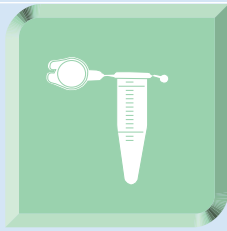
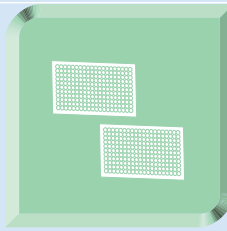
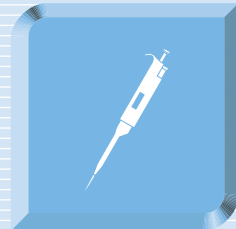
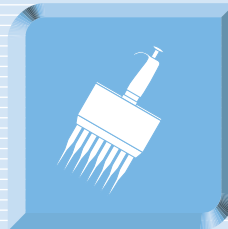
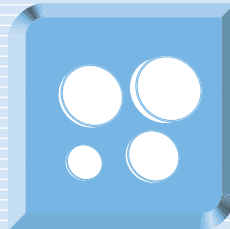
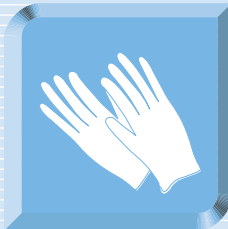
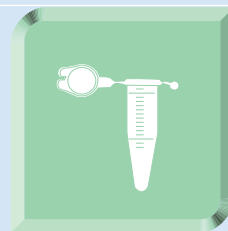
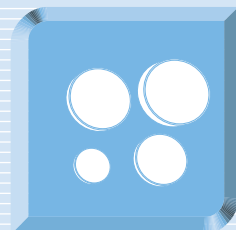
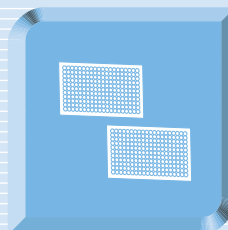
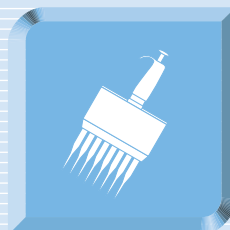
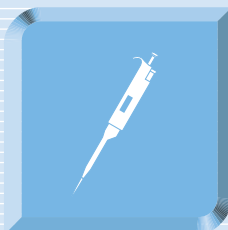
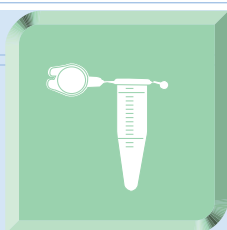
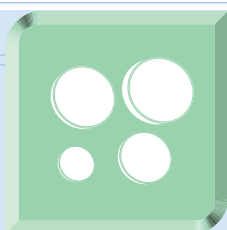
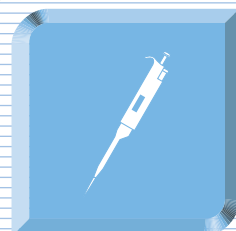
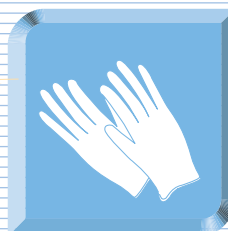
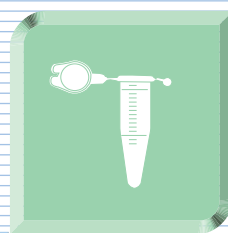
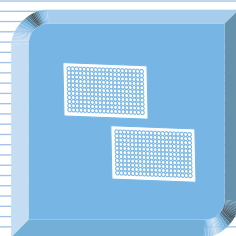


細胞増殖測定 細胞染色 プロトコル

簡単! 写真でわかる
第四版



目次

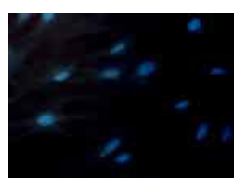
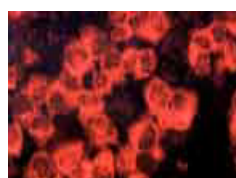
写真でわかる!

—細胞数の測定—

目的	検出方法	製品名	ページ
細胞増殖・毒性を測りたい		Cell Counting Kit -8	p. 3
	吸光度	Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST	p. 12
		MTT	p. 23
	蛍光	Cell Counting Kit -F	p. 30
測定方法の特徴			p. 37

—細胞の染色—

目的	染色対象	製品名	ページ
対象毎に細胞を染めたい	生細胞	-Cellstain- Calcein-AM -Cellstain- CFSE -Cellstain- FDA BCECF-AM special packaging	p. 39
	死細胞	-Cellstain- DAPI -Cellstain- PI	
	核	-Cellstain- AO solution -Cellstain- Hoechst 33258 solution -Cellstain- Hoechst 33342 solution	
	ミトコンドリア	-Cellstain- MitoRed -Cellstain- Rh123	
生細胞と死細胞を染め分けたい	生細胞 死細胞	-Cellstain- Double Staining Kit	p. 48



細胞増殖・毒性を測りたい

はじめに

細胞数の測定方法には、コロニー形成法、クリスタルバイオレット法、 $[^3\text{H}]$ チミジン取り込み法、MTT 法および WST 法などが利用されている。

コロニー形成法は、細胞の増殖能力を指標として顕微鏡によりコロニー数を計測する手法である。また、 $[^3\text{H}]$ チミジン取り込み法は、放射性同位元素 (RI) で標識したチミジンを細胞中の DNA に取り込ませて、RI 標識のチミジン量をシンチレーションカウンター等で定量する手法である。一方、MTT 法や WST 法は、還元発色試薬と生細胞中の脱水素酵素活性を利用して、吸光度測定により細胞数を計測する方法である。これらは、測定の手軽さ、安全性、再現性などの点において、前者に比べ優れた測定方法であり、細胞増殖試験や薬剤感受性試験など幅広く利用されている。そのため、これから実験を始めようとする方にも、お勧めの測定方法である。その他、発色試薬よりも高感度な測定ができる蛍光試薬を用いた方法もある。以下に、発色および蛍光試薬を用いた各測定方法の特徴を紹介する。

製品の特徴

製品名	Cell Counting Kit-8	Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST	MTT	Cell Counting Kit-F
検出方法	吸光度	吸光度	吸光度	蛍光
色素特長				
色素名	WST-8	WST	MTT	Calcein-AM
発色後の水溶性	易溶	易溶	不溶	—
測定原理	細胞全体の酵素活性	遊離LDH活性	ミトコンドリアの酵素活性	細胞内エステラーゼ活性
製品特長				
メリット	- 細胞毒性が低い - ホルマザンの溶解操作が不要 - 試薬安定性が高い - 高感度である - 試薬混合の手間がかからない	- 細胞死を直接測定できる - 細胞障害性試験に適用できる - 試薬の安定性が高い - 放射性同位体($\text{Cr}51$)は使用しない	- 低コストである - ミトコンドリアの酵素活性を測定する	吸光度より高感度に検出できる
デメリット	フェノールレッドと測定波長が近い場合ブランク値が上昇する	- 放射性同位体($\text{Cr}51$)より感度は劣る - 血清培地の影響を受ける場合がある	- 有機溶媒による生成ホルマザンの溶解が必要 - 試薬調製の手間がかかる	培地交換が必要
製品形態	溶液	溶液+凍結乾燥品	粉末	溶液
記載ページ	3	12	23	30

操作が最も簡単!

感度が高い!

Cell Counting Kit-8を用いる測定

はじめに

Cell Counting Kit-8 は、吸光度法による細胞数測定用キットで、細胞増殖試験や薬剤感受性試験等に利用することができる。水溶性のホルマザンを生成するテトラゾリウム塩、WST-8 を使用しているため、MTT のようにホルマザンを溶解する操作が不要である。

「検体への試薬添加」、「発色反応」、「吸光度測定」の3ステップで結果が得られる。マイクロプレートを用いた High-Throughput Screening にも適用できる。また、WST は細胞透過性が極めて低く細胞に対する毒性も低いため、Cell Counting Kit-8 で評価した後、その細胞を他の試験に使用することも可能である。

以下に、96 穴マイクロプレートを用いた Cell Counting Kit-8 の細胞数測定法ならびに薬剤感受性試験法について紹介する。

- 【用途】
- ・細胞数測定
 - ・細胞増殖試験
 - ・細胞毒性試験
 - ・薬剤感受性試験

準備するもの

装置・器具

- ・マイクロプレートリーダー
吸光度測定用フィルター Cell Counting Kit-8 : 450 ~ 490 nm
- ・96 ウェルマイクロプレート（細胞培養用）
- ・マルチピペット（8 または 12 チャンネル：10 ~ 100 μ l 対応）
- ・炭酸ガスインキュベーター
- ・クリーンベンチ
- ・血球計算盤またはセルカウンター

試薬

- ・Cell Counting Kit -8 [同仁品コード：CK04]
- ・細胞培養用培地

調製

Cell Counting Kit-8

溶液調製は不要。

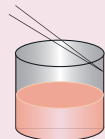
操作が簡単！

4℃保存，12 ヶ月間安定

- ⚠ 長期保存する場合は、測定に必要な量を分注して -20℃で保存する。
- ⚠ 凍結融解は、繰り返さないようにする。

測定条件の設定

Cell Counting Kit-8 を用いて細胞増殖試験や細胞毒性試験等を行う際は、得られる吸光度と生細胞数が比例関係である必要がある。そこで、あらかじめ細胞数を計測し、測定する細胞数や発色反応時間の目安をつけることが望ましい。以下に、Cell Counting Kit-8 を用いた測定条件の設定について紹介する。

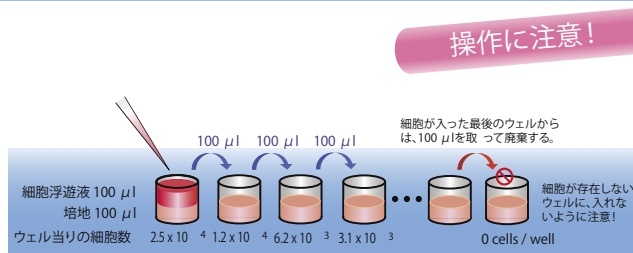
操作	注意点・コツ
- 測定対象の細胞を培養用フラスコから回収する。 - 細胞を計測して、濃度を決定した細胞懸濁液を調製する。 (細胞濃度 : cells /ml) 96 ウェルマイクロプレートの各ウェルに、段階希釈法により細胞懸濁液を 100 μl ずつ入れる。バックグラウンド測定用のウェルには、培地のみ入れる。	- 付着性細胞の場合、トリプシン処理やセルスクレイパー等により回収する。 - 血球計算盤またはセルカウンターなどを用いて計測する。 - 段階希釈法により細胞懸濁液を調製すると簡便である。 (次ページ「実験例」を参照)
炭酸ガスインキュベーターで、24 ～ 48 時間前培養する。 (開始時間 : ～終了時間 :)	培養後、ウェル当りの細胞数は、計測時の細胞数を上回っていることに注意する。細胞数と吸光度の関係を得る場合、細胞が増殖しない時間内に試薬を添加し、吸光度を測定する。
96 ウェルマイクロプレートの各ウェルに、Cell Counting Kit-8 溶液を 10 μl ずつ加える。	96 ウェル以外のプレートやシャーレを用いる場合、培地量の 1/10 量の試薬を加える。 - 試薬の添加量が少ないため、ウェルの側壁にチップの先を当てて加えると良い (下図)。試薬がウェルの側壁に付着した場合、プレートを軽く叩いて培地と混合させる。 - 気泡は、測定値のバラツキの原因となるため、気泡を生じないようにする。
炭酸ガスインキュベーターで、1 ～ 4 時間反応させる。 (開始時間 : ～終了時間 :)	
マイクロプレートリーダーで、吸光度を測定する。 測定用フィルター Cell Counting Kit-8 : 450 ～ 490 nm	Check ! 細胞種により生成するホルマザンの量が異なるため、試薬添加後の発色時間が同じでも吸光度は異なる (次ページの HeLa 細胞と HL60 細胞の図を参照)。

実験例

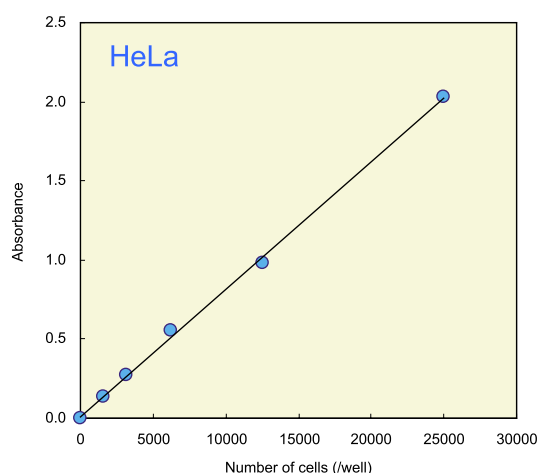
HeLa 細胞（ヒト子宮頸癌細胞）および HL60 細胞（前骨髄球性白血病細胞）の浮遊液を、下図の要領で 96 穴マイクロプレートの各ウェルに 2.5×10^4 , 1.25×10^4 , 6.2×10^3 , $\dots$ 0 cells/well となるように段階的に希釈、分注した。前述の操作方法に従い、Cell Counting Kit-8 を用い、細胞数を測定した。

《段階希釈の方法》

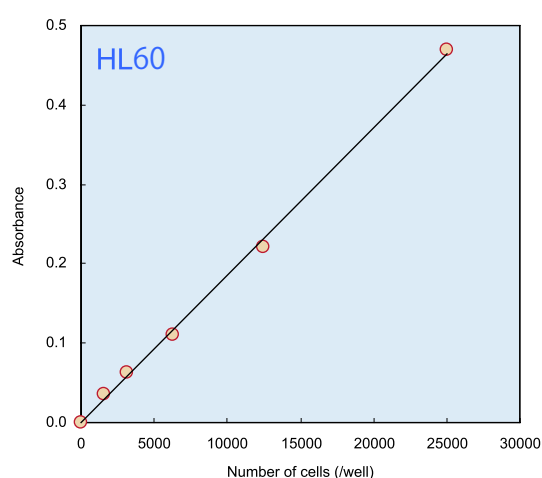
8 チャンネルマルチピペットを用いて、96 ウェルマイクロプレートの各ウェルに培地 100 μ l を入れて、次に、 5×10^5 cells/ml に調製した細胞懸濁液 100 μ l を細胞数が最大となるウェルに加えてピペッティングする。その後、細胞濃度が半分となった浮遊液 100 μ l を次のウェルに移して、同様にピペッティングにて混合する。以降、この操作を繰り返す。



細胞数が同じ場合でも、HeLa 細胞（下左図）と HL60 細胞（下右図）との間で吸光度の値に違いがある。そのため、予備実験を実施して、細胞種毎に最適な細胞濃度（各ウェルに加える細胞数）や発色時間を設定することが望ましい。また、薬剤を用いた試験を行う際には、薬剤の性質（細胞増殖を促進するか、毒性のあるものか、還元性がないか）や暴露時間なども、予め考慮して設定することを勧める。



培地: DMEM (10% FBS)
発色反応: 37°C, 3 hr,
5% CO₂ インキュベーター内
測定波長: 450 nm

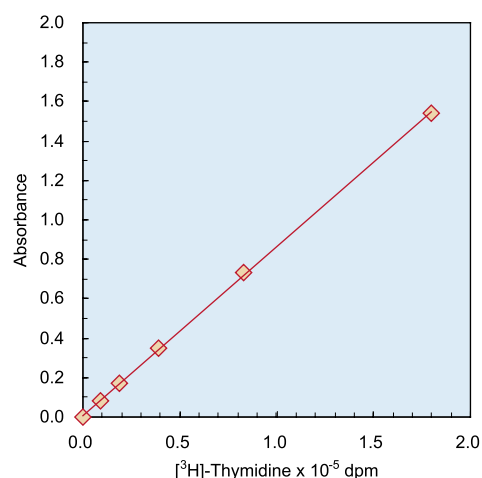


培地: RPMI1640 (10% FBS)
発色反応: 37°C, 3.5 hr,
5% CO₂ インキュベーター内
測定波長: 450 nm

* 参考 *

Cell Counting Kit-8 と [³H]-チミジン 取込み法との相関性

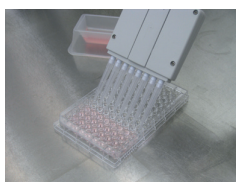
HeLa 細胞の浮遊液を段階的に希釈したものを測定試料とした。Cell Counting Kit-8 と [³H]-チミジン 取込み法との間には、良好な相関性が得られた。



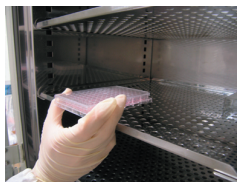
細胞増殖・毒性試験法

操作

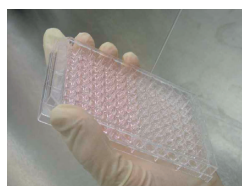
- 測定対象の細胞を培養用フラスコから回収する。
- 細胞を計測して、濃度を決定した細胞懸濁液を調製する。
(細胞濃度: cells /ml)
- 96 ウェルマイクロプレートの各ウェルに、細胞懸濁液を 100 μ l ずつ入れる。バックグラウンド測定用のウェルには、培地のみ入れる。



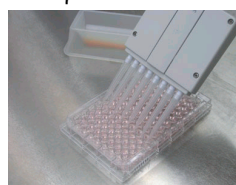
- 炭酸ガスインキュベーターで、24 ～ 48 時間前培養する。
(開始時間 : ～終了時間 :)



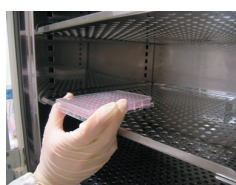
- 必要に応じて培地交換を行う。
細胞を除かないように培地を除去した後、新しい培地を 100 μ l ずつ入れる。バックグラウンド測定用のウェルには、培地のみ入れる。



- 培地を用いて任意の濃度に調製した被験物質液を 10 μ l ずつ加える。



- 炭酸ガスインキュベーターで、一定時間 (6, 12, 24, 48 時間) 培養する。
(開始時間 : ～終了時間 :)

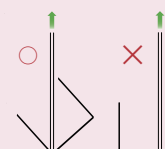


注意点・コツ

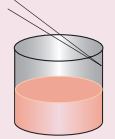
- 付着性細胞の場合、トリプシン処理やセルスクレイパー等により回収する。
- 血球計算盤、セルカウンターなどを用いて計測する。
- 浮遊細胞の場合、V 底プレートを使用してもよい。

Check !

