

ヒト脳腫瘍細胞を用いた comet assay 法による放射線感受性試験

近藤 英宏^{1,3)} 大畑 崇¹⁾ 阿保 満¹⁾
青木 昌彦¹⁾ 真里谷 靖²⁾ 阿部 由直¹⁾

抄録 放射線感受性試験として微小核形成法と comet assay 法はそれぞれ独立に検討されたが、これらの試験法について比較検討した報告はない。本研究では、二種類のヒト脳腫瘍細胞（星細胞腫由来 Becker と髄芽腫由来 ONS76）を用い、標準的な放射線感受性をコロニー法で検定し、この結果を基に微小核形成法と comet assay 法について比較検討した。コロニー法では、Becker は ONS76 に比較して放射線抵抗性であった。微小核形成法では Becker と ONS76 の感受性の差を検出できなかった。一方、comet assay 法では Becker が ONS76 に比較して DNA 損傷の程度がより小さく、その修復もより迅速であり、これらはコロニー法の結果と合致した。この結果、comet assay 法は微小核形成法よりも放射線感受性を正確に反映し、かつ簡便・迅速な検査法として優れており、臨床的有用性が期待された。

弘前医学 52: 110—118, 2001

キーワード：コロニー形成法；comet assay 法；微小核形成法；放射線感受性試験。

COMET ASSAY AS A PREDICTIVE ASSAY FOR RADIOSENSITIVITY OF TWO HUMAN BRAIN TUMOR CELL LINES

Hidehiro Kondo^{1,3)}, Takashi Ohata¹⁾, Mitsuru Abo¹⁾,
Masahiko Aoki¹⁾, Yasushi Mariya²⁾, and Yoshinao Abe¹⁾

Abstract Micronucleus assay and comet assay were compared as a predictive assay for radiosensitivity of tumors. Two human brain tumor cell lines, Becker (derived from astrocytoma) and ONS76 (derived from medulloblastoma) were used. Colony methods as the gold standard showed ONS76 as radiosensitive and Becker as radioresistant cell lines. Micronucleus assay revealed no different radiosensitivity between them. With comet assay, Becker cells received irradiation showed less damage to the DNA and faster repair of the damage than ONS76 cells did. The results correlate with those from colony methods. Comet assay is simple and rapid method for clinical use and it has an advantage not to establish the primary culture. Moreover, the results of comet assay showed not only DNA damage but also repair from the damage. It is concluded that comet assay is a superior method than micronucleus assay and has a potent candidate for clinical predictive assay.

Hirosaki Med. J. 52: 110—118, 2001

Key words: colony method; comet assay; micronucleus assay; radiosensitivity predictive assay.

目 的

腫瘍細胞と正常細胞の放射線感受性の差は放射線治療上、重要な役割を持つ。腫瘍細胞の放射線感受性が正常細胞に比較して優位に高い場

合、放射線治療は理論的に有効である。逆に、腫瘍細胞の放射線感受性が正常に比較して優位に低い場合、放射線治療は無効と考えられる。そのために、腫瘍細胞と正常細胞の放射線感受性を前もって予測する事が出来れば有意義なこ

1) 弘前大学医学部放射線医学講座

2) 青森市民病院放射線科

3) 別刷請求先：近藤英宏
平成 13 年 1 月 22 日受付
平成 13 年 3 月 8 日受理

1) Department of Radiology, Hirosaki University School of Medicine

2) Radiology, Aomori City Hospital

3) Correspondence: H. Kondo

Received for publication, January 22, 2001

Accepted for publication, March 8, 2001

とである¹⁻⁵⁾。

近年、放射線感受性試験として DNA の損傷程度を測定する方法である微小核形成法と comet assay 法が注目されている。現在標準的に用いられている微小核形成法は、サイトカラシン B で細胞質の分裂を阻害しつつ核分裂を促し二核細胞を誘発させる方法である^{3, 6, 7, 8, 10)}。このとき放射線などにより DNA に損傷がある場合、分裂した二つの核の近傍に微小核を形成する³⁾。つまり微小核を形成する細胞は DNA 損傷を受けている細胞と考えられる。微小核形成法は迅速かつ簡便な検査法で、環境および産業により生じる種々の DNA 損傷の研究⁷⁾ および腫瘍細胞の放射線感受性試験として⁷⁻¹²⁾ 多くの研究がなされてきている。

