE PJ, FERTIL B, MALAISE EP, LACHET B: Radiosensitivity and repair of radiation damage in human HF19 fibroblasts. *Int J Radiat Biol* 38:167-77, 1980
20. DUTREIX J, WAMBERSIE A, BOUNIK C: Cellular recovery in human skin reactions: Applications to dose fraction number overall time relationship in radiotherapy. *Eur J Cancer* 9:159-67, 1973
21. ARCANGELI G, MAURO F, NERVI C, WITHERS HR: Dose-survival relationship for epithelial cells of human skin after multifraction irradiation: Evaluation by a quantitative method in vivo. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 6:841-4, 1980