- 細胞数が多すぎる場合、マイクロプレートリーダーの測定上限を超えてしまうことがある。被験物質 (薬剤) の性質 (細胞増殖を促進するか抑制するか)、発色時間、細胞種等は重要な要因であるため、予備実験を実施して最適な細胞濃度 (各ウェルに加える細胞数) を設定する。
- 細胞培養開始から測定まで、48 時間以上培養する際は、培地交換を行う。
- 培地除去の際は、細胞にパスツールピペットやチップの先端が接触しないように、下図のようにプレートを傾けると良い。



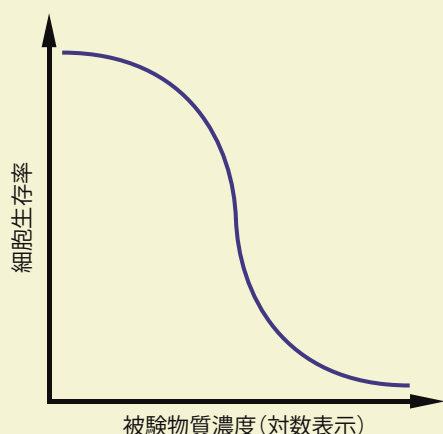
- 浮遊細胞の場合、V 底プレートを遠心して細胞を沈殿させた後、培地を除去する。
- バックグラウンド測定用のウェル (細胞を入れていないウェル) にも同量の被験物質 (薬剤) を加える。一方、陰性対照のウェルには、被験物質を含まない培地 10 μ l を加える。
- 被験物質の溶解には、培地の他に、PBS 等の生理食塩水溶液も使用することができる。
- 被験物質への暴露時間は、任意に設定する。

操作	注意点・コツ
96 ウェルマイクロプレートの各ウェルに、Cell Counting Kit-8 溶液を 10 μl ずつ加える。	96 ウェル以外のプレートやシャーレを用いる場合、培地量の 1/10 量の試薬を加える。 - 試薬の添加量が少ないため、ウェルの側壁にチップの先を当てて加えると良い(下図)。試薬がウェルの側壁に付着した場合、プレートを軽く叩いて培地と混合させる。 - 気泡は、測定値のバラツキの原因となるため、気泡を生じないようにする。
炭酸ガスインキュベーターで、1～4 時間反応させる。 (開始時間 : ~ 終了時間 :)	
マイクロプレートリーダーで、450 nm の吸光度を測定する。	浮遊細胞の場合、V 底プレートの溶液を別途用意した平底プレートにマルチピペットを用いて移した後、測定する。

細胞生存率の算出

各ウェルの吸光度の値を下記の式に代入して、細胞生存率を算出する。

$$\text{細胞生存率 (\%)} = \frac{(A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}})}{(A_{\text{control}} - A_{\text{blank}})} \times 100$$



n = 5 の場合					検体の吸光度 A sample
					A sample 1
					A sample 2
					A sample 3
					A sample 4
					A sample 5
					A sample n
細胞 + 被験物質 + Cell Counting Kit-8 試薬溶液					陰性対照 吸光度 A control
細胞 + Cell Counting Kit-8 試薬溶液					ブランク 吸光度 A blank
Cell Counting Kit-8 試薬溶液					

ブレイク!

Cell Counting Kit-8 は、還元性物質が苦手?

細胞毒性試験では、「被験物質を加えた細胞を顕微鏡観察すると死んでいるのに発色する!？」ということがある。この場合、被検物質が還元性を示す物質で、WST-8 を還元している可能性がある。そこで、試験を行う前に、細胞が無い状態で培地と被検物質と Cell Counting Kit-8 溶液を混合して発色を確認してみると良い。発色する場合には毒性試験の際、Cell Counting Kit-8 溶液を加える前に、細胞を培地や PBS(-) で洗浄して、被検物質を除去すると良い。洗浄工程が入るため、ウェル間のバラつきを抑えるよう慎重な操作を心がける。

トラブルシューティング

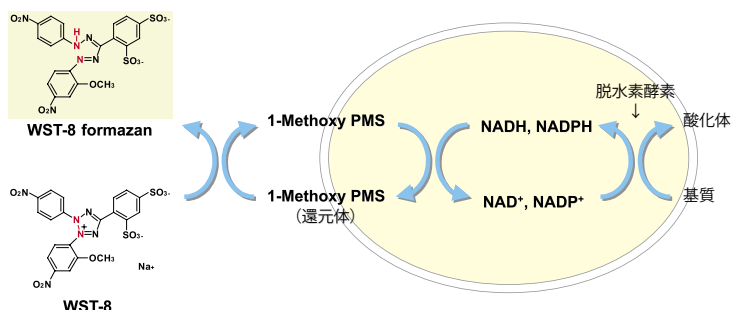
トラブル	考えられる原因	解決方法
吸光度が高く、機器の測定上限を超えてしまう。	ウェル当りの細胞数が多い。	細胞種毎に細胞数と吸光度の関係を測定する（「測定条件の設定」の項に従ってください）。前培養の時間が長くなり細胞が分裂を起こすと、ウェル当りの細胞数は初めに調製した数よりも増加するため注意が必要です。
細胞毒性試験において、細胞はダメージを受けているにもかかわらず、発色が起こってしまう。	被験物質（薬剤）が WST を還元している。	Cell Counting Kit-8 溶液と被験物質のみを混合して、発色するか確認する。発色が起こる場合は、次のいずれかの方法により測定します。 1) Cell Counting Kit-8 溶液を加える前に、培地を用いて洗浄し、被験物質を除去する。 2) 被験物質の還元性に影響を受けない Cell Counting Kit-F(p. 30) を用いる。
測定値にバラツキが多い。	培地の水分蒸発により試薬濃度が変化している。	一番外側のウェルは、水分蒸発が起こりやすいため、測定には利用せず、培地のみを入れる。
	Cell Counting Kit-8 溶液が培地と混合していない。	プレートの側面を指で軽く叩き、ウェルの内壁に付着している Cell Counting Kit-8 溶液を培地中に落とす。プレートを叩く際は、ウェル中の培地が飛び出さない程度にする。
	培地の表面に気泡がある。	シリンジや注射針などの先端で、気泡を除去する。
発色反応を停止させる際、塩酸を加えても反応が停止せず、吸光度が増加してしまう。	培地の緩衝能により pH が低下せず、細胞が生存している。	加える塩酸の濃度を高くする。または、1% SDS 溶液などの界面活性剤を用いて発色反応を停止する。(p. 10 Q&A 参照)

Q & A

試薬に関する質問

Q : Cell Counting Kit-8 の発色メカニズムを教えてください。

A : WST-8 が電子メディエーター存在下、細胞中の脱水素酵素により還元され、橙色の生成物（ホルマザン）を生じます。細胞内脱水素酵素活性に応じて産出される NADH, NADPH は、1-Methoxy PMS を介して WST-8 をホルマザンに還元します。このホルマザンの色素の量は、生細胞数に比例します。



Q : WST-8 や 1-Methoxy PMS は、細胞膜を透過して細胞内まで浸透しますか？

A : WST-8 は細胞膜を透過しません。細胞は染まらず、細胞外液だけが着色します。
1-Methoxy PMS に関しては、細胞膜近傍で働いていると考えられていますが、中まで透過しているのか、細胞外のみが存在しているかの具体的機構は分かっておりません。

Q : Cell Counting Kit-8 は MTT と比較して、どの程度毒性が低いのですか？

A : Cell Counting Kit-8 の場合、試薬添加後 24 時間経過しても細胞生存率 90% 以上であるのに対して、MTT の場合、細胞生存率 0% です。そのため、Cell Counting Kit-8 での評価後、その細胞を他の試験に使用することも可能です。ただし、細胞表面などに色素が残らないよう十分洗浄を行ってから、使用してください。

細胞培養に関する質問

Q : Cell Counting Kit-8 の測定対象となる細胞は何ですか？

A : 対数増殖期にある動物細胞が対象です。

Q : 対数増殖期に入るための前培養はどのくらいの期間行えばよいですか？

A : 細胞により異なりますが、12 時間から 48 時間程度行ってください。

Q : Cell Counting Kit-8 は、浮遊細胞・付着細胞ともに使用できますか？

A : 両方とも使用できます。ただし、付着細胞に比べ、浮遊細胞は発色が弱い傾向にあるため、呈色時間を長くしたり、細胞数を増やすといった検討が必要となります。

Q : Cell Counting Kit-8 を用いる場合、どの位の細胞数が適当でしょうか？

A : ウェル当りの細胞数および発色時間が同じ場合でも、細胞種によって吸光度は異なります。96 ウェルマイクロプレートを使用する場合、1000 ~ 10000 cells/well を目安に細胞数と吸光度の関係を確認してください。

Q : 前培養は、必ず行わなければならないのですか？

A : 付着細胞では前培養を推奨しております。トリプシン処理等により培養用フラスコから回収する際に、細胞はダメージを受けます。そのため、対数増殖期の状態にするために細胞の前培養が必要になります。浮遊細胞の場合は、省略しても構いません。

Q : 浮遊細胞でV底プレートを使用するのはなぜですか？

A : 浮遊細胞では遠心して底部に細胞を集約させたり、測定上清を回収するためです。
測定では平底プレートを使用してください。

測定時に関する質問

Q：24 well や 12 well のプレートで測定を行うことができますか？ その場合には試薬の添加量はどのようにすれば良いですか？

A：96 well プレート以外でも測定できます。試薬の添加量は使用培地の 10 分の 1 を目安にして下さい。（培地が 1 ml であれば試薬を 100 μ l など）

Q：発色反応を途中で止めたいのですが、どうすればいいのでしょうか？

A：下記の方法があります。いずれかの方法を行なって下さい（添加量は 96 well の場合）。

① 1 w/v% SDS を 10 μ l 添加する。

注）添加する場合には、泡立たないようにしてください。液面の気泡は測定値がばらつく原因となります。

② 0.1 mol/l 塩酸などの酸を (10 μ l) 添加する。

注）反応停止後は、24 時間以内に測定して下さい。

※緩衝能の高い培地をご使用の場合には、より濃度の高い塩酸を添加してください。また、アルカリ溶液による反応停止は、生成したホルマジン色素が青色に変色してしまうため、定量性が失われます。

Q：発色時間は、何時間がよいのか教えてください。

A：通常、1～4 時間としています。しかし、ウェル当りの細胞数および発色時間が同じ場合でも、細胞種によって吸光度は異なります。発色時間は、細胞数と吸光度が比例関係となるような条件に設定してください。

Q：Cell Counting Kit-8 の発色に影響を与えるような物質はありますか？

A：還元性を示す物質が共存する場合、WST-8 と反応して誤発色を生じることがあります。

また、フェノールレッドは測定波長付近に吸収があるため、フェノールレッド不含の培地に比べて 5% 程度のブランク値の上昇は見られますが、使用上は問題ありません。

Q：ブランクを測定する場合、どのような条件で行えばよいのでしょうか？

A：状況に応じて、以下の吸光度を測定してください。

○細胞を含む培地に濁りがある場合

「細胞」と「培地」を入れたウェルの吸光度（600 nm 以上）を測定してください。

得られたブランク測定値を各サンプルの測定値から差し引いてください。

* 濁りが存在すると、光の散乱が生じて測定誤差の原因となります。

還元された WST-8 の吸収が存在しない 600 nm 以上の吸光度を測定してください。

ただし、濁りが無い、又は殆ど無視できる程度の濁りであれば、測定する必要はありません。

○細胞や被験物質を含む培地に発色後の WST-8 と同じ波長域の吸収がある場合

「細胞」と「培地」および「被験物質（状況に応じて）」を入れたウェルの吸光度（450 nm）を測定してください。

得られたブランク測定値を各サンプルの測定値から差し引いてください。

* 培地の色が黄～赤褐色となる場合は、測定波長域が重なる可能性があります。上記の方法に従って、Cell Counting Kit-8 溶液を含まないウェルの吸光度を測定してください。

○培地中の成分に Cell Counting Kit-8 溶液と反応する物質が存在する場合

「培地」と「Cell Counting Kit-8 溶液」を入れたウェルの吸光度（450 nm）を測定してください。

得られたブランク測定値を各サンプルの測定値から差し引いてください。

* 細胞を含まないウェルの吸光度を測定してください。培地中に還元性を示す物質が含まれると、WST-8 が発色します。

吸光度が高く無視できない場合、培地中の還元物質を除くか、原因成分を含まない培地の使用を検討してください。

○被験物質が Cell Counting Kit-8 溶液と反応する場合

「培地（被験物質を含む）」と「Cell Counting Kit-8 溶液」を入れたウェルの吸光度（450 nm）を測定してください。

得られたブランク測定値を各サンプルの測定値から差し引いてください。

* 細胞を含まないウェルの吸光度を測定してください。被験物質が還元性を示す場合、WST-8 が発色します。吸光度が高く無視できない場合、Cell Counting Kit-8 溶液を加える前に、培地による細胞洗浄を行い、被験物質を除去してください。