一方、comet assay 法は、microgel electrophoresis 法として最初に報告され¹³⁾、それ以後様々な改良がなされ^{2, 14-23)}、放射線感受性試験としての有用性が示唆されている¹⁴⁻²⁵⁾。Comet assay 法は DNA 損傷による断片化を電気泳動で捕捉し、これを画像的に表示し、DNA 損傷の程度を決定する方法である。損傷刺激後、時間経過を迫って断片化を観察することにより DNA の損傷からの修復能を検討することもできる。さらに細胞融解液の pH をアルカリ性にするにより、DNA の二重鎖断裂 (double strand break; dsb) と一重鎖断裂 (single strand break; ssb) を、中性にすることにより dsb のみを検出することが可能となる^{14, 23-26)}。

これまで放射線感受性試験として、微小核形成法と comet assay 法はそれぞれ独立に検討されている。しかし両者について比較検討した報告はない。そこで、今回ヒト脳腫瘍から樹立された培養細胞を用い、標準的な放射線感受性をコロニー法で検定し、この結果を基に微小核形成法と comet assay 法について比較検討し、これらの有用性について検討した。

材料と方法

培養細胞

ヒト脳腫瘍培養細胞の Becker (astrocytoma 由来) および ONS76 (medulloblastoma 由来) を用いた。これら二つの細胞系は Institute for Fermentation (Osaka, Japan) により樹立された。10 % 子牛血清 (FBS; JRH-Co12003-78P) 添加 Earle's MEM 培地 (E-MEM; MED-007) を用いて、37℃、5% CO₂ の条件下で培養した。

下記の実験に際しては、対数増殖期の細胞を用いた。

コロニー形成法

細胞を 75 cm² の培養フラスコ (IWAKI 3123-075) にて培養し、フラスコ内で照射を行った。照射装置は X 線照射装置 (Simadzu, Pantac-320S, 0.5 mm Aluminum + 0.5 mm Copper filter; 200 kV, 19 mA, 線量率 0.8 Gy/min) を用いて、対照 (0), 1, 2, 4, 6, 8 Gy の照射を行った。対照および照射した細胞は、直ちに 0.2 % トリプシン溶液にて浮遊液を作成し、遠心分離した後、E-MEM にて希釈した。径 10 cm の培養皿 (Falcon, 3003) に適当数の細胞を植えた。14 日間培養器にて培養後、5 % Giemsa 染色液にて数分固定、染色した。染色液を取り除き、蒸留水で数回洗浄した後、風乾した。

50 個以上の細胞を含んだコロニーを、生存したコロニーとして算定した。まず対照である 0 Gy の培養皿のコロニー数を算定し、散布した細胞数で除して、コロニー形成率 (PE; plating efficiency) を求めた。それを元に、各々の照射線量毎の細胞生存率を下記の公式にて求めた。

$$\text{細胞生存率} = \frac{\text{算定されたコロニー数}}{\text{散布した細胞数}} \times \text{PE}$$

微小核形成法

専用のチャンバースライドガラスに 5×10^4 個の細胞をプレートし 24 時間培養した。対照

(0), 1, 2, 3, 4Gy の照射を行った. 直ちにサイトカラシンB (1.5 μ l/ml) を加え, 48時間インキュベーター (37°C, 5% CO₂) に静置した. 0.9% の NaCl で洗浄後, 96% のメタノールで 20 分室温にて固定した. 一昼夜室温乾燥させたのち, 4,6,-diamidino-2-phenylindole (DAPI; 100ng/ml in Tris buffer, pH7.0) で蛍光染色した.

解析には位相差蛍光顕微鏡 (400 倍) を用い, 各標本毎に 200 個の二核細胞を数え, 二核細胞一個あたりの微小核の発生頻度を micronucleus frequency per binucleated cell (MN/BNC) として求めた. 各照射線量毎の MN/BNC をプロットして線量効果曲線を作成し, その増加率・係数を micronucleus induction rate (MNIR) として求めた.

Comet assay 法

Comet assay 法においては, 径 6cm の培養皿 (Falcon 3002) を用いて, これら二つの細胞の培養を行った. 照射装置は, X 線照射装置 (日立メディコ, MBR-1505R2, 0.5mm Aluminum filter; 150kV, 5mA, 線量率 1.2Gy/min) を用いた. 照射は室温, 暗所にて行った.

DNA 損傷試験は培養細胞に対照 (0Gy), 2, 4, 8, 12Gy の照射を行い, 各々について, 直ちにセルスクレーパー (Falcon 3085) を用いて培養皿から細胞を剥離し, 遠心管に移した後, 遠心 (800rpm, 5min, 4°C) して上澄みを取り除いた. 氷冷した PBS を加え 10⁶個/ml の細胞浮遊液を作製した.

DNA 損傷の時間経過を検討するため (DNA 修復試験) に 12Gy の照射後, 培養皿を直ちに孵卵器へ移し, 30, 60, 90, 120, 150, 180 分静置した後, 各々について, 同様の細胞浮遊液を作製した.

標本作成の手順は以下の如くであった. まず, PBS で溶解した 0.5% のアガロースゲル 75 μ l (in PBS, Agarose Iwai chemical 50013R) を全面フロストスライドガラス (Matunami

S-5214) に滴下した. これに別のスライドガラス (Matunami S-2215) を被せ, アガロースゲルを薄く引き延ばし凝固させ, 第一層とした. ゲルが凝固した後, 被せたスライドガラスを第一層がはがれないように除去した. 次に, 第一層の上に, 先に作製した培養細胞浮遊液と 1% の低融点アガロースゲル (in PBS, Sea Plaque GTG Agarose, FMC 50111) を同量混和した溶液 75 μ l を滴下し, カバークラスにて引き延ばして第二層とした. さらに 0.5% アガロースゲル 100 μ l を第二層の上に滴下し第三層とした.

これを氷冷したアルカリ融解液 (pH12.5; 2.5M NaCl, 1% N-lauroyl-sarcosine, 0.1M Na₂-EDTA, 1% Triton X-100, 10% DMSO) の中に浸した状態で冷暗所 (4°C) に一時間静置し, 細胞核を融解した. 標本を融解液から取り出し, 蒸留水で数回洗浄し完全に融解液を除去した後, 電気泳動槽に静置した. そこにアルカリ泳動液 (pH13; 0.3M NaOH, 1mM EDTA) を注ぎ, 冷暗所 (4°C) に 40 分間静置し DNA unwinding を行った. その後, 1V/cm, 0.3-0.5A で 20 分間定電圧電気泳動を行った. 泳動終了後標本を取り出し, 蒸留水にて洗浄した後, バットに標本を水平に置き, 中和液 (0.4M Tris, PH7.5) を標本が浸るまで静かに加え, 室温にて 20 分静置した. 標本を静かに引き上げ, 蒸留水で洗浄した後, 20 μ g/ml のエチジウムブロマイド液 (50 μ l/ml in PBS, SIGMA E8751) を滴下してカバークラスで覆った.

Comet の解析には, CCD カメラを装着した蛍光顕微鏡を用いた. 拡大率 400 倍で細胞核の画像をデジタルデータとして取り込み, 各々の標本について, 50-100 核 Komet imaging system 3.1 (Kinetic Imaging, UK) により解析した. DNA の損傷の程度を tail moment²⁴⁾ として求めた. Tail moment は, 下記のように求められた.

Tail moment; 尾部の DNA 含の割合×頭部と

尾部の重心間の距離：(intensity in the tail comet/sum comet intensity) × (tail center of gravity-peak position).

DNA 修復試験として、時間経過毎の DNA の修復を観察するため、DNA 損傷の残存：residual damage を次のように求めた。

$$\text{Residual damage} = (Mx - Mc) / (Ma - Mc):$$

Mx; 12Gy 照射 x 時間後の平均 tail moment.

Mc; 対照の平均 tail moment.

Ma; 12Gy 照射直後の平均 tail moment.

結 果

コロニー形成法

細胞生存率曲線を図 1 に示す。ONS76 は Becker よりも放射線感受性が高かった。放射線感受性のパラメーターとして、平均致死線量 D0 (高線量域の直線部分において 1/e に減少する線量：放射線感受性を示す)、外挿値 n (高線量域の直線部分を外挿し縦軸と交差する値：放射線感受性を示す)、準閾値線量 Dq (直線部分を外挿し横軸と交わる値：放射線修復能を示す) を求めた。Becker では D0, Dq, n はそれぞれ 3.54Gy, 4.26Gy, 10.54 であり、ONS76 では D0, Dq, n はそれぞれ 1.98Gy, 2.61Gy, 7.02 となった。Becker の Dq は ONS76 よりも高値であり、修復能力が大きいことを示した。D0 値は、Becker は ONS76 の約 1.79 倍であった。これらの結果から、Becker の放射線感受性は ONS76 に比較して抵抗性であった。

微小核形成法

図 2 に MNIR (Gy^{-1}) の結果を示す。Becker は 0.218, ONS76 は 0.219 と二つの細胞間に差は認められず、MN/BNC のパラメーターでは放射線感受性の差を指摘できなかった。