Cell Counting Kit-8 報告論文

Cell Line	Description	Reference
293T	human kidney carcinoma	H. Fuda, <i>et al.</i> , <i>J. Lipid Res.</i> , 2007 , 48, 1343.
3T3-L1	mouse embryonic fibroblast	D. Huang, <i>et al.</i> , <i>FASEB J.</i> , 2005 , 19, 2014.
A431	human epithelial carcinoma cell	H. Ohori, <i>et al.</i> , <i>Mol. Cancer Ther.</i> , 2006 , 5, 2563.
A549	human lung cancer cell	C. A. Reilly, <i>et al.</i> , <i>Toxicol. Sci.</i> , 2003 , 73, 170.; T. Kitamuro, <i>et al.</i> , <i>J. Biol. Chem.</i> , 2003 , 278, 9125. J. Stankova, <i>et al.</i> , <i>Clin. Cancer Res.</i> , 2005 , 11, 2047.; I. Imoto, <i>et al.</i> , <i>Cancer Res.</i> , 2006 , 66, 4617.; S. Semba, <i>et al.</i> , <i>J. Biol. Chem.</i> , 2006 , 281, 28244.
Alexander cell	pancreatic cancer cell	S. Awale, <i>et al.</i> , <i>Cancer Res.</i> , 2006 , 66, 1751.
AMO1	multiple myeloma	J. Inoue, <i>et al.</i> , <i>Am. J. Pathol.</i> , 2004 , 165, 71.
AR42J	pancreatic tumor cell	C. Bose, <i>et al.</i> , <i>Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.</i> , 2005 , 289, G926.
ARO	human anaplastic thyroid carcinoma	F. Furuya, <i>et al.</i> , <i>Endocrinology</i> , 2004 , 145, 2865.
AsPC-1	pancreatic cancer cell	T. Mori, <i>et al.</i> , <i>Mol. Cancer Ther.</i> , 2004 , 3, 29.; S. Awale, <i>et al.</i> , <i>Cancer Res.</i> , 2006 , 66, 1751.
B16F1	murine malignant melanoma	S. Shibata, <i>et al.</i> , <i>J. Immunol.</i> , 2006 , 177, 3564.
BBMVEC	bovine brain microvascular endothelial	T. Kitamuro, <i>et al.</i> , <i>J. Biol. Chem.</i> , 2003 , 278, 9125.
BEAS-2B	human bronchial epithelial cell	C. A. Reilly, <i>et al.</i> , <i>Toxicol. Sci.</i> , 2003 , 73, 170.; M. E. Johansen, <i>et al.</i> , <i>Toxicol. Sci.</i> , 2006 , 89, 278.
BMMSC	bone marrow mesenchymal stem cell	M. Miura, <i>et al.</i> , <i>Stem Cells</i> , 2006 , 24, 1095.
C33A	human cervical carcinoma	W. Yang, <i>et al.</i> , <i>Mol. Cancer Ther.</i> , 2006 , 5, 1610.
CHO	chinese hamster ovary cell	A. Kunita, <i>et al.</i> , <i>Am. J. Pathol.</i> , 2007 , 170, 1337.; S. Yokoe, <i>et al.</i> , <i>Cancer Res.</i> , 2007 , 67, 1935.
cortical neurons, primary	mouse	M. Ikonen, <i>et al.</i> , <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> , 2003 , 100, 13042.
COS7	African green monkey kidney cell	T. Kitamuro, <i>et al.</i> , <i>J. Biol. Chem.</i> , 2003 , 278, 9125.; H. Bando, <i>et al.</i> , <i>Clin. Cancer Res.</i> , 2005 , 11, 5784.
CV-1	African green monkey kidney cell	J. Peloponese, <i>et al.</i> , <i>J. Biol. Chem.</i> , 2006 , 281, 8927.
Daoy	human medulloblastoma	X. Li, <i>et al.</i> , <i>Mol. Cancer Ther.</i> , 2005 , 4, 1912.; S. Kim, <i>et al.</i> , <i>Clin. Cancer Res.</i> , 2006 , 12, 5550.
Daudi	human burkitt lymphoma	M. Ho, <i>et al.</i> , <i>J. Biol. Chem.</i> , 2005 , 280, 607.
DLD-1	human colorectal adenocarcinoma	H. Ohori, <i>et al.</i> , <i>Mol. Cancer Ther.</i> , 2006 , 5, 2563.
DT40	chicken B-lymphocyte cell	F. Shinozaki, <i>et al.</i> , <i>J. Biol. Chem.</i> , 2006 , 281, 16361.
DU145	human prostate carcinoma	P. Davis-Searles, <i>et al.</i> , <i>Cancer Res.</i> , 2005 , 65, 4448.; D. J. Son, <i>et al.</i> , <i>Mol. Cancer Ther.</i> , 2007 , 6, 675.
G361	human melanoma cell	H. Ohori, <i>et al.</i> , <i>Mol. Cancer Ther.</i> , 2006 , 5, 2563.
GCIY	human gastric carcinoma	H. Ohori, <i>et al.</i> , <i>Mol. Cancer Ther.</i> , 2006 , 5, 2563.
H441	human pulmonary adenocarcinoma	H. Shimura, <i>et al.</i> , <i>Cancer res.</i> , 2001 , 61, 3640.
HCC1937	human breast cancer cell	D. Iliopoulos, <i>et al.</i> , <i>Clin. Cancer Res.</i> , 2007 , 13, 268.
HEK293	human embryonic kidney cell	S. Semba, <i>et al.</i> , <i>J. Biol. Chem.</i> , 2006 , 281, 28244.
HeLa	human cervical carcinoma	H. Shimura, <i>et al.</i> , <i>Cancer res.</i> , 2001 , 61, 3640.; C. Shi, <i>et al.</i> , <i>J. Biol. Chem.</i> , 2004 , 279, 17224.
Hep3B	human hepatocellular carcinoma	J. K. Sicklick, <i>et al.</i> , <i>Carcinogenesis</i> , 2006 , 27, 748.
HepG2	Human hepatocellular liver carcinoma	C. A. Reilly, <i>et al.</i> , <i>Toxicol. Sci.</i> , 2003 , 73, 170.; T. Ohuchida, <i>et al.</i> , <i>Cancer</i> , 2004 , 100, 2430.; T. Shiokawa, <i>et al.</i> , <i>Clin. Cancer Res.</i> , 2005 , 11, 2018.; H. Ohori, <i>et al.</i> , <i>Mol. Cancer Ther.</i> , 2006 , 5, 2563.
Hippocampal neuron, primary	from Wistar rat embryos	K. Kurata, <i>et al.</i> , <i>J. Pharmacol. Exp. Ther.</i> , 2004 , 311, 237.
hMSC	human mesenchymal stem cell	D. Huang, <i>et al.</i> , <i>FASEB J.</i> , 2005 , 19, 2014.; L. Song, <i>et al.</i> , <i>Stem Cells</i> , 2006 , 24, 1707.
ILT-Hod	T-cell	T. Kasai, <i>et al.</i> , <i>J. Biol. Chem.</i> , 2002 , 277, 5187.
Jurkat	human T cell	T. Kasai, <i>et al.</i> , <i>J. Biol. Chem.</i> , 2002 , 277, 5187.; L. Lu, <i>et al.</i> , <i>J. Biochem.</i> , 2007 , 141, 157.
Kasumi-1	acute myeloid leukemia cell	G. Zhou, <i>et al.</i> , <i>Blood</i> , 2007 , 109, 3441.
KMS-11	multiple myeloma	J. Inoue, <i>et al.</i> , <i>Am. J. Pathol.</i> , 2004 , 165, 71.
KYSE	esophageal squamous cell carcinoma	I. Imoto, <i>et al.</i> , <i>Cancer Res.</i> , 2001 , 61, 6629.; K. Nakakuki, <i>et al.</i> , <i>Carcinogenesis</i> , 2002 , 23, 19.
L929	mouse fibroblast	Y. Morita, <i>et al.</i> , <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> , 2000 , 97, 5405.
LK87	human lung adenocarcinoma	H. Ohori, <i>et al.</i> , <i>Mol. Cancer Ther.</i> , 2006 , 5, 2563.
LNCaP	human prostate carcinoma	D. J. Son, <i>et al.</i> , <i>Mol. Cancer Ther.</i> , 2007 , 6, 675.
Macrophage	mouse	Y. Miyake, <i>et al.</i> , <i>J. Immunol.</i> , 2007 , 178, 5001.
MDCK	canine kidney epithelial cell	H. Shimura, <i>et al.</i> , <i>Cancer res.</i> , 2001 , 61, 3640.
MiaPaCa-2	pancreatic cancer cell	A. Aghdassi, <i>et al.</i> , <i>Cancer Res.</i> , 2007 , 67, 616.
MT4	T-cell	T. Kasai, <i>et al.</i> , <i>J. Biol. Chem.</i> , 2002 , 277, 5187.; K. V. Kibler, <i>et al.</i> , <i>J. Biol. Chem.</i> , 2004 , 279, 49055.
NIH3T3	mouse fibroblast	R. Yu, <i>et al.</i> , <i>Toxicol. Sci.</i> , 2006 , 93, 82.
NT2N	human embryonal carcinoma	J. Tessier, <i>et al.</i> , <i>Infect. Immun.</i> , 2007 , 75, 1895.
PANC-1	pancreatic cancer cell	T. Mori, <i>et al.</i> , <i>Mol. Cancer Ther.</i> , 2004 , 3, 29.; S. Awale, <i>et al.</i> , <i>Cancer Res.</i> , 2006 , 66, 1751.; A. Aghdassi, <i>et al.</i> , <i>Cancer Res.</i> , 2007 , 67, 616.
PC6	human lung small-cell carcinoma	M. Spencer, <i>et al.</i> , <i>J. Biol. Chem.</i> , 2002 , 277, 20160.
PCN	primary cortical neuron	T. Chiba, <i>et al.</i> , <i>J. Neurosci.</i> , 2005 , 25, 10252.
PSN-1	pancreatic cancer cell	S. Awale, <i>et al.</i> , <i>Cancer Res.</i> , 2006 , 66, 1751.
RAW 264	mouse macrophage	M. Shiga, <i>et al.</i> , <i>Anesth. Analg.</i> , 2001 , 92, 128.
RP9	B lymphoblastoid cell	R. A. Dalloul, <i>et al.</i> , <i>Poult. Sci.</i> , 2006 , 85, 446.
SH10TC	human gastric cancer cell	H. Ohori, <i>et al.</i> , <i>Mol. Cancer Ther.</i> , 2006 , 5, 2563.
SH-SY5Y	human neuroblastoma	T. Nakagawa, <i>et al.</i> , <i>Mol. Cell. Biol.</i> , 2002 , 22, 2575.
SK-N-SH	human neuroblastoma	Y. Wang, <i>et al.</i> , <i>J. Virol.</i> , 2004 , 78, 7916.

Cell Counting Kit-8(メーカーコード：CK04) は細胞毒性試験や薬剤感受性試験などに数多く使用されております。上記に使用細胞種の一例を報告論文とともに示します。今後ともご研究にご活用ください。

Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST を用いる測定

はじめに

Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST は、細胞から培地中に放出された乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性を測定することにより細胞傷害を測定するキットである。LDH は細胞質に存在する酵素で、通常は細胞質に留まっているが、細胞膜が傷害を受けると培地中に放出される。放出された LDH は安定なため、死細胞または細胞膜に傷害を受けた細胞数を測る指標として広く測定されている。LDH は、NAD (ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド) を補酵素として乳酸の脱水素化を触媒し、ピルビン酸と NADH を生成する。次に、生じた NADH は、電子メディエーターを介してテトラゾリウム塩 (無色) をホルマゼン (橙色) に還元する。生成したホルマゼンの量は、放出された LDH 活性に比例するため、傷害を受けた細胞数の指標となる。以下に、96 穴マイクロプレートを用いた Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST の細胞数測定法ならびに薬剤感受性試験法について紹介する。

【用途】

- ・細胞毒性試験
- ・薬剤感受性試験

準備する物

装置・器具

- ・マイクロプレートリーダー (490 nm の吸光フィルター)
- ・96 穴マイクロプレート* (細胞培養用)
- ・測定用マイクロプレート (ノンホモニアスアッセイのみ)
- ・マルチピペット (8 または 12 チャンネル: 10 ~ 200 μ l 対応)
- ・炭酸ガスインキュベーター
- ・クリーンベンチ
- ・血球計算盤またはセルカウンター

* ホモニアスアッセイの場合、浮遊細胞も平底を使用する。ノンホモニアスアッセイの場合、浮遊細胞は丸底または V 底を使用する。

試薬

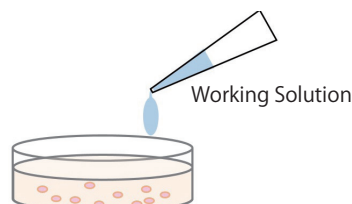
- ・Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST [同仁品コード: CK12]
- ・培養培地

測定法の選択

本キットは 2 つの測定法に対応しているため、実験状況に応じて測定方法を選択することができる。



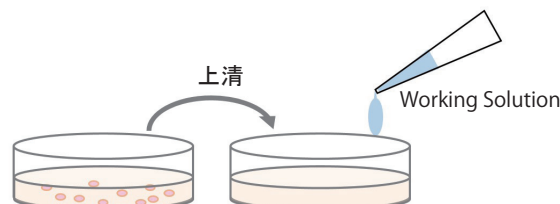
ホモニアスアッセイ



細胞培養液の入った各ウェルに直接 Working Solution を添加し、発色反応を行う。培養上清を移し変える操作もなく簡単な操作で測定ができる。

本アッセイ法の操作は、P.13 を参照。

ノンホモニアスアッセイ

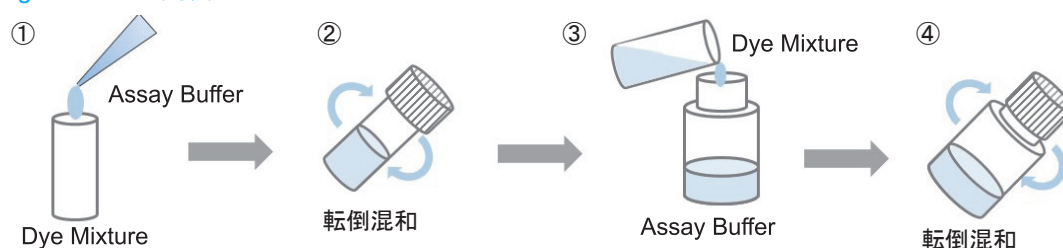


細胞培養液の上清を他のプレートに移し測定するため、アッセイで使用した細胞 (高コントロールを除く) は Cell Counting Kit-8 や MTT を用いた生存細胞の試験や細胞染色など他の実験に使用できる。

本アッセイ法の操作は、P.16 を参照。

Cell Counting Kit-8 との併用実験例は、P.20 を参照。

Working Solution の調製



1. 適量の Assay Buffer を Dye Mixture チューブに加える。
100 tests : 1 ml の Assay Buffer を加える。
500 tests 又は 2000 tests : 5 ml の Assay Buffer を加える。
 2. 転倒混和により内容物を完全に溶解する。
 3. ステップ 2 で調製した溶液全量を Assay Buffer のボトルに移す。
 4. 転倒混和により内容物を混合する。
- ⚠ Working Solution 調製後は遮光下、0 ~ 5 °C で保存する (6 ヶ月間安定)。

ホモジニアスアッセイ

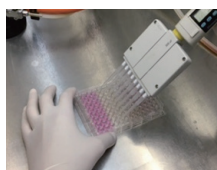
測定条件の設定

細胞内の LDH 量は細胞種によって異なるため、信頼性のある結果を得るためには事前に実験時の最適な細胞数を確認する必要がある。以下の方法に従い、高コントロール、低コントロール及びバックグラウンドコントロールの吸光度値から実験系にあった最適な細胞数を確認することができる。

操作

注意点・コツ

- 細胞を培地で洗浄し、培地を用いて 5×10^5 cells/ml の細胞懸濁液を調製する。
- 培地 100 μ l を 96 穴マイクロプレートに各ウェルに加える。

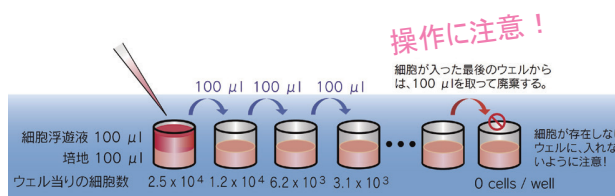


- 血球計算盤またはセルカウンターなどを用いて細胞数を計測する。
- 可能な限り濃い濃度の細胞 10^5 - 10^6 cells/ml を準備する。細胞数が少ない場合バラツキの原因となることがある。
- 培地中の血清に LDH が含まれている場合、バックグラウンドが高くなる可能性がある。その場合、血清濃度を 5% 以下にて検討する。

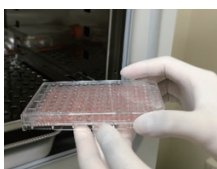
- マルチチャンネルピペットを用いて細胞懸濁液の 2 倍希釈系列を調製する。高コントロール、低コントロール及びバックグラウンドコントロール (培地のみ) を 3 ウェルずつ準備する。(P14 のプレート配置図を参照)

《段階希釈の方法》

8 チャンネルマルチピペットを用いて、96 ウェルマイクロプレートに各ウェルに培地 100 μ l を入れて、次に、 5×10^5 cells/ml に調製した細胞懸濁液 100 μ l を細胞数が最大となるウェルに加えてピペッティングする。その後、細胞濃度が半分となった浮遊液 100 μ l を次のウェルに移して、同様にピペッティングにて混合する。以降、この操作を繰り返す。



- 37°C の CO₂ インキュベーターで培養する。

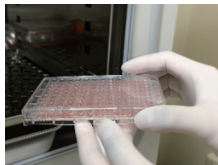


- この時の培養時間は毒性試験時の薬剤暴露時間と同じにする。
- 薬剤の暴露時間が 24 時間を超える場合、薬剤により全ての細胞が死んだ状態でも細胞傷害性が 100% に達しないことがあるため注意が必要である。詳細はトラブルシューティングを参照。

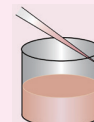
操作

注意点・コツ

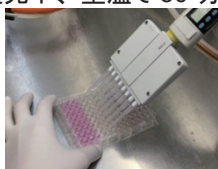
- ・高コントロール用のウェルに Lysis Buffer 10 μ l を加える。
- ・37°C、30 分間 CO₂ インキュベーター内でインキュベーションする。



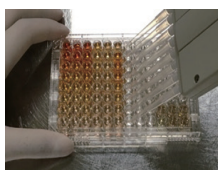
- ・試薬の添加量が少ないため、ウェルの側壁にチップの先を当てて加えると良い（下図）。試薬がウェルの側壁に付着した場合、プレートを軽く叩いて培地と混合させる。



- ・全てのウェルに Working Solution 100 μ l を加える。遮光下、室温で 30 分間呈色反応を行う。

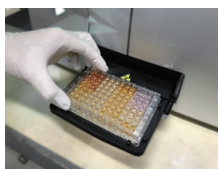


- ・全てのウェルに Stop Solution 50 μ l を加える。



- ・気泡は、測定値のバラツキの原因となるため、気泡を生じないようにする。
- ・Stop Solution 添加後、遮光下で 3 時間は吸光度値に変化がないことを確認している。

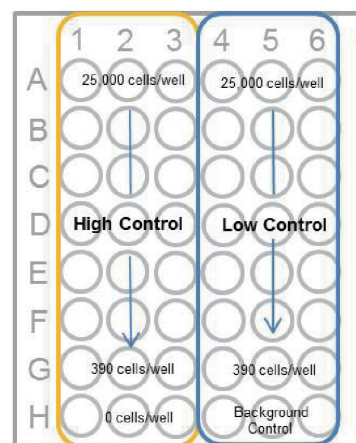
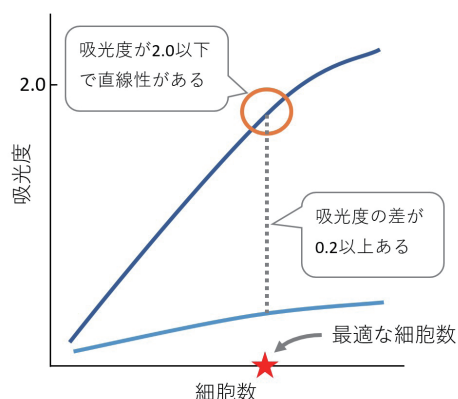
- ・プレートリーダーを用いて 490 nm の吸光度を測定する。



最適な細胞数の算出

得られた吸光度を縦軸に、細胞数を横軸にプロットし、下記の点を考慮し最適な細胞数を決定することをお勧めする。

- 細胞数と吸光度でプロットし直線性があり、吸光度が 2.0 以下の細胞数を選択する。
- 高コントロールと低コントロールの吸光度差が 0.2 以上となる細胞数を選択する。



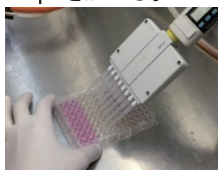
プレートの配置図

細胞毒性試験

操作

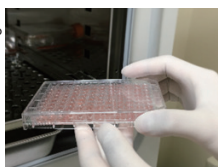
注意点・コツ

- ・ 予備実験で確認したウェル当たりの最適な細胞数の 2 倍濃度になるよう培地で細胞懸濁液を調製し、平底 96 マイクロプレートに 50 μ l を加える。



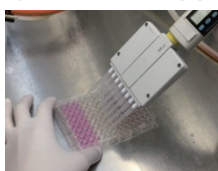
- ・ 培地で目的の濃度に調製した被験物質溶液 50 μ l を実験サンプルのウェルに、培地を各コントロールのウェル加える。(下記「各ウェルの溶液量」を参照)