Comet assay 法

損傷試験の結果を図 3 に示す。両者とも線量増加に伴い、tail moment の直線的な増加を示

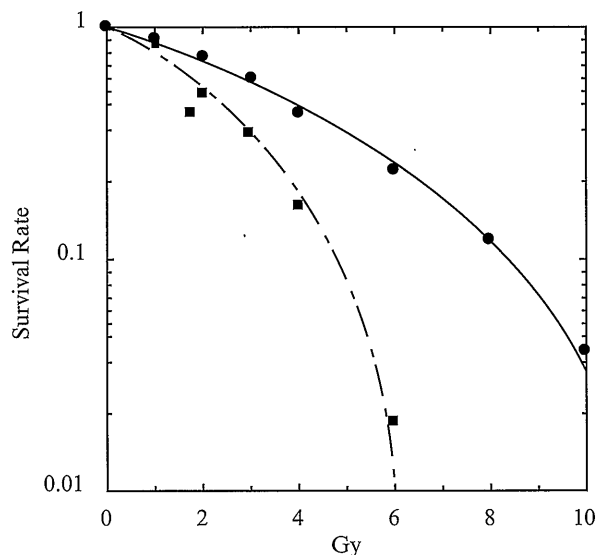


図 1 Becker 細胞と ONS76 細胞のコロニー形成法による線量に対する生存率曲線と、双方の D0, Dq, 外挿値 n の値。■・実線は Becker, ●・破線は ONS76.

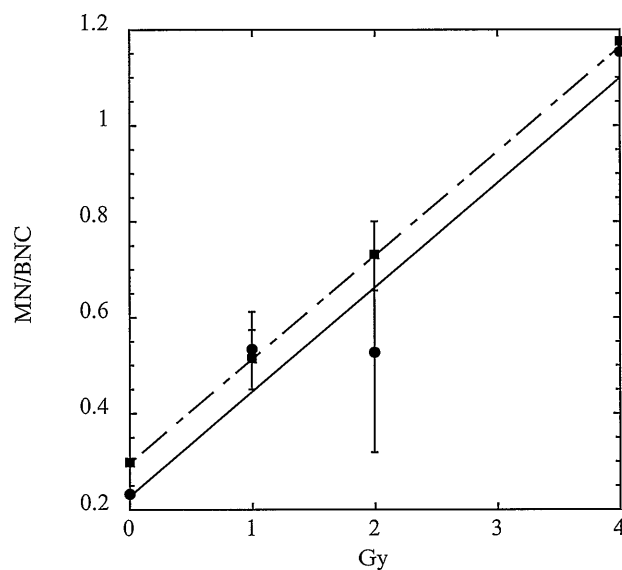


図 2 Becker 細胞と ONS76 細胞の微小核形成法による線量と二核細胞 1 個あたりの微小核発生頻度 (MN/BNC). ■・実線は Becker, ●・破線は ONS76. 各プロットは平均±標準偏差. Becker 細胞と ONS76 細胞はそれぞれ $y = 0.224 + 0.219x$ ($r = 0.993$) と、 $y = 0.296 + 0.218x$ ($r = 0.999$) で回帰される。

した。Becker では照射による損傷がより少なかった。直線の係数は Becker では 0.05/Gy, ONS76 では 0.11/Gy となった。

時間経過による DNA 修復試験の結果を図 4 に示す。両者ともに DNA residual damage は、

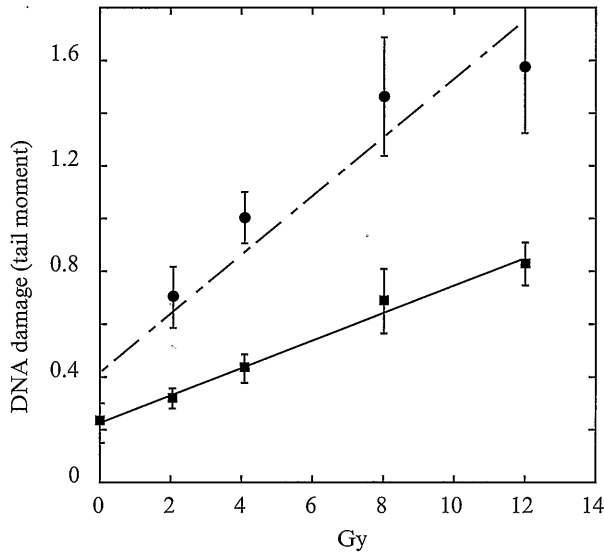


図3 Becker細胞とONS76細胞のcomet assay法によるDNA損傷と線量の関係。■・実線はBecker, ●・破線はONS76。各プロットは平均±標準偏差。Becker細胞とONS76細胞はそれぞれ $y = 0.015 + 0.238x$ ($r = 0.995$) と, $y = 0.110 + 0.426x$ ($r = 0.956$) で回帰される。