- ・ 37°C で適切な時間 CO₂ インキュベーター内で培養する。

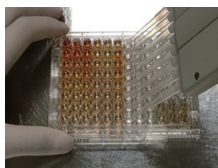


- ・ 高コントロールウェルに Lysis Buffer 10 μ l を加え、37°C、30 分間 CO₂ インキュベーター内でインキュベーションする。

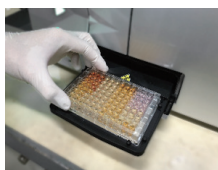
- ・ 各ウェルに Working Solution 100 μ l を加える。遮光下、室温で 30 分間呈色反応を行う。



- ・ 全てのウェルに Stop Solution 50 μ l を加える。



- ・ プレートリーダーを用いて 490 nm の吸光度を測定する。



各ウェルの溶液量 (ホモジニアスアッセイ)

	実験サンプル	高コントロール	低コントロール	バックグラウンドコントロール
培地	-	50 μ l	50 μ l	100 μ l
細胞懸濁液	50 μ l	50 μ l	50 μ l	-
被験物質	50 μ l	-	-	-
Lysis Buffer	-	10 μ l	-	-

実験サンプル：被験物質を細胞に加えたことにより細胞から放出される LDH の活性

高コントロール：細胞中の全 LDH 活性（放出される LDH の活性の最大値）

低コントロール：薬剤処理していない細胞から自然に放出される LDH の活性

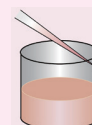
バックグラウンドコントロール：培地中に含まれる LDH の活性

- ・ 付着細胞の場合、細胞を一晩インキュベーションして、新しい培地 50 μ l に交換した後に次の操作に進む。

- ・ 被験物質中に強い還元性を持つ物質が含まれていると、色素が誤発色してバックグラウンドを上げます。細胞を含まない培地および被験物質を用い試薬ブランクを測定して確認する。

- ・ 薬剤の暴露時間が 24 時間を超える場合、薬剤により全ての細胞が死んだ状態でも細胞傷害性が 100% に達しないことがあるため注意が必要である。詳細はトラブルシューティングを参照。

- ・ 試薬の添加量が少ないため、ウェルの側壁にチップの先を当てて加えると良い（下図）。試薬がウェルの側壁に付着した場合、プレートを軽く叩いて培地と混合させる。



- ・ 気泡は、測定値のバラツキの原因となるため、気泡を生じないようにする。
- ・ Stop Solution 添加後、遮光下で 3 時間は吸光度値に変化がないことを確認している。

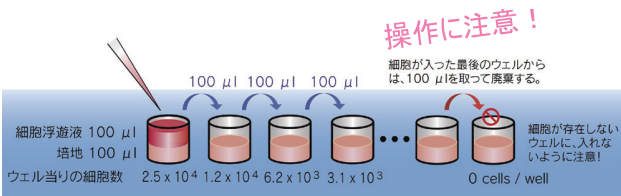
- ・ 高コントロールの液量が、実験サンプル及び他のコントロールよりも 10% 多いが測定値には影響を与えないので、ボリューム補正のための実験の必要はない。

操作	注意点・コツ
細胞毒性の算出式 披検物質と各コントロールの吸光度からバックグラウンドコントロールの吸光度を引いた値 (3 重測定の平均値) を用いて算出する。 $\text{細胞傷害性 (\%)} = \frac{\text{実験サンプル} - \text{低コントロール}}{\text{高コントロール} - \text{低コントロール}} \times 100$	

ノンホジニアスアッセイ

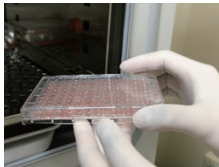
測定条件の設定

細胞内の LDH 量は細胞種によって異なるため、信頼性のある結果を得るためには事前に実験時の最適な細胞数を確認する必要がある。以下の方法に従い、高コントロール、低コントロール及びバックグラウンドコントロールの吸光度値から実験系にあった最適な細胞数を確認することができる。

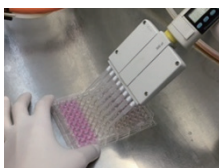
操作	注意点・コツ
- 細胞を培地で洗浄し、培地を用いて 5×10^5 cells/ml の細胞懸濁液を調製する。 - 培地 100 μl を 96 穴マイクロプレートに各ウェルに加える。	- 血球計算盤またはセルカウンターなどを用いて細胞数を計測する。 - 可能な限り濃い濃度の細胞 10^5-10^6 cells/ml を準備する。細胞数が少ない場合パラツキの原因となることがある。 - 培地中の血清に LDH が含まれている場合、バックグラウンドが高くなることもある。その場合、血清濃度を 5% 以下にて検討する。
マルチチャンネルピペットを用いて細胞懸濁液の 2 倍希釈系列を調製する。高コントロール、低コントロール及びバックグラウンドコントロール (培地のみ) を 3 ウェルずつ準備する。(P17 の「プレート配置図」を参照) 《段階希釈の方法》 8 チャンネルマルチピペットを用いて、96 ウェルマイクロプレートの各ウェルに培地 100 μl を入れて、次に、5×10^5 cells/ml に調製した細胞懸濁液 100 μl を細胞数が最大となるウェルに加えてピペッティングする。その後、細胞濃度が半分となった浮遊液 100 μl を次のウェルに移して、同様にピペッティングにて混合する。以降、この操作を繰り返す。	操作に注意! 細胞が入った最後のウェルからは、100 μl を取って廃棄する。 細胞が存在しないウェルに、入れないように注意! 
- 培地 100 μl を全てのウェルに加える。 37°C の CO₂ インキュベーターで培養する。	- この時の培養時間は毒性試験時の薬剤暴露時間と同じにする。 - 薬剤の暴露時間が 24 時間を超える場合、薬剤により全ての細胞が死んだ状態でも細胞傷害性が 100% に達しないことがあるため注意が必要である。詳細はトラブルシューティングを参照。

操作

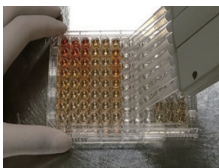
- ・高コントロール用のウェルに Lysis Buffer 20 μ l を加える。
- ・37°C、30 分間 CO₂ インキュベーター内でインキュベーションする。



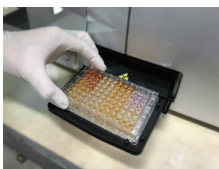
- ・250 × g、2 分間、マイクロプレート遠心する。（浮遊細胞の場合）
- ・各ウェルから上清 100 μ l を注意深く取り、測定用 96 穴マイクロプレートに移す。
- ・全てのウェルに Working Solution 100 μ l を加える。遮光下、室温で 30 分間呈色反応を行う。



- ・全てのウェルに Stop Solution 50 μ l を加える。

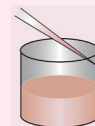


- ・プレートリーダーを用いて 490 nm の吸光度を測定する。



注意点・コツ

- ・試薬の添加量が少いため、ウェルの側壁にチップの先を当てて加えると良い（下図）。試薬がウェルの側壁に付着した場合、プレートを軽く叩いて培地と混合させる。

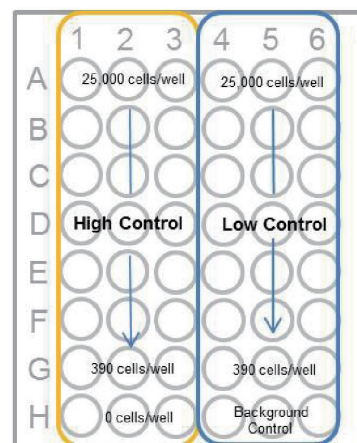
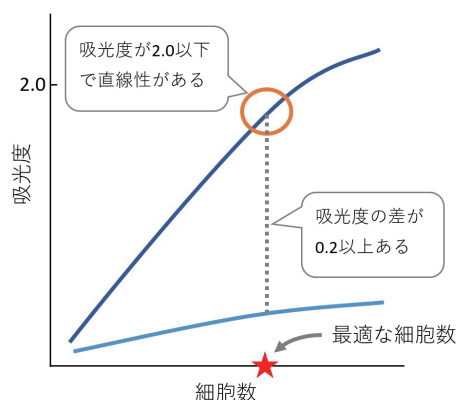


- ・気泡は、測定値のバラツキの原因となるため、気泡を生じないようにする。
- ・Stop Solution 添加後、遮光下で 3 時間は吸光度値に変化がないことを確認している。

最適な細胞数の算出

得られた吸光度を縦軸に、細胞数を横軸にプロットし、下記の点を考慮し最適な細胞数を決定することをお勧めする。

- 細胞数と吸光度でプロットし直線性があり、吸光度が 2.0 以下の細胞数を選択する。
- 高コントロールと低コントロールの吸光度差が 0.2 以上となる細胞数を選択する。



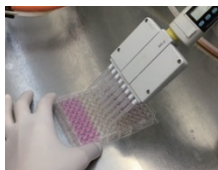
プレートの配置図

細胞毒性試験

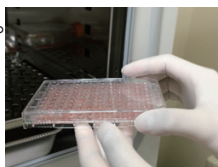
操作

注意点・コツ

- ・ 予備実験で確認したウェル当たりの最適な細胞数になるよう培地で細胞懸濁液を調製し、96 穴マイクロプレートに 100 μ l を加える。



- ・ 培地で目的の濃度に調製した被験物質溶液 100 μ l を実験サンプルのウェルに、培地を各コントロールのウェルに加える。(P19 の「各ウェルの溶液量」を参照)
- ・ 37°C で適切な時間 CO₂ インキュベーター内で培養する。

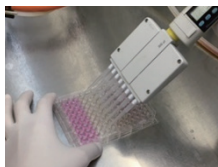


- ・ 高コントロールウェルに Lysis Buffer 20 μ l を加え、37°C、30 分間 CO₂ インキュベーター内でインキュベーションする。

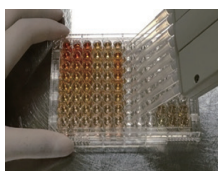
- ・ 250 × g、2 分間、マイクロプレートを遠心する。(浮遊細胞の場合)。

- ・ 各ウェルから上清 100 μ l を注意深く取り、測定用 96 穴マイクロプレートに移す。

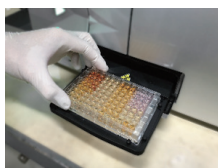
- ・ 各ウェルに Working Solution 100 μ l を加える。遮光下、室温で 30 分間呈色反応を行う。



- ・ 全てのウェルに Stop Solution 50 μ l を加える。



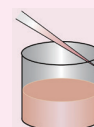
- ・ プレートリーダーを用いて 490 nm の吸光度を測定する。



- ・ 付着細胞の場合、細胞を一晩インキュベーションして、新しい培地 100 μ l に交換した後に次の操作に進む。

- ・ 被験物質中に強い還元性を持つ物質が含まれていると、色素が誤発色してバックグラウンドを上げます。細胞を含まない培地および被験物質を用い試薬ブランクを測定して確認する。
- ・ 薬剤の暴露時間が 24 時間を超える場合、薬剤により全ての細胞が死んだ状態でも細胞傷害性が 100% に達しないことがあるため注意が必要である。詳細はトラブルシューティングを参照。

- ・ 試薬の添加量が少ないため、ウェルの側壁にチップの先を当てて加えると良い(下図)。試薬がウェルの側壁に付着した場合、プレートを軽く叩いて培地と混合させる。



- ・ 気泡は、測定値のバラツキの原因となるため、気泡を生じないようにする。
- ・ Stop Solution 添加後、遮光下で 3 時間は吸光度値に変化がないことを確認している。

操作

注意点・コツ

	実験 サンプル	高コント ロール	低コント ロール	バックグラウンド コントロール
培地	20 µl	100 µl	120 µl	220 µl
細胞懸濁液	100 µl	100 µl	100 µl	-
被験物質	100 µl	-	-	-
Lysis Buffer	-	20 µl	-	-

各ウェルの溶液量（ノンホモジニアスアッセイ）

実験サンプル：被験物質を細胞に加えたことにより細胞から放出される LDH の活性

高コントロール：細胞中の全 LDH 活性（放出される LDH の活性の最大値）

低コントロール：薬剤処理していない細胞から自然に放出される LDH の活性

バックグラウンドコントロール：培地中に含まれる LDH の活性

細胞毒性の算出式

被検物質と各コントロールの吸光度からバックグラウンドコントロールの吸光度を引いた値
(3 重測定の平均値) を用いて算出する。

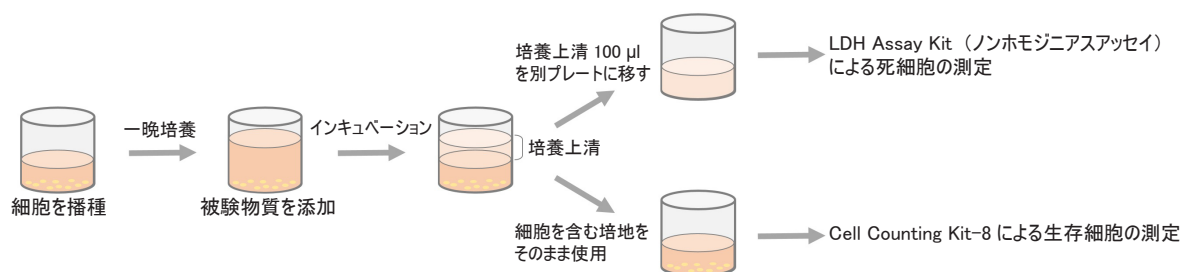
$$\text{細胞傷害性 (\%)} = \frac{\text{実験サンプル} - \text{低コントロール}}{\text{高コントロール} - \text{低コントロール}} \times 100$$

CCK-8 との併用実験例

細胞傷害性を確認する際、測定原理の異なる複数の指標を用いることで実験の裏付けを行うことができる。Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST のノンホモジニアスアッセイでは培養上清を実験に使用するため、残った細胞培養液は別の実験（異なる指標での測定）に使用することが可能である。

以下に本プロトコルでも紹介している細胞内代謝活性測定キット Cell Counting Kit-8(CCK-8) と Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST を用いた評価方法とその結果を紹介する。

操作



- ・ HeLa 細胞（ヒト子宮頸癌細胞）5000 cells/100 μ l を 96well ウェルプレートに播種する。
- ・ CO₂ インキュベーター (37℃) で 1 晩インキュベーションする。
- ・ 被験物質 100 μ l を添加する。
- ・ CO₂ インキュベーター (37℃) で 1 時間インキュベーションする。
- ・ インキュベーション終了 30 分前に、LDH アッセイ用の高コントロールのウェルに Lysis buffer 20 μ l を添加する。
- ・ 上清 100 μ l を新しいプレートへ添加する。

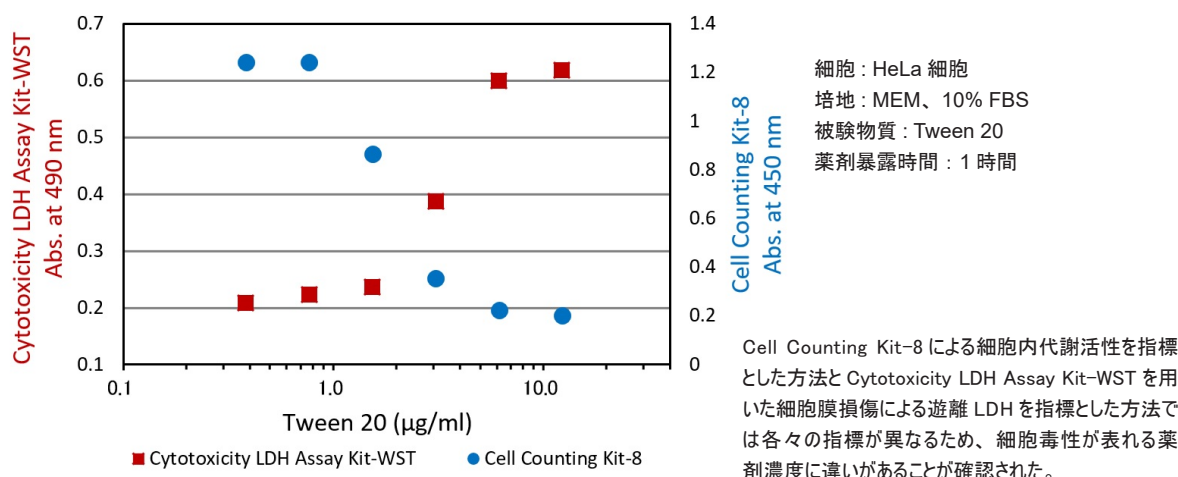
培養上清を用いた LDH アッセイ ノンホモジニアスアッセイ法に基づき操作

- ・ 各ウェルに Working Solution 100 μ l を添加する。
- ・ 遮光下、室温で 30 分間呈色反応する。
- ・ 全てのウェルに Stop Solution 50 μ l を添加する。
- ・ プレートリーダーを用いて 490 nm の吸光度を測定する。

細胞を含む培地を用いた CCK-8 アッセイ

- ・ 細胞を含む培地に CCK-8 を 10 μ l 添加する。
- ・ CO₂ インキュベーター (37℃) で 3 時間呈色反応する。
- ・ プレートリーダーを用いて 450 nm の吸光度を測定する。

結果



トラブルシューティング

トラブル	考えられる原因	解決方法
測定値にバラツキが多い。	培地の表面に気泡がある。	シリンジや注射針などの先端で、気泡を除去する。プレート用の遠心機がある場合は、1000 x g で 1 分間遠心する。
	培地の水分蒸発により試薬濃度に変化している。	一番外側のウェルは、水分蒸発が起こりやすいため、測定には利用せず、培地のみを入れる。
	試薬溶液が培地と混合していない。	プレートの側面を指で軽く叩き、ウェルの内壁に付着している試薬溶液を培地中に落とす。プレートを叩く際は、ウェル中の培地が飛び出さない程度にする。
	正確な試薬量が添加されていない。	使用するピペットを補正する。
	マルチチャンネルピペットを用いておらず、ウェル間でのインキュベーション時間にバラつきが生じている。	Working Solution 及び Stop Solution の添加の際は、特にマルチチャンネルピペットの使用をお勧めする。
細胞は全て死んでいるが細胞障害性が 100% に達しない。	被験物質への暴露時間が 24 時間以上を超えている。	被験物質の暴露時間を 24 時間以内で行う。被験物質の暴露時間が長時間になると、高コントロールと被験物質で測定する細胞数の差が大きくなる。つまり高コントロールでは暴露時間が終了した時点での全細胞の LDH 活性を測定するため、暴露時間が長い場合はその間に細胞が増殖し、増殖した分の細胞中の LDH 活性も測定することになる。一方、被験物質によって細胞が増殖する前に全細胞が死滅すると被験物質で測定している細胞数と高コントロールで測定している細胞数に差が生じることになる。
バックグラウンドが高い。	培地中に高い濃度の LDH が含まれている。	血清不含または血清濃度を 5% 以下にした培地を使用する。
	被験物質（薬剤）または培地中の化合物に還元性物質が含まれている。	アスコルビン酸などの還元性物質は WST と直接反応するため使用することができない。また DMEM、RPMI、F-12 培地については還元性物質が含まれていないことを確認している。
吸光度の値が低い。	被験物質（薬剤）または培地中の化合物に LDH 活性を阻害する物質が含まれている。	Q&A 中の「測定に影響を与える化合物はありますか？」の項を参照。

Q&A

Q：細胞毒性試験にて CellCounting Kit-8 との相関性はありますか？

A：Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST と Cell Counting Kit-8 では、測定原理が異なるために必ずしも相関性は得られません。そのため、細胞毒性試験には数種の指標で測定いただくことをお勧めします。

＜ Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST ＞

細胞膜の損傷により培地中に漏れ出した LDH 活性を測定（細胞膜損傷が指標）

＜ Cell Counting Kit-8 ＞

細胞内の代謝活性（デヒドロゲナーゼ）を測定（代謝活性が指標）

Q：本 LDH Assay Kit-WST にスタンダードの LDH は含まれていますか？

A：本キットにはスタンダードの LDH は含まれておりません。

Q：LDH のアイソザイムの測り分けはできますか？

A：本製品は、トータルの LDH 活性を指標とした細胞毒性測定用となりますので、LDH1, LDH2, LDH3 等の活性の測り分けはできません。

Q：測定に影響を与える化合物はありますか？

A：LDH 測定に影響する化合物については下記をご参照ください。

1. 還元性を有する化合物

アスコルビン酸などの還元性を有する物質が被験物質等に含まれる場合、高いバックグラウンドとなるため、事前に細胞を含まない培地に被験物質を加え、Working Solution 添加により吸光度を確認してください。測定した吸光度をサンプルブランクとして差し引いて解析ください。

2. LDH を含む血清

培地中に LDH を含む血清を使用される場合、各ウェルの吸光度が上昇します。各サンプルの吸光度から LDH 由来のバックグラウンドを差し引いてください。もし血清により大幅な吸光度の増加がみられる場合は、無血清培地または血清濃度が 5% 以下になるよう調整しご使用ください。

3. LDH 活性の阻害剤

培地中にピルビン酸が高濃度で含まれていると LDH 活性の測定を阻害します。高コントロールの吸光度の値が低い（低コントロールと同程度）場合は、培地中にピルビン酸が含まれていないかご確認ください。

Q：前培養は、必ず行わなければならないのですか？

A：付着細胞では前培養を推奨しております。トリプシン処理等により培養用フラスコから回収する際に、細胞はダメージを受けます。そのため、対数増殖期の状態にするために細胞の前培養が必要になります。浮遊細胞の場合は、省略しても構いません。

MTT を用いる測定

はじめに

MTT 法は、Cell Counting Kit -8と同様に吸光度測定を利用して細胞数を測定する方法で $[^3\text{H}]$ チミジン取り込み法のように放射性同位体を使用しない。テトラゾリウム塩化合物である MTT は、細胞膜を透過後、ミトコンドリア内脱水素酵素により青色の色素（ホルマザン）に還元される。ホルマザンは難溶性の沈澱物として析出するため、吸光度測定前に有機溶媒により溶解させた後、吸光度を測定する。

【用途】 ・細胞数測定 ・細胞増殖試験
・細胞毒性試験 ・薬剤感受性試験

準備する物

装置・器具

- ・マイクロプレートリーダー
吸光度測定用フィルター 570 nm（ホルマザンの溶解液が塩酸 / イソプロピルアルコール溶液の場合）
535 nm（ホルマザンの溶解液が DMSO の場合）
- ・96 ウェルマイクロプレート（細胞培養用）
- ・マルチピペット（8 または 12 チャンネル：10 ～ 100 μl 対応）
- ・炭酸ガスインキュベーター
- ・クリーンベンチ
- ・血球計算盤またはセルカウンター

試薬

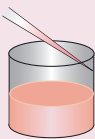
- ・MTT [同仁品コード：M009]
- ・PBS(-): ダルベッコリン酸緩衝塩類溶液
- ・濃塩酸
- ・イソプロピルアルコール
- ・DMSO（溶解液として、塩酸 / イソプロピルアルコールを使用する場合は不要）

調製

- ・PBS(-): ダルベッコリン酸緩衝塩類溶液（ Ca^{2+} , Mg^{2+} 不含）
メディアウム瓶等に移して、オートクレーブ滅菌したものを使用する。
- ・MTT 溶液
MTT 25 mg に PBS(-) 5 ml を加えて溶解する。
⚠ 溶解し難い場合は、超音波照射、ボルテックスにより溶解する。
⚠ 必要に応じて、0.22 μm フィルターでろ過滅菌する。
⚠ 保存する場合は、測定に必要な量ずつ分注して -20°C で保存する。
- ・ホルマザン溶解液
4 mol/l 塩酸 0.1 ml にイソプロピルアルコールを加えて、10 ml に希釈する。
⚠ 4 mol/l 塩酸：濃塩酸を超純水で希釈して調製する。
塩酸ガスが発生するため、操作はドラフト内で行い、保護手袋・保護メガネを着用する。
超純水に濃塩酸を少しずつ加えて希釈する。

測定条件の設定

MTT を用いて細胞増殖試験や細胞毒性試験等を行う際は、得られる吸光度と生細胞数が比例関係である必要がある。そこで、あらかじめ細胞数測定を行い、測定する細胞数や発色反応時間の目安をつけることが望ましい。以下に、MTT を用いた測定条件の設定について紹介する。

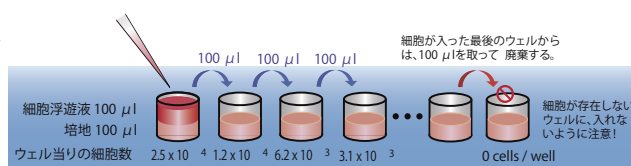
操作	注意点・コツ
- 測定対象の細胞を培養用フラスコから回収する。 - 細胞を計測して、濃度を決定した細胞懸濁液を調製する。 (細胞濃度: cells /ml) 96 ウェルマイクロプレートの各ウェルに、段階希釈法により細胞懸濁液を 100 μl ずつ入れる。バックグラウンド測定用のウェルには、培地のみ加える。	- 付着性細胞の場合、トリプシン処理やセルスクレイパー等により回収する。 - 血球計算盤またはセルカウンターなどを用いて細胞数を計測する。
炭酸ガスインキュベーターで、24 ～ 48 時間前培養する。 (開始時間 : ～終了時間 :)	- 浮遊細胞の場合、V 底プレートを使用してもよい。 - 段階希釈法により細胞懸濁液を調製すると簡便である。 (次ページ「実験例」を参照)
培地交換した後、96 ウェルマイクロプレートの各ウェルに、MTT 溶液を 10 μl ずつ加える。	培養後、ウェル当りの細胞数は、計測時の細胞数を上回っていることに注意する。細胞数と吸光度の関係を得る場合、細胞が増殖しない時間内に試薬を添加し、吸光度を測定する。
炭酸ガスインキュベーターで、2 ～ 4 時間反応させる。 (開始時間 : ～終了時間 :)	96 ウェル以外のプレートやシャーレを用いる場合、培地量の 1/10 量の試薬を加える。 - 試薬の添加量が少ないため、ウェルの側壁にチップの先を当てて加えると良い (下図)。試薬がウェルの側壁に付着した場合、プレートを軽く叩いて培地と混合させる。 - 気泡は、測定値のバラツキの原因となるため、気泡を生じないようにする。
各ウェル中の溶液を吸引除去後、PBS(-) を 200 μl 加えて、約 1 分間経過後に、再度ウェル中の溶液を吸引除去する。	注意!  培地を除去する際に、細胞がプレート底面から剥がれないよう注意する。
ホルマザン溶解液 (塩酸 / イソプロピルアルコール溶液又は DMSO) を 200 μl ずつ加える。ホルマザンをピペッティングなどにより、完全に溶解する。	浮遊細胞の場合、V 底プレートの溶液を別途用意した平底プレートにマルチピペットを用いて移した後、測定する。
マイクロプレートリーダーで、吸光度を測定する。 塩酸 / イソプロピルアルコール溶液 : 570 nm DMSO: 535 nm	細胞種により生成するホルマザンの量が異なるため、試薬添加後の発色時間が同じでも吸光度は異なる。

実験例

HeLa 細胞（ヒト子宮頸癌細胞）の浮遊液を、下図の要領で 96 穴マイクロプレート（各ウェル）に 2.5×10^4 , 1.25×10^4 , 6.2×10^3 , $\dots$, 0 cells/well となるように段階的に希釈、分注した。前述の操作方法に従い、MTT を用い、細胞数を測定した。

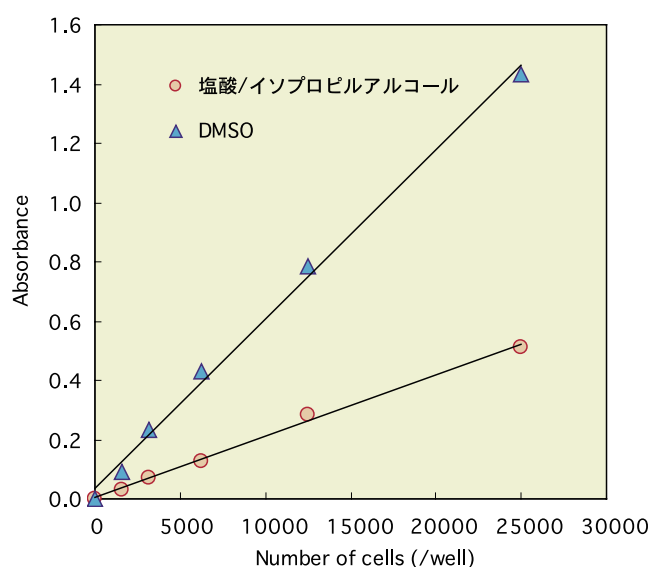
《段階希釈の方法》

8 チャンネルマルチピペットを用いて、96 ウェルマイクロプレート（各ウェル）に培地 100 μ l を入れて、次に、 5×10^5 cells/ml に調製した細胞浮遊液 100 μ l を細胞数が最大となるウェルに加えてピペッティングする。その後、細胞濃度が半分となった浮遊液 100 μ l を次のウェルに移して、同様にピペッティングにて混合する。以降、この操作を繰り返す。

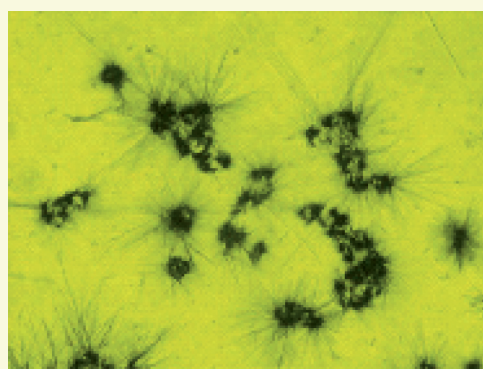


炭酸ガスインキュベーターで 24 時間前培養した後、前述の操作方法に従って細胞数とホルマザンの吸光度との関係を確認した。ここでは、MTT ホルマザンの溶解液として、塩酸 - イソプロピルアルコール、または DMSO を用いた場合の比較を示した。溶解液には、DMSO を用いた方が、塩酸 - イソプロピルアルコールに比べて感度が良い結果が得られた。

なお、溶解液によって MTT 溶液の極大吸収波長域が変化するため、吸光度測定用フィルターを以下の通り設定して測定した（塩酸 - イソプロピルアルコール：570 nm、DMSO：535 nm）。



細胞数と吸光度の関係



MTT ホルマザンの写真

MTT ホルマザンは、水に溶解せず針状結晶となる。MTT は細胞内に移動した後、ホルマザンを生成するため、試薬自身の毒性も考慮にいれて試験を行う必要がある。

ブレイク！

細胞に優しい！ Cell Counting Kit-8

Cell Counting Kit-8 溶液に含まれる WST-8 は、主に細胞の外で還元されて水溶性のホルマザンを生成する。このため、Cell Counting Kit-8 を添加して発色反応した後でも、細胞は殆ど形態を変えずに生存し続ける。Cell Counting Kit-8 を使用することで、試薬による細胞へのダメージを与えることなく毒性試験を実施することができる。

細胞増殖・毒性試験法

操作

注意点・コツ

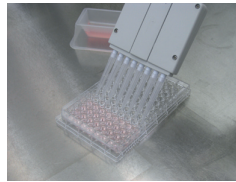
- 測定対象の細胞を培養用フラスコから回収する。

- 付着性細胞の場合、トリプシン処理やセルスクレイパー等により回収する。

- 細胞を計測して、濃度を決定した細胞懸濁液を調製する。
(細胞濃度: cells /ml)

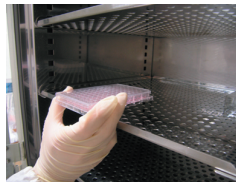
- 血球計算盤、セルカウンターなどを用いて計測する。

- 96 ウェルマイクロプレートの各ウェルに、細胞懸濁液を 100 μ l ずつ入れる。バックグラウンド測定用のウェルには、培地のみ入れる。



- 浮遊細胞の場合、V底プレートを使用してもよい。

- 炭酸ガスインキュベーターで、24 ~ 48 時間前培養する。
(開始時間 : ~ 終了時間 :)



- 細胞数が多すぎる場合、マイクロプレートリーダーの測定上限を超えてしまうことがある。薬剤などの被検物質の性質（細胞増殖を促進するか抑制するか）、発色時間、細胞種等は重要な要因であるため、予備実験を実施して最適な細胞濃度（各ウェルに加える細胞数）を設定する。

- 必要に応じて培地交換を行う。
細胞を除かないように培地を除去した後、新しい培地を 100 μ l ずつ入れる。バックグラウンド測定用のウェルには、培地のみ入れる。

- 細胞培養開始から測定まで、48 時間以上培養する際は、培地交換を行う。
- 浮遊細胞の場合、V底プレートを遠心して細胞を沈殿させた後、培地を除去する。

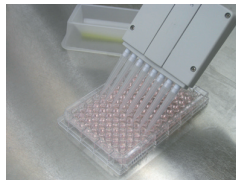
- 培地を用いて任意の濃度に調製した被検物質液を 10 μ l ずつ加える。

- バックグラウンド測定用のウェル（細胞を入れていないウェル）にも同量の被検物質（薬剤）を加える。一方、陰性対照のウェルには、被検物質を含まない培地 10 μ l を加える。

- 炭酸ガスインキュベーターで、一定時間（6, 12, 24, 48 時間）反応させる。
(開始時間 : ~ 終了時間 :)

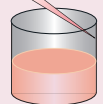
- 被検物質の溶解には、培地の他に、PBS 等の生理食塩水溶液も使用することができる。
- 被検物質への暴露時間は、任意に設定する。

- 96 ウェルマイクロプレートの各ウェルに、MTT 溶液を 10 μ l ずつ添加する。



- 96 ウェル以外のプレートやシャーレを用いる場合、培地量の 1/10 量の試薬を加える。

- 試薬の添加量が少ないため、ウェルの側壁にチップの先を当てて加えると良い(右図)。試薬がウェルの側壁に付着した場合、プレートを軽く叩いて培地と混合させる。



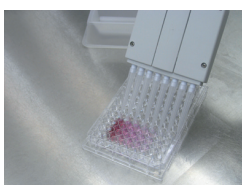
- 気泡は、測定値のバラツキの原因となるため、気泡を生じないようにする。

操作

- 炭酸ガスインキュベーターで、2～4 時間培養する。
(開始時間 : ～終了時間 :)
- 各ウェル中の溶液を吸引除去後、PBS(-) 200 μ l を加え、約 1 分間経過後に、再度ウェル中の溶液を除去する。



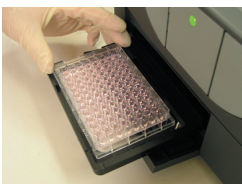
- ホルマザン溶解液 (塩酸 / イソプロピルアルコール溶液又は DMSO) を 200 μ l ずつ加える。ホルマザンをピペッティングなどにより、完全に溶解する。



- マイクロプレートリーダーを用いて吸光度を測定する。

塩酸 / イソプロピルアルコール溶液 : 570 nm

DMSO: 535 nm



注意点・コツ

- 薬剤への暴露時間は、任意に設定する。

- MTT を加えた細胞は、プレート底面から剥がれやすくなるため、培地を除去する際に注意する。
- 浮遊細胞の場合、V 字プレートを遠心して細胞を沈殿させた後、培地を除去する。

Check !