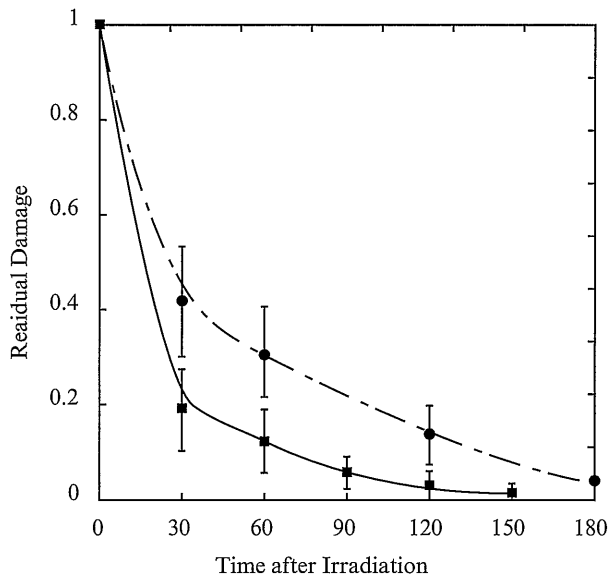


図4 Becker細胞とONS76細胞のcomet assay法によるDNA損傷の時間経過。■・実線はBecker, ●・破線はONS76。各プロットは平均±標準偏差。

照射60分以内に見られる急速な減少 (fast repair) と, その後の緩徐な減少 (slow repair) をしめす二つのコンパートメントから成っていた。約3時間後には, ほぼ plateau に達した。時間経過毎の DNA residual damage はBeckerがONS76よりも大きかった。Becker

とONS76の修復能には有意差があった (30分後 $p < 0.005$, 60分 $p < 0.001$; t検定)。すなわち, DNAの修復はBeckerの方がONS76よりも高いことが示された。反応曲線全体でみた半減期はBeckerで16分, ONS76は26分であり, BeckerがONS76よりも早かった。120分後のDNA residual damageは, Beckerは3%, ONS76は14%と, ONS76における修復の遅延が認められた。

線量に対するDNA損傷の程度を度数分布として二つの細胞間で比較した (図5)。損傷の程度を示す tail moment がONS76ではより大きく, かつ幅広く分布していることが分かった。時間による検討でも修復初期 (30分) での障害がONS76でより大きく残存していることを示した。

考 察

微小核形成法

本研究では, 微小核形成法とコロニー形成法の間にも何れも相関がみられなかった。従来の結果においても相関性については議論のあるところである。良い相関が得られたとする報告^{3, 6~8, 10, 11)}の中で, Mariya *et al.*⁸⁾は, 同一のマウス直腸由来腫瘍 (squamous cell carcinoma) から派生した放射線感受性の異なる3種類の腫瘍を用いて良好な相関を得ている。Shibamoto *et al.*³⁾は, 数種のヒトとマウス腫瘍細胞の初代培養を用いて, *in vivo* と *in vitro* での検査を行い, 両者に良い相関を得ている。一方, 微小核形成法とコロニー形成法との間に, 相関が見られないという報告がある^{9, 28, 29)}。Slavotinek *et al.*²⁹⁾は6種類のヒトリンパ芽腫細胞間において両者の相関は得られなかったと報告した。また Bush *et al.*⁹⁾は, 数種類の異なる組織のヒト腫瘍細胞 (neuroblastoma, bladder carcinoma, medulloblastoma) の間に相関の完全な乖離を認めていた。用いた腫瘍細胞の種類が大きく異なる場合には, この傾向が強いようであると考えられる。