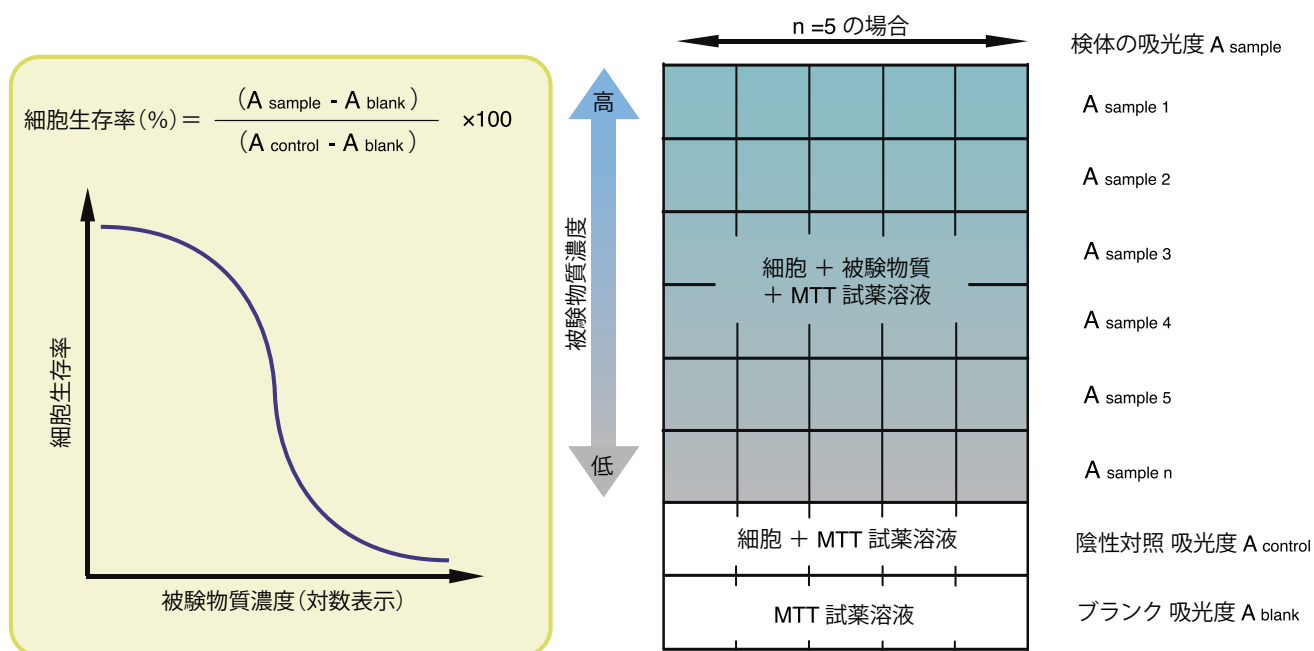
- ピペッティングにより溶解する。生成したホルマザンを完全に溶解することが、測定値のバラつきを抑える上で重要である。

- 細胞種により生成するホルマザンの量が異なるため、試薬添加後の発色時間が同じでも吸光度は異なる。

- 浮遊細胞の場合、V 底プレートの溶液を別途用意した平底プレートにマルチピペットを用いて移した後、測定する。

細胞生存率の算出

各ウェルの吸光度の値を下記の式に代入して、細胞生存率を算出する。



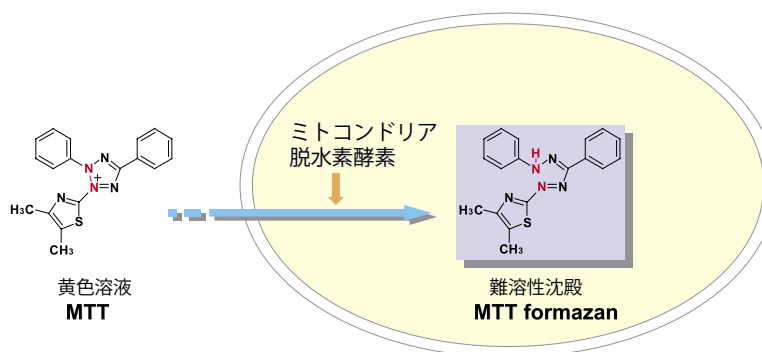
トラブルシューティング

トラブル	考えられる原因	解決方法
試料に濁りがある。	生体試料に濁り成分が含まれている。	650 nm の吸光度を測定し、各サンプルの測定値から差し引いてください。
色に変化しない。	培地を吸引除去する際に、MTT ホルマザンが除去されている。	浮遊細胞を用いている場合、遠心分離で細胞を沈殿させて下さい。
	細胞数が少ない。	細胞種毎に細胞数と吸光度の関係を測定する。（「測定条件の設定」の項に従ってください）
	MTT が劣化している。	MTT 溶液を再度調製して、測定してください。
	インキュベーションの時間が短い。	2 ～ 4 時間で最適なインキュベーション時間を検討下さい。
測定値にバラツキが多い。	MTT ホルマザンが完全に溶解していない。	ホルマザン溶解液（塩酸 / イソプロピルアルコール溶液又は DMSO）を加え、ホルマザンをビペッティングなどにより、完全に溶解して下さい。
	培地の水分蒸発により試薬濃度が変化している。	一番外側のウェルは、水分蒸発が起こりやすいため、測定には利用せず、培地のみを入れる。
	MTT 溶液が培地と混合していない。	プレートの側面を指で軽く叩き、ウェルの内壁に付着している MTT 溶液を培地中に落とす。プレートを叩く際は、ウェル中の培地が飛び出さない程度にする。
	培地の表面に気泡がある。	シリンジや注射針などの先端で、気泡を除去する。

Q & A

Q：MTT 法の測定原理を教えてください。

A：MTT は細胞膜を透過した後、ミトコンドリア内脱水素酵素により還元されてホルマザンと呼ばれる色素を生成します。このことから、ホルマザンの生成量が生細胞数と比例関係になることを利用して細胞数の測定ができます。但し、MTT の場合、生成するホルマザンは難溶性の沈殿物として析出するために、吸光度を測定する前に有機溶媒により溶解させる必要があります。



Q：ホルマザン溶解液（塩酸 / イソプロピルアルコール又は DMSO）を加える理由は何ですか？

A：細胞を死滅させて細胞膜を壊し、細胞の中にある MTT ホルマザンを取り出して、溶解するために用います。

Q：ホルマザン溶解液（塩酸 / イソプロピルアルコール又は DMSO）を添加する前に、培地を除くのはなぜですか？

A：MTT ホルマザンは水に難溶性であり、培地や緩衝液が残っていると、溶解性が下がるためです。

Q：浮遊細胞でV底プレートを使用するのはなぜですか？

A：浮遊細胞では遠心して底部に細胞を集約させたり、測定上清を回収するためです。測定では平底プレートを使用してください。

Cell Counting Kit-F を用いる測定

はじめに

Cell Counting Kit-F は、蛍光測定を利用して細胞数を測定するキットである。Cell Counting Kit-8や MTT 法と同様に細胞数測定等に利用することができる。分子内にエステル構造を有する Calcein-AM は、細胞膜を透過した後、細胞内の酵素（エステラーゼ）により加水分解されて、蛍光性を示す Calcein を生成する。この蛍光量を測定することで細胞数を測定することができ、Cell Counting Kit-8 のような吸光度測定よりも高感度な測定ができる。Cell Counting Kit-8 のように還元物質の存在によって測定に影響が現れる場合に有効である。

- 【用途】
- ・細胞数測定
 - ・細胞増殖試験
 - ・細胞毒性試験
 - ・薬剤感受性試験

準備するもの

装置・器具

- ・マイクロプレートリーダー
蛍光測定用フィルター 励起波長：480 ～ 500 nm
蛍光波長：500 ～ 535 nm
- ・96 ウェルマイクロプレート（細胞培養用、蛍光測定用）
- ・マルチピペット（8 または 12 チャンネル：10 ～ 100 μ l 対応）
- ・炭酸ガスインキュベーター
- ・クリーンベンチ
- ・血球計算盤またはセルカウンター

試薬

- ・Cell Counting Kit -F [同仁品コード：CK 06]
- ・細胞培養用培地
- ・PBS(-): ダルベッコリン酸緩衝塩類溶液（ Ca^{2+} , Mg^{2+} 不含）
⚠ メディウム瓶等に移して、オートクレーブ滅菌（121℃、20 分間）したものを使用する。

調製

- ・Cell Counting Kit-F 溶液
マイクロピペットを用いて、Cell Counting Kit-F を PBS(-) で 50 倍に希釈する。
⚠ 希釈後は保存ができないため、用時調製する。

測定条件の設定

Cell Counting Kit-F を用いて細胞増殖試験や細胞毒性試験等を行う際は、得られる蛍光量（蛍光強度）と生細胞数が比例関係である必要がある。そこで、あらかじめ細胞数測定を行い、測定する細胞数や発色反応時間の目安をつけることが望ましい。以下に、Cell Counting Kit-F を用いた測定条件の設定について紹介する。

操作

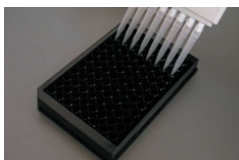
注意点・コツ

- 測定対象の細胞を培養用フラスコから回収する。

- 細胞を計測して、濃度を決定した細胞懸濁液を調製する。

（細胞濃度： cells/ml）

- 96 ウェルマイクロプレートの各ウェルに、細胞懸濁液を 100 μ l ずつ入れる。バックグラウンド測定用のウェルには、培地のみ加える。



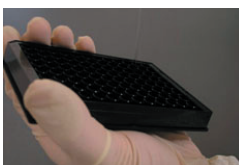
- 炭酸ガスインキュベーターで、24 ～ 48 時間前培養する。

（開始時間 ： ～終了時間 ： ）



- 培地を除去した後、PBS(-) または血清・フェノールレッドを含まない培地を 100 μ l ずつ入れる。

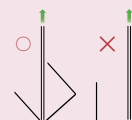
Cell Counting Kit-F は
培地交換が必要！



- バックグラウンドの上昇を防ぐため、蛍光測定用のプレートを用いる。
- 付着性細胞の場合、トリプシン処理やセルスクレイパー等により回収する。
- 血球計算盤またはセルカウンターなどを用いて計測する。
- 段階希釈法により細胞懸濁液を調製すると簡便である。
（次ページ「実験例」を参照）

- 培養後、ウェル当りの細胞数は、計測時の細胞数を上回っていることに注意する。細胞数と吸光度の関係を得る場合、細胞が増殖しない時間内に試薬を添加し、吸光度を測定する。

- 培地を除去する際に、細胞がプレート底面から剥がれないよう注意する。培地除去の際は、細胞にパスツールピペットやチップの先端が接触しないように、下図のようにプレートを傾けると良い。



- 96 ウェルマイクロプレートの各ウェルに、Cell Counting Kit-F 溶液を 10 μ l ずつ添加し、室温で 15 ～ 30 分間反応させる。

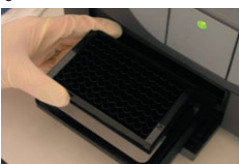
（開始時間 ： ～終了時間 ： ）



- マイクロプレートリーダーで、蛍光を測定する。

励起波長：480 ～ 500 nm

蛍光波長：500 ～ 535 nm



- 浮遊細胞の場合、V 底プレートを遠心して細胞を沈殿させた後、培地を除去する。

- 96 ウェル以外のプレートやシャーレを用いる場合、培地量の 1/10 量の試薬を加える。
- 試薬の添加量が少ないため、ウェルの側壁にチップの先を当てて加えると良い（下図）。試薬がウェルの側壁に付着した場合、プレートを軽く叩いて培地と混合させる。
- 気泡は、測定値のバラツキの原因となるため、気泡を生じないようにする。

- 浮遊細胞の場合、V 底プレートの溶液を別途用意した平底プレートにマルチピペットを用いて移した後、測定する。

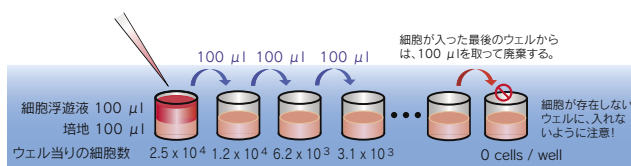
実験例

HeLa 細胞（ヒト子宮頸癌細胞）および HL60 細胞（前骨髄球性白血病細胞）の浮遊液を、下図の要領で 96 ウェルマイクロプレートの各ウェルに 2.5×10^4 , 1.25×10^4 , 6.2×10^3 , $\dots$ 0 cells/well となるように段階的に希釈、分注した。前述の操作方法に従い、Cell Counting Kit-F を用い、細胞数を測定した。

《段階希釈の方法》

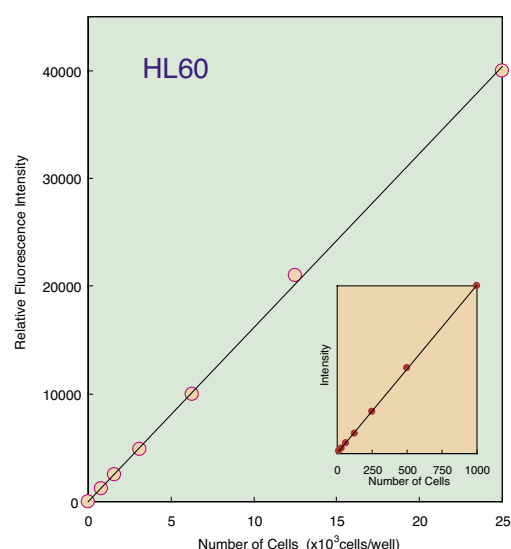
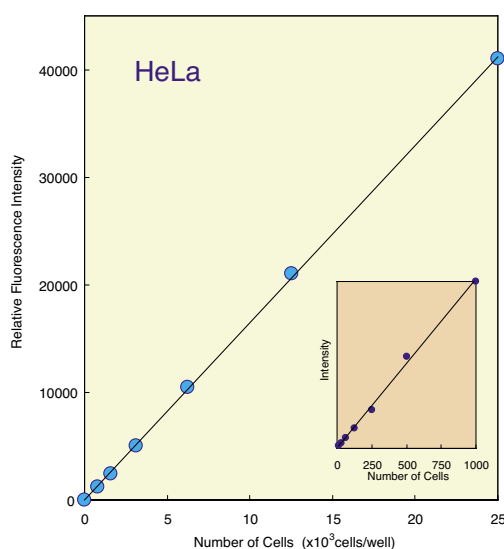
8 チャンネルマルチピペットを用いて、96 ウェルマイクロプレートの各ウェルに培地 100 μ l を入れて、次に、 5×10^5 cells/ml に調製した細胞浮遊液 100 μ l を細胞数が最大となるウェルに加えてピペッティングする。その後、細胞濃度が半分となった浮遊液 100 μ l を次のウェルに移して、同様にピペッティングにて混合する。以降、この操作を繰り返す。

操作に注意！



HeLa 細胞（下左図）と HL60 細胞（下右図）の測定例を示した。Cell Counting Kit-F では、吸光度による測定に比べて、低濃度域まで比例関係が得られるために正確な測定ができる。

下図は、測定値からバックグラウンド蛍光を差し引いた値をプロットした。



細胞増殖・毒性試験法

操作

注意点・コツ

- 測定対象の細胞を培養用フラスコから回収する。

- ・付着性細胞の場合、トリプシン処理やセルスクレイパー等により回収する。

- 細胞を計測して、濃度を決定した細胞懸濁液を調製する。
(細胞濃度 : cells /ml)

- ・血球計算盤、セルカウンターなどを用いて計測する。

- 96 ウェルマイクロプレートの各ウェルに、細胞懸濁液を 100 μ l ずつ入れる。バックグラウンド測定用のウェルには、培地のみ加える。



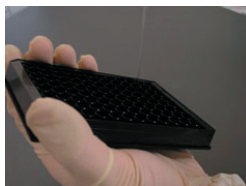
- ・浮遊細胞の場合、V底プレートを使用してもよい。

- ・細胞数が多すぎる場合、マイクロプレートリーダーの測定上限を超えてしまうことがある。薬剤などの被検物質の性質（細胞増殖を促進するか抑制するか）、発色時間、細胞種等は重要な要因であるため、予備実験を実施して最適な細胞濃度（各ウェルに加える細胞数）を設定する。

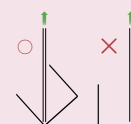
- 炭酸ガスインキュベーターで、24 ～ 48 時間培養する。
(開始時間 : ～終了時間 :)



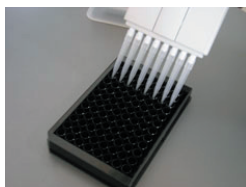
- 必要に応じて培地交換を行う。
細胞を除かないように培地を除去した後、新しい培地を 100 μ l ずつ入れる。バックグラウンド測定用のウェルには、培地のみ入れる。



- ・細胞培養開始から測定まで、48 時間以上培養する際は、培地交換を行う。
- ・培地除去の際は、細胞にパスツールピペットやチップの先端が接触しないように、下図のようにプレートを傾けると良い。



- 培地を用いて任意の濃度に調製した被検物質液を 10 μ l ずつ加える。



- ・浮遊細胞の場合、V底プレートを遠心して細胞を沈殿させた後、培地を除去する。

- ・バックグラウンド測定用のウェル（細胞を入れていないウェル）にも同量の被検物質（薬剤）を加える。一方、陰性対照のウェルには、被検物質を含まない培地 10 μ l を加える。
- ・被検物質の溶解には、培地の他に、PBS 等の生理食塩水溶液も使用することができる。

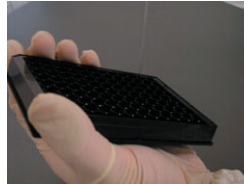
- 炭酸ガスインキュベーターで、一定時間（6, 12, 24, 48 時間）培養する。
(開始時間 : ～終了時間 :)



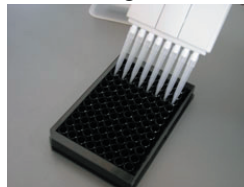
- ・被検物質への暴露時間は、任意に設定する。

操作

- 培地を除去した後、PBS(-) または血清・フェノールレッドを含まない培地を 100 μ l ずつ入れる。



- 96 ウェルマイクロプレートの各ウェルに、Cell Counting Kit-F 溶液を 10 μ l ずつ添加する。



- 室温で、15 ～ 30 分間反応させる。
(開始時間 : ～終了時間 :)

- マイクロプレートリーダーで、蛍光を測定する。

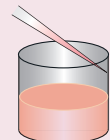
励起波長: 480 ～ 500 nm

蛍光波長: 500 ～ 535 nm



注意点・コツ

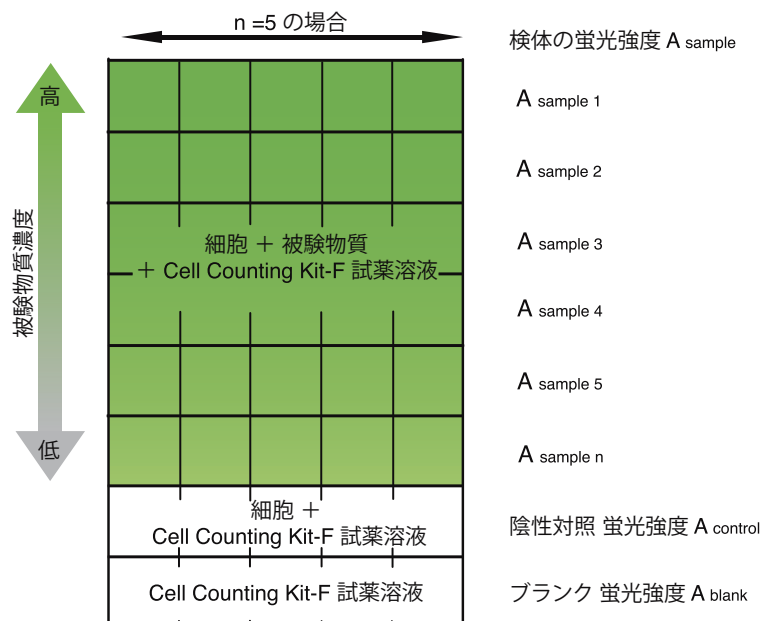
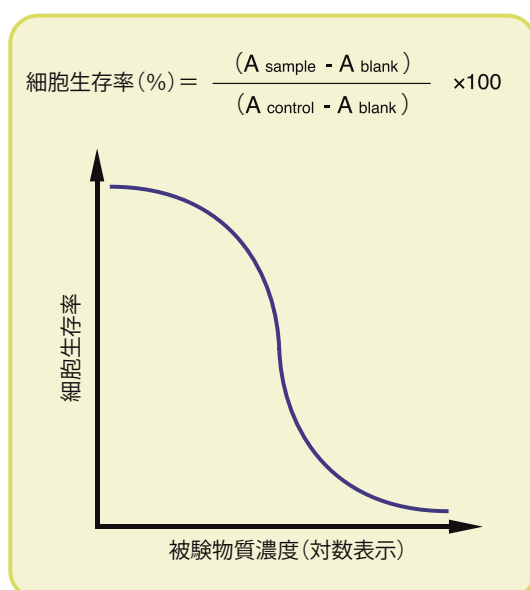
- 96 ウェル以外のプレートやシャーレを用いる場合、培地量の 1/10 量の試薬を加える。
- 試薬の添加量が少ないため、ウェルの側壁にチップの先を当てて加えると良い (下図)。試薬がウェルの側壁に付着した場合、プレートを軽く叩いて培地と混合させる。
- 気泡は、測定値のバラツキの原因となるため、気泡を生じないようにする。



- 浮遊細胞の場合、V 底プレートの溶液を別途用意した平底プレートにマルチピペットを用いて移した後、測定する。

細胞生存率の算出

各ウェルの蛍光強度を下記の式に代入して、細胞生存率を算出する。



トラブルシューティング

トラブル	考えられる原因	解決方法
感度が低い。 (バックが高い)	細胞数が少ない。	細胞種毎に細胞数と蛍光量の関係を測定する（「測定条件の設定」の項に従ってください）。また、細胞の種類により Calcein-AM の細胞膜への透過性が異なります。
	試薬が劣化している。	Cell Counting Kit-F 溶液（Calcein-AM）は、PBS(-) に希釈後、非常に不安定になります。希釈溶液は、用時調製して下さい。
	洗浄が不足している。	血清成分およびフェノールレッドの影響を受けるので、Cell Counting Kit-F 溶液を添加する前に、十分洗浄を行って下さい。
測定値にバラツキが多い。	透明プレートを使用している。	蛍光用の黒色または白色のプレートを使用して下さい。
	培地の水分蒸発により試薬濃度 が変化している。	一番外側のウェルは、水分蒸発が起こりやすいため、測定には利用せず、培地のみを入れて下さい。
	Cell Counting Kit-F 溶液が培地と 混合していない。	プレートの側面を指で軽く叩き、ウェルの内壁に付着している Cell Counting Kit-F 溶液を培地中に落として下さい。プレートを叩く際は、ウェル中の培地が飛び出さない程度にして下さい。
	培地の表面に気泡がある。	シリンジや注射針などの先端で、気泡を除去して下さい。

Q & A

Q : Cell Counting Kit-F に用いられている Calcein-AM (Calcein) は細胞内外において安定ですか？

A : Calcein は細胞内外に関わらず安定ですが、Calcein-AM は不安定です。細胞外に余分な Calcein-AM が残っていると、その一部が分解して蛍光を出し、誤差要因となりますので、洗浄による除去が必要です。また、pH が変動すると蛍光強度に影響を与えますので、pH 条件は一定にしてください。

Q : 通常の透明な培養プレートでも測定出来ますか？

A : 白色または黒色のプレートを使用してください。透明な培養プレートでは測定時の照射した光が散乱してしまい、正確な測定が行えません。正確な測定を行うためにも、白色及び黒色の蛍光用プレートをご使用下さい。

Q : 培養時間を長くすると蛍光はさらに増えますか？

A : 培養時間を長くしてもそれほど蛍光強度は高くなりません。逆に減少していく可能性があります。使用している Calcein-AM は細胞膜に浸透して、細胞内で加水分解され、Calcein となり蛍光を発します。Calcein は細胞内では異物となりますので、細胞外に放出されます。そのため蛍光は徐々に減少していきます。

Q : Cell Counting Kit-F を用いた測定で、血清が入っていると使用できないのはなぜですか？

A : 培地中に血清が存在することにより、細胞外で Calcein-AM の分解が引き起こされます。少ない細胞数からの測定を可能とするために、蛍光ブランクの要因となるものをとり除く必要があります。

Q : 血清、フェノールレッドは前培養段階でも入ってはいけませんか？

A : 前培養の段階であれば、特に問題はありません。Cell Counting Kit-F 添加時の培養液に血清、フェノールレッドが入っていなければ問題ありませんので、添加前に培養液の交換をしてください。

Q : フェノールレッド含有培地の交換ができない場合、他にどのような方法がありますか？

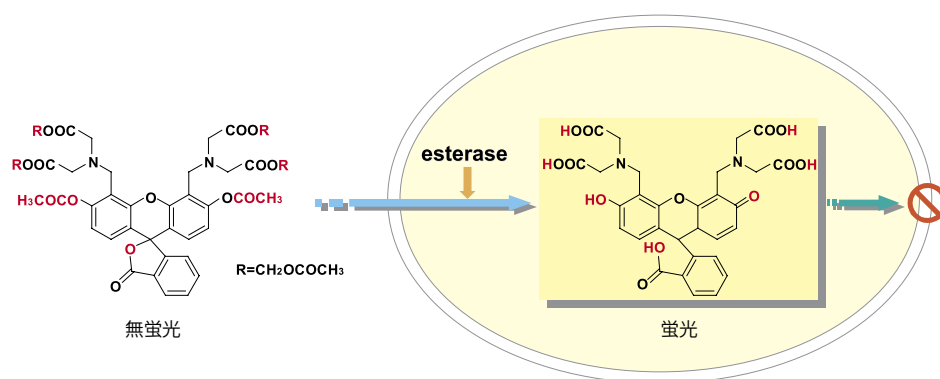
A : Cell Counting Kit-8 をお勧めします。蛍光法と吸光度法の違いがあり、感度は低くなりますが、フェノールレッドを含む培地でも測定できます。

Q : 浮遊細胞でV底プレートを使用するのはなぜですか？

A : 浮遊細胞では遠心して底部に細胞を集約させたり、測定上清を回収するためです。測定では平底プレートを使用してください。

Q : Cell Counting Kit-F の測定原理を教えてください。

A : 分子内にエステル構造を有する Calcein-AM は、細胞膜を透過した後、細胞内の酵素（エステラーゼ）により加水分解されて、蛍光性を示す Calcein を生成します。この蛍光量を測定することで、細胞数を測定することができます。また、加水分解された Calcein は、細胞膜の透過性が低くなり、細胞外に放出されにくくなります。



測定方法の特徴

細胞数の測定には、種々の方法が存在する。
各測定方法において測定原理が異なる場合、生細胞とする指標が違うことから、同じ実験を実施しても得られる結果に差が現れることがある。各測定方法の特徴を理解した上で、研究の目的に適した測定方法を採用することをお勧めする。
ここでは、代表的な測定方法の原理とその用法について紹介する。

酵素・呼吸活性を指標とした測定法

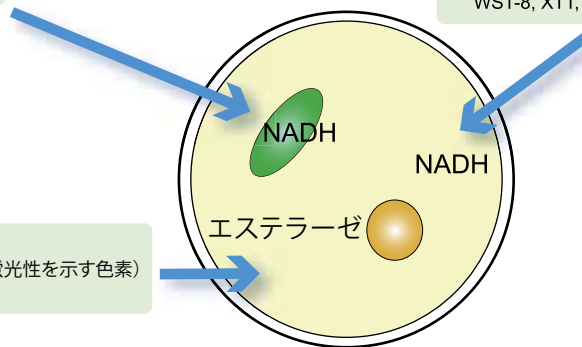
細胞内に存在する種々の酵素活性を指標とした手法である。

- 還元発色試薬や酵素基質部位を有する試薬などを用いた測定方法。
- 操作が簡便なため、マイクロプレートによる多検体処理に適している。
- 細胞増殖測定、毒性試験などの薬物スクリーニング等に利用されている。

ミトコンドリア内脱水素酵素活性を指標とした方法
代表的な試薬 (還元発色色素)
MTT

細胞全体の脱水素酵素活性を指標とした方法
代表的な試薬 (還元発色色素)
WST-8, XTT, MTS

細胞内のエステラーゼ活性を指標とした方法
代表的な試薬 (エステル部位が切断されることで蛍光性を示す色素)
Calcein-AM

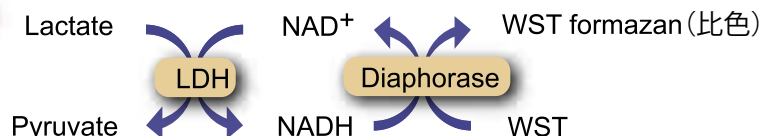
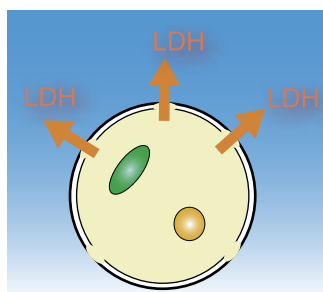


 原理・操作は非常に似ていますが・・・、使用する試薬によって得られる結果が異なる場合があることに注意が必要!

遊離LDH活性測定

細胞膜に損傷を受けた細胞から漏出する乳酸脱水素酵素(LDH)活性を測定する方法。
前述の生細胞数測定法とは異なり、細胞が損傷した死細胞を測定する。

- 生細胞数を測定方法とは指標が違うため、細胞毒性試験などで異なる結果が得られる。
- 細胞膜に損傷を受けた細胞を死細胞とする方法である。
- 試薬の種類により、比色および蛍光の検出方法がある。
- WST法など測定が困難なNK細胞による死細胞測定などに便利である。



細胞内から遊離したLDH活性を測定

 遊離LDH活性測定方法の場合、死細胞の数に応じて吸光度または蛍光強度が増大する。

ヌクレオシド取り込み量測定法

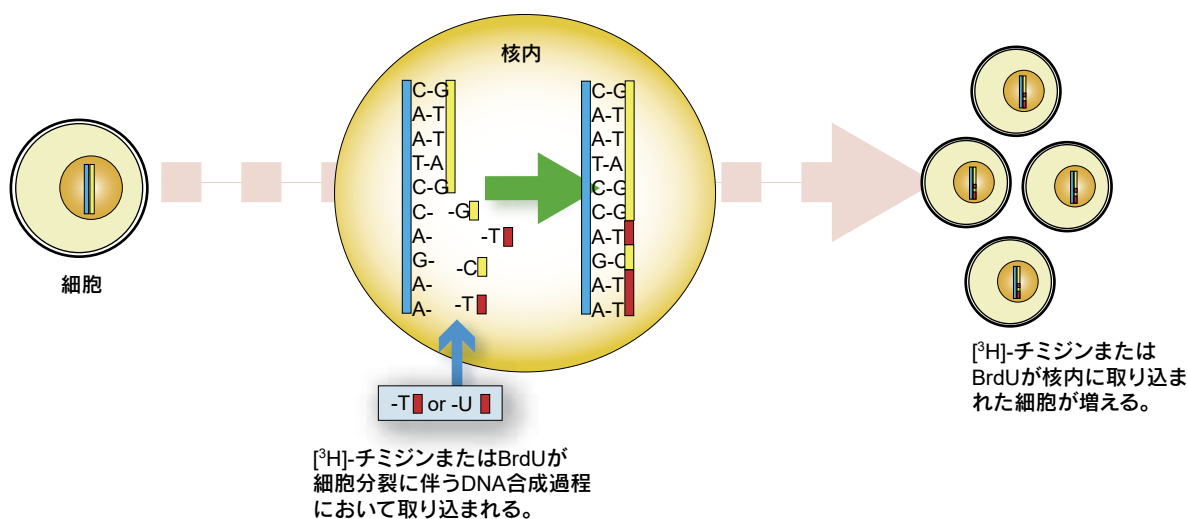
細胞分裂に伴うDNAの複製を、細胞増殖の指標とした手法
検出方法の違いにより、取り込ませるヌクレオシドの種類が異なる。

[³H]-チミジン取り込み法

[³H]-チミジンをDNA複製時に取り込ませた後、放射性物質であるトリチウム量を計測する。
放射性物質のため、高感度な測定が可能であるが、特別な施設にて計測する必要がある。

BrdU取り込み法

BrdUをDNA複製時に取り込ませた後、酵素標識抗BrdUモノクローナル抗体を用いてBrdUを定量する。非ラジオアイソトープ法として普及している。酵素標識抗体を用いるため、細胞を固定化する必要がある。

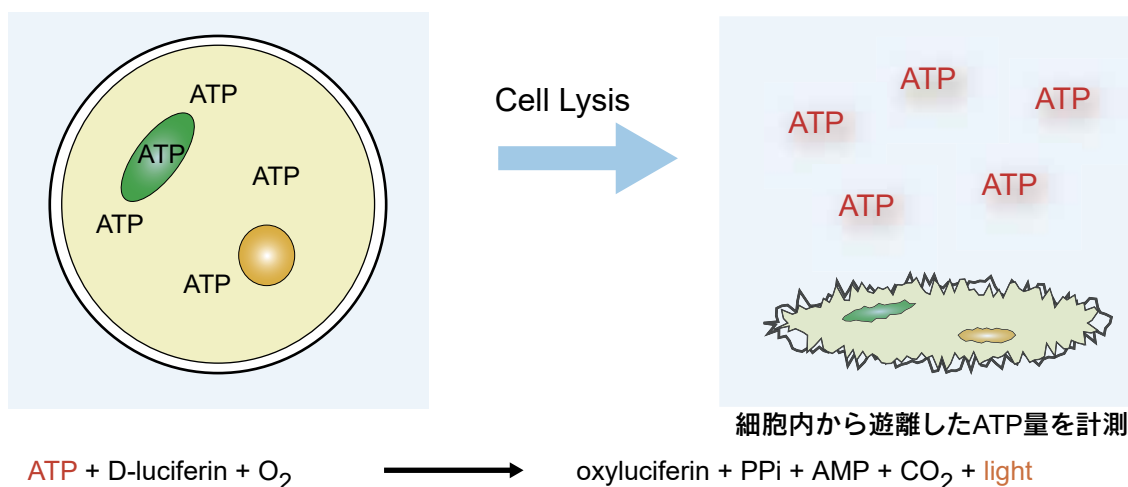


👉 [³H]-チミジン取り込み法とBrdU取り込み法は、基本的な原理が同じため、相関性が高い。

細胞内ATP量測定

細胞内に存在するATP量を指標とした手法である。
ホタルルシフェラーゼによるATP検出法に基づいた発光量を計測する。

- 測定時間が短い(約10分間)。
- 酵素活性を指標とした比色法(MTT法, WST法)や蛍光法(Calcein-AM)に比べて高感度な測定ができる。
- 測定時、ATPを細胞外に出すために細胞膜を破壊する必要がある。
- 発光測定用の検出機器が必要となる。