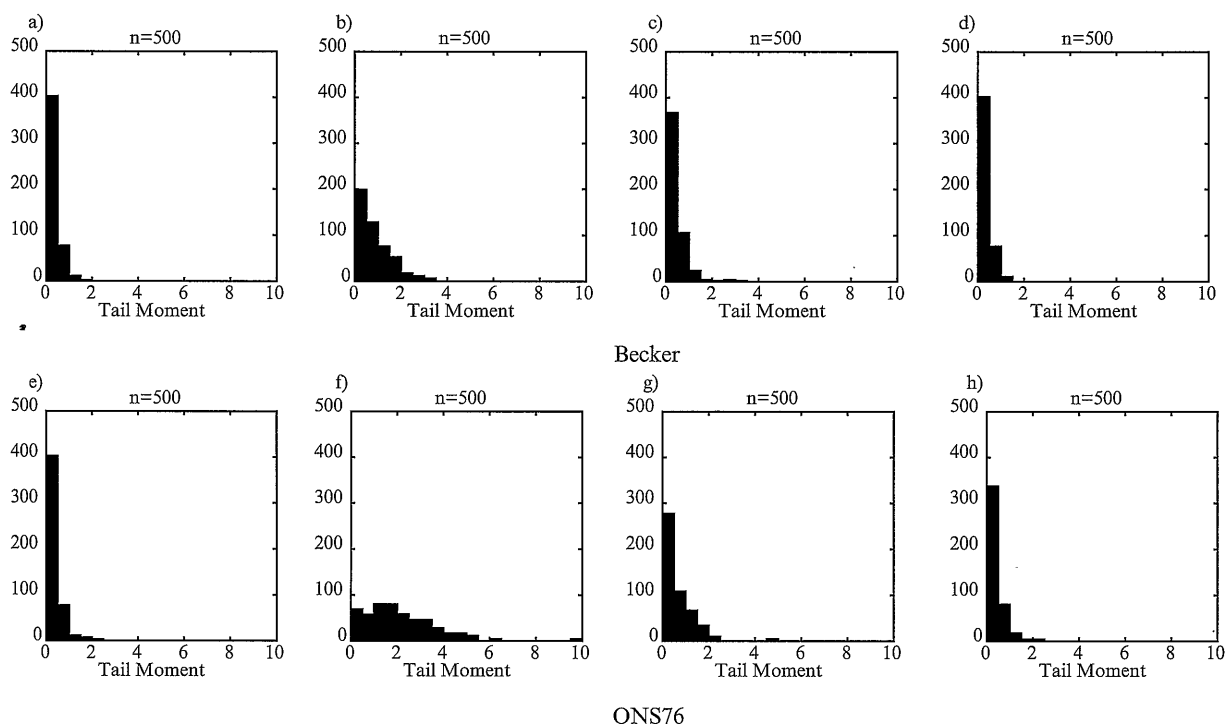


図5 Becker細胞と ONS76細胞の comet assay 法による DNA 損傷程度の度数分布の時間経過。
 Becker細胞：(a) 対照 (0Gy), (b) 12Gy 照射直後, (c) 30分後, (d) 150分後。
 ONS76細胞：(e) 対照 (0Gy), (f) 12Gy 照射直後, (g) 30分後, (h) 180分後。

なぜこのように結果が別れるのかは完全に説明することは出来ない。外的な因子としてサイトカラシン B の細胞毒性効果は否定できない。内的な細胞側の因子としてサイトカラシン B の薬理作用に対する反応性の違いによる影響、細胞の核 DNA 量の不均一さ、細胞の倍加時間ならびに細胞周期分布の違い等の要因が考えられ、これら内的外的因子が複雑に影響しているであろう^{9, 28, 29)}。またアポトーシスの影響も無視できない。照射後に分裂を経ずにアポトーシスを起こす細胞の割合が多ければ、再増殖能をエンドポイントとするコロニー形成法との結果は異なるのは当然と考えられる。

Comet assay 法

本研究において、comet assay 法を用いた損傷試験では、放射線感受性であった ONS76 が DNA 損傷を受けやすく、抵抗性の Becker が DNA 損傷を受けにくいという結果を得られ、コロニー形成法の結果とも合致した。DNA 損

傷の程度の違いが放射線感受性を反映することが示唆された。また時間経過を検討した DNA 修復試験でも、放射線抵抗性の Becker が高い修復能を示し、コロニー形成法の結果と合致していた。

腫瘍の放射線反応性を検討する目的で comet assay 法を用いる試みがなされている^{1, 24)}。Müller *et al.* は放射線感受性を検討した。異なる放射線感受性を示す腫瘍細胞での修復試験を行った結果、抵抗性の腫瘍細胞では非常に早い修復が観察された¹⁾。この結果は本研究の結果と同一である。もう一つの試みとして、Olive *et al.* は放射線感受性を低下させる原因である低酸素分画を定量しようとする試みで、損傷試験において DNA 損傷の程度が少ない群を低酸素細胞群として DNA 損傷の大きい群から分別して報告したものである²⁴⁾。これらの結果からも放射線感受性試験として本法の有用性は支持される。

放射線照射の際に核 DNA に dsb を来した細

胞や, DNA の点変異, cross-link 等の修復過程で misrepair が発生した細胞は, 次の細胞分裂期に容易に死に至るとされている^{1, 2, 7, 13}). Comet assay 法の修復試験では misrepair を正確に検出することは困難だが, 尾部の短縮が妨げられた細胞では DNA 損傷の残存が推測される. DNA 損傷が持続する場合には細胞生存にいくつかの不利益があるとされる⁵). すなわち損傷した DNA の遺伝子情報は正常な蛋白質合成に寄与しない. 本来修復可能な型の DNA 損傷部位が, その修復過程中 (DNA 合成や有糸分裂の際) に非可逆的な DNA 損傷に変化する, いわゆる損傷の固定現象が起きやすくなる. そのため DNA 修復の遅延・損傷の残存は, 放射線による細胞殺傷効果の程度に大きな影響を与える.

DNA 修復を経時的に検討すると fast repair 群と slow repair 群の二つのコンパートメントに分別される. X 線照射の際に生じる DNA 損傷の種類は, ssb がほとんどで, dsb は全損傷の約 5% とされている^{2, 5}). Fast repair 群にみられる修復は, その多くが修復可能な ssb であり, その後に続く slow repair 群は dsb, DNA-DNA crosslink, DNA-protein crosslink 等の修復の他に修復過程の際に生じた点変異等の misrepair を表していると考えられている.

Comet assay 法の重要な利点の一つに, 照射された個々の腫瘍細胞の DNA 損傷と修復を検出できることである. 図 5 に見られるように X 線に対する反応はそれぞれ細胞一個一個異なることにより解析が可能となるためであり, 前述したように, この不均一な反応から放射線抵抗性の画分の抽出が試みられている¹⁴).

臨床応用の見地から, comet assay 法は, 簡便で再現性が高いこと, 試験に用いる細胞数が少なくすむこと, 短時間で結果が得られること, 細胞 DNA に対する損傷試験と修復試験が同時に行えること等の大きな利点がある. 実験時間は修復時間の時間設定にもよるが, 標本準備から, 検鏡, コンピューター解析までを含め

て, ほぼ一日以内に終了する事ができる. 微小核形成法やコロニー形成法とは違って, primary culture を作成する必要が無いこと, さらに実験中に X 線照射等の刺激を与えた後に細胞分裂を経る必要がないことは重要な利点である. 特に微小核形成法のように, 細胞間の倍加時間の差やサイトカラシン B による影響, 非増殖性・増殖性細胞の細胞特性の違いなど, コロニー形成法との相関の乖離をもたらす要因を, comet assay 法では除去することができる. 使用する細胞量も comet assay 法は少量 (少なくとも約 10,000 個の細胞採取で試験可能) ですむ²⁰). これにより生検等で得られた腫瘍細胞を, X 線に対する DNA の損傷, 修復について comet assay 法で測定することにより, 放射線治療効果を予測する手段として用いる可能性が期待できる.

結 語

二種類の放射線感受性の異なるヒト脳腫瘍細胞を用いて放射線感受性試験として微小核形成法と comet assay 法の比較検討を行った. この結果, 放射線感受性試験として comet assay 法が優れているという結論が得られ, 今後の臨床応用での成果が期待される.

文 献

- 1) Müller WU, Bauch T, Streffer C, Niedereicholz F, Böcker, W. Comet assay studies of radiation-induced DNA damage and repair in various tumor cell lines. *Int J Radiat Biol* 1994;65:315-9.
- 2) Müller WU, Bauch T, Wojcik A, Streffer C. Comet assay studies indicate that caffeine-mediated increase in radiation risk of embryos is due to inhibition of DNA repair. *Mutagenesis* 1996; 11:57-60.
- 3) Shibamoto Y, Streffer C, Budach V. Tumor radiosensitivity prediction by the cytelinesis-block micronucleus test. *Radiat Res* 1991;128: 293-300.
- 4) 田中敬正編. 癌の放射線治療. 1 版. 京都: 金芳堂; 1998. p.170-7.