細胞の染色

はじめに

Calcein-AM、Fluorescein diacetate (FDA) や CFSE 等の蛍光色素は、細胞内に移行後、細胞内エステラーゼにより加水分解を受けることで蛍光性を示す。この性質を利用して、これらの fluorescein 系の色素類は、生細胞を染色する色素として利用できる。

Propidium iodide (PI)、Ethidium bromide (EB) や DAPI など高い水溶性を持つ蛍光色素は、一般的に生細胞の場合は細胞膜を透過せず、死細胞の損傷を受けた細胞膜を透過する。細胞膜を透過した色素は、DNA に結合することで、より強い蛍光を発するようになる。この性質を利用して死細胞染色用の蛍光色素として利用できる。

また、生細胞染色用色素、及び死細胞染色用色素を同時に用いることで、生死細胞を染め分けることも可能である。

- 【用途】
- ・ 蛍光顕微鏡観察
 - ・ フローサイトメトリー
 - ・ 電気泳動（核酸検出）

色素の特徴

対象	色素名	励起波長	蛍光波長	励起フィルター	目視色	特徴
生細胞	BCECF-AM	490 nm	526 nm	B励起	黄緑	細胞内で加水分解して蛍光を発する。
	Calcein-AM	490 nm	515 nm	B励起	黄緑	
	CFSE	496 nm	516 nm	B励起	黄緑	
	CytoRed	535 nm	590 nm	G励起	赤	
	FDA	488 nm	530 nm	B励起	黄緑	
死細胞	DAPI	360 nm	460 nm	U励起	青	死細胞の核酸と結合して蛍光を発する。
	PI	530 nm	620 nm	G励起	赤	
核（生・死細胞）	AO	500 nm	520 nm (dsDNA)	B励起	黄緑	DNAの二本鎖と一本鎖で蛍光特性が異なる。
		420~460 nm	630~650 nm (ssDNA, RNA)	B励起	赤	
	Hoechst 33258	350 nm	461 nm	WU励起	青	生・死細胞の核酸と結合して蛍光を発する。
	Hoechst 33342	352 nm	461 nm	WU励起	青	
ミトコンドリア	MitoRed	560 nm	580 nm	G励起	赤	ミトコンドリアに色素が集積する。
	Rh123	507 nm	529 nm	B励起	黄緑	

細胞を染色したい

準備するもの

装置・器具

- ・炭酸ガスインキュベーター
- ・クリーンベンチ
- ・蛍光顕微鏡
- ・血球計算盤またはセルカウンター
- ・遠心機
- ・スライドガラス、カバーガラス またはチャンバースライド

試薬

生細胞染色用色素

-Cellstain- Calcein-AM	-Cellstain- Calcein-AM solution
-Cellstain- CFSE	-Cellstain- CytoRed solution
-Cellstain- FDA	BCECF-AM

その他

- ・DMSO
- ・滅菌水
- ・PBS(-)

死細胞染色用色素

-Cellstain- DAPI	-Cellstain- DAPI solution
-Cellstain- PI	-Cellstain- PI solution

核染色用色素

-Cellstain- Hoechst 33258	-Cellstain- Hoechst 33342
-Cellstain- AO solution	

ミトコンドリア染色用色素

-Cellstain- MitoRed	-Cellstain- Rh 123
---------------------	--------------------

調製

染色溶液の調製は、試薬の性質によって溶媒などが異なるため、目的の試薬に応じた調製を行う必要がある。また、同じ試薬についても性状（粉末・溶液）が異なる場合があるため、購入した製品に応じて調製を行う。表中の染色溶液の色素濃度は目安である。測定に用いる細胞種や染色条件に応じて、最適化を行う必要がある。

生細胞染色用色素

固体の製品は、**DMSO** を用いて調製してください。

液体の製品は、予め保存溶液の濃度に調製されているため、粉末を秤量する必要がなく飛散による汚染を防ぎやすいため便利です。

製品名	性状	保存方法	分子量	製品形態	保存溶液 (DMSO 使用)	染色溶液
-Cellstain- Calcein-AM	白色～微黄色固体	遮光・冷凍	994.86	1 mg	0.5 - 1mmol/l	
-Cellstain- Calcein-AM solution	無色液体	遮光・冷凍	994.86	1 ml	1mmol/l	1 - 20 µmol/l
-Cellstain- CFSE	白色～微黄色固体	遮光・冷凍	557.64	1 mg	0.5 - 1mmol/l※	(保存溶液を PBS(-) で希釈)
-Cellstain- CytoRed solution	橙黄色液体	遮光・冷凍	313.31	1 ml	1mmol/l	
-Cellstain- FDA	白色結晶	遮光・冷凍	416.38	1 mg	0.5 - 1mmol/l	
BCECF-AM Special packaging	橙色～橙褐色固体	遮光・冷凍	688.59	50 µg x 8	0.5 - 1mmol/l※	

※溶液での保存を避ける。

⚠ PBS(-) に溶解した色素は分解しやすいため、染色溶液は用時調製する。

死細胞染色用色素

固体の製品は、滅菌水を用いて調製してください。

液体の製品は、予め保存溶液の濃度に調製されているため、粉末を秤量する必要がなく飛散による汚染を防ぎやすいため便利です。

製品名	性状	保存方法	分子量	製品形態	保存溶液 (H ₂ O 使用)	染色溶液
-Cellstain- DAPI	黄色固体	遮光・冷凍	350.25	1 mg	1 mg/ml	
-Cellstain- DAPI solution	微黄～黄色液体	遮光・冷蔵	350.25	1 ml	1 mg/ml of Buffer	1 - 10 µg/ml
-Cellstain- PI	赤褐色固体	遮光・冷蔵	668.39	1 mg	1 mg/ml	(保存溶液を PBS(-) で希釈)
-Cellstain- PI solution	橙～赤色液体	遮光・冷凍	668.39	1 ml	1 mg/ml	

⚠ 変異原性物質であるため、手袋・保護眼鏡・マスク等を着用して扱う。万一、皮膚に付着した場合は、直ちに大量の水で洗い流す。

廃棄に関しては、発癌性の恐れがありますので、使用した器具の洗浄液などの廃液は各機関独自の取り扱いガイドラインに従い処理してください。

核染色用色素

固体（粉末）の製品は、滅菌水を用いて調製してください。

液体の製品は、予め保存溶液の濃度に調製されているため、粉末を秤量する必要がなく飛散による汚染を防ぎやすいため便利です。

製品名	性状	保存方法	分子量	製品形態	保存溶液 (H ₂ O 使用)	染色溶液
-Cellstain- AO solution	橙～黄色液体	遮光・冷凍	301.81	1 ml	1 mg/ml	1 - 10 µg/ml
-Cellstain- Hoechst 33258 solution	黄色液体	遮光・冷蔵	533.88	1 ml	1 mg/ml	(保存溶液を PBS(-) で希釈)
-Cellstain- Hoechst 33342 solution	黄色液体	遮光・冷蔵	561.93	1 ml	1 mg/ml	

⚠ 変異原性物質であるため、手袋・保護眼鏡・マスク等を着用して扱う。万一、皮膚に付着した場合は、直ちに大量の水で洗い流す。

廃棄に関しては、発癌性の恐れがありますので、使用した器具の洗浄液などの廃液は各機関独自の取り扱いガイドラインに従い処理してください。

ミトコンドリア染色用色素

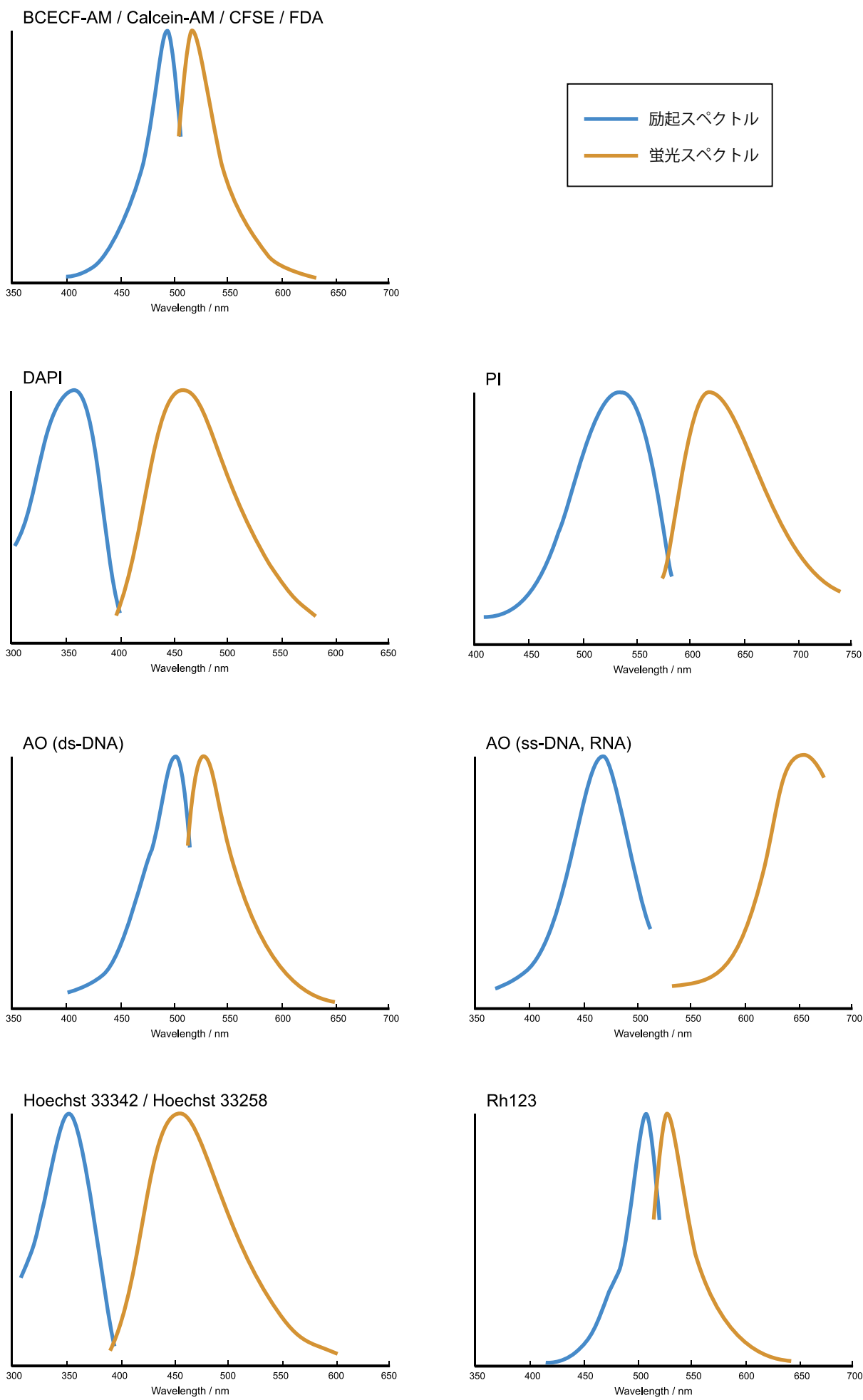
DMSO を用いて調製してください。

製品名	性状	保存方法	分子量	製品形態	保存溶液 (DMSO 使用)	染色溶液
-Cellstain- MitoRed	紫褐～赤紫色固体	遮光・冷蔵	637.17	50 µg × 8	1 mmol/l ※	20 - 200 nmol/l
-Cellstain- Rh 123	赤～赤褐色粉末	遮光・冷蔵	380.82	1 mg	1 mg/ml	20 - 100 nmol/l

※溶液での保存を避ける。

⚠ 生細胞のミトコンドリアを染色する。死細胞は染色されない。

各色素の励起・蛍光スペクトル



染色方法

細胞を染色する際には、実験の目的に応じた染色をする必要があります。また、目的に応じて細胞密度や試薬濃度、インキュベーション時間などについて、詳細な条件を検討する必要もあります。下記に一般的に行われている染色方法として3つの染色方法をご紹介します。

1. 培養プレート上で生細胞、死細胞を観察

色素：生細胞染色用色素、死細胞染色色素、核染色色素全て使用可。

用途：培養プレート上で、付着細胞の形態を維持したまま観察。

2. プレパラート上で生細胞、死細胞を観察

色素：生細胞染色用色素、死細胞染色色素、核染色色素全て使用可。

用途：浮遊細胞の観察。

プレパラート上で高倍率観察が可能。

3. 細胞を固定化し観察

色素：核染色用色素、死細胞染色色素が使用可。生細胞染色色素は、使用不可。

用途：免疫染色時の核染色。

核染色用色素、死細胞染色色素の何れを用いても、全細胞が染色される。

1. 培養プレート上で生細胞、死細胞を観察

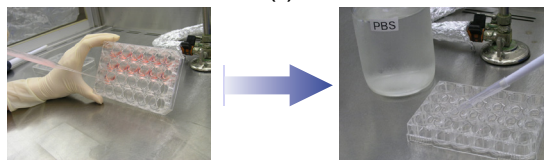
操作

注意点・コツ

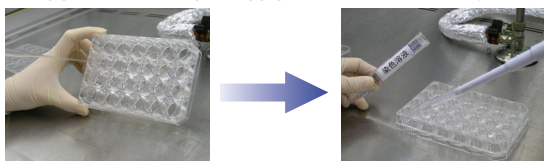
- ・測定対象の細胞 $10^4 \sim 10^5$ cells を 24 ウェルマイクロプレートへ播種し 24 時間培養する。



- ・増殖培地を除去して、各ウェルへ PBS(-) 1 ml を添加する。

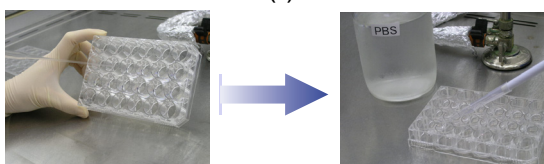


- ・PBS(-) を除去して、各ウェルへ染色溶液 0.2 ml を添加する。



- ・遮光下にて、37℃で 15 ～ 30 分間インキュベートする。

- ・染色溶液を除去して、各ウェルに PBS(-) 0.5 ml を添加する。



- ・蛍光顕微鏡にて蛍光染色像を観察する。

- ・シャーレ又はマイクロプレート上で細胞密度が 30 ～ 50% コンフルエントになるよう細胞数をコントロールする。
- ・血球計算盤やセルカウンターなどを用いて細胞数を計測する。
- ・ガラスボトムプレートを用いると、高倍率かつ鮮明な画像を取得できる。

- ・最適な蛍光染色像を得るために、細胞種に応じて試薬濃度や染色時間の検討が必要である。
- ・生細胞染色試薬の場合、培地中に含まれるエステラーゼが残存すると、各色素のエステル部位が切断されて蛍光性を示す。これは、バックグラウンド上昇の原因となるため、必要に応じて数回洗浄を行う。

2. プレパレート上で生細胞、死細胞を観察

操作

注意点・コツ

- ・測定対象の細胞を培養用フラスコから回収して、細胞懸濁液を準備する。



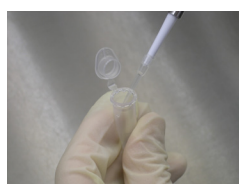
- ・細胞懸濁液を遠心分離する（1,000 rpm, 3 分間）。



- ・上清の培地を除去して、PBS(-) を添加する。
この際、細胞数が、 $10^5 \sim 10^6$ cells/ml となるよう調整する。



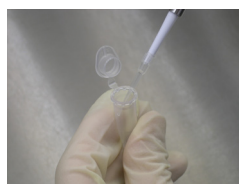
- ・マイクロチューブに細胞懸濁液 30 μ l を添加する。



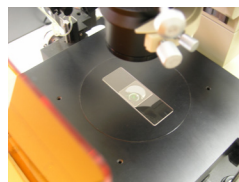
- ・これに染色溶液 15 μ l を添加する。

- ・遮光下にて、37℃で 15 ～ 30 分間インキュベートする。

- ・スライドガラスの上に細胞染色液 10 μ l を滴下し、これにカバーガラスを重ねる。



- ・蛍光顕微鏡にて蛍光染色像を観察する。



- ・付着性細胞の場合、トリプシン処理やセルスクレイパー等により回収する。

- ・生細胞染色試薬の場合、培地中に含まれるエステラーゼが残存すると、各色素のエステル部位が切断されて蛍光性を示す。これは、バックグラウンド上昇の原因となるため、必要に応じて数回洗浄を行う。
- ・血球計算盤やセルカウンターなどを用いて計測する。

- ・細胞にダメージを与えないように、ピペティングは穏やかに行う。

- ・最適な蛍光染色像を得るために、細胞種に応じて試薬濃度や染色時間の検討が必要である。

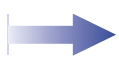
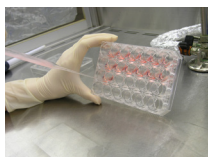
3. 細胞を固定化し観察

操作

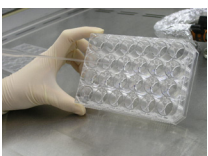
- ・ 測定対象の細胞 $10^4 \sim 10^5$ cells を 24 ウェルマイクロプレートへ播種し 24 時間培養する。



- ・ 増殖培地を除去して、各ウェルへ PBS(-)1 ml を添加する。

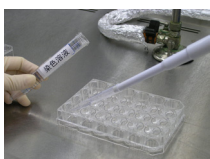


- ・ PBS(-) を除去して、70%EtOH 1.0 ml を細胞へ添加する。

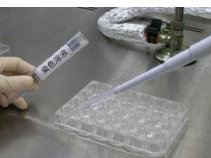