- 5) Hall EJ. 放射線科医のための放射線生物学. 浦野宗保訳. 第4版. 東京: 篠原出版; 1995. p.285-302.
- 6) Fenech M, Morley A. Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. *Cytobios* 1985;213:233-46.
- 7) Heddle JA, Hite M, Kirkhart B, Mavournin K, Macgregor JT, Newell GW, Salamone MF. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. *Mut Res* 1983;123:61-118.
- 8) Mariya Y, Streffer C, Fuhmann C, Wojcik A. Correlation of radiation-induced micronucleus frequency with clonogenic survival in cells of one diploid and two tetraploid murine tumor cell lines of the same origin. *Radiat Res* 1997;147:29-34.
- 9) Bush C, McMillan TJ. Micronucleus formation in human tumour cells: lack of correlation with radiosensitivity. *Br J Cancer* 1993;67:102-6.
- 10) Fenech M, Moreley A. Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effects of *in vivo* ageing and low dose irradiation. *Mut Res* 1986;161:193-8.
- 11) Stap J, Aten JA. Comparison of radiation sensitivity for three cells lines as measured by the cloning assay and the micronucleus test. *Strahlenthr Onkol* 1990;166:761-3.
- 12) Bakker PJM, Tukker LJ, Stap J, Veenhof CHN, Aten JA. Micronuclei expression in tumours as a test for radiation sensitivity. *Radiother Oncol* 1993;26:69-72.
- 13) Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damage in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1984;123:291-8.
- 14) Olive PL, Judit P, Banath JP, Durand RE. Heterogeneity in radiation-Induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the comet assay. *Radiat Res* 1990;122:86-94.
- 15) McKelvery-Martin VJ, Green MNL, Schmezer P, Pool-Zobel BL, DeMeo MP, Collins A. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review. *Mutat Res* 1993;288:47-63.
- 16) Wojcik A, Sauer K, Zülzer F, Bauch T, Müller WU. Analysis of DNA damage recovery processes in the adaptive response to ionizing radiation in human lymphocytes. *Mutagenesis* 1996;11:291-9.
- 17) Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res* 1995;339:37-59.
- 18) Rajeswari N, Ahuja YR, Mallini U, Chandrashekar S, Balakrishna N, Rao KV, Khal A. Risk assessment in first degree female relatives of breast cancer patients using the alkaline comet assay. *Cartinogenesis* 2000;21:557-61.
- 19) Müller WU, Bauch T, Streffer C, Niedereicholz F, Böcker W. Comet assay studies of radiation-induced DNA damage and repair in various tumour cell lines. *Int J Radiat Biol* 1994;65:315-9.
- 20) Alapettite C, Thirion P, Rochefordière A, Cosset JM, Moustacchi E. Analysis by alkaline comet assay of cancer patients with severe reactions to radiotherapy: defective rejoining of radioinduced DNA strand breaks in lymphocytes of breast cancer patients. *Int J Cancer* 1999;83:83-90.
- 21) Malyapa RS, Bi C, Eric W. Detection of DNA damage by the alkaline comet assay after exposure to low-dose gamma radiation. *Radiat Res* 1998;149:396-400.
- 22) Testard I, Sabatier L. Assessment of DNA damage induced by high-LET ions in human lymphocytes using the comet assay. *Mutat Res* 2000;448:105-15.
- 23) Sasaki YF, Ueno S, Miyamae Y, Ohta T, Tsuda S. Detection of organ specific genotoxicity by alkaline single cell gell electrophoresis assay with mouse multiple organs. *Mutagen Res* 1998;20:51-62.
- 24) Olive PL. Detection of hypoxia by measurement of DNA damage in individual cells from spheroids and murine tumors exposed to bioreductive drugs 1. *Br J Cancer* 1995;71:529-36.
- 25) Banáth JP, Fushiki M, Olive PL. Rejoining of DNA single- and double-strand breaks in human white blood cells exposed to ionizing radiation. *Int J Radit Biol* 1998;73:649-60.
- 26) Horvathova E, Slamennova D, Gabelova A. Use of single cell electrophoresis (comet assay) modifications for analysis of DNA damage. *Gen Physiol Biophys* 1999;18:70-4.
- 27) Streffer C, van Beuningen D, Gross E,

- Schabronath J, Eigler FW, Rebmann R. Predictive assays of for the therapy of rectum carcinoma. *Radiother Oncol* 1986;5:303-10.
- 28) Wandl EO, Ono K, Kain R, Herbsthofer T, Hienwrt G, Koebarth K. Linear correlation between surviving fraction and the micronucleus frequency. *Int J Radiat Biol* 1989;165:824-7.
- 29) Slavotinek A, McMillian TJ, Steel CM, Steel A. A comparison of micronucleus frequency and radiation survival in lymphoblastoid cell lines. *Mutagenesis* 1993;8:569-75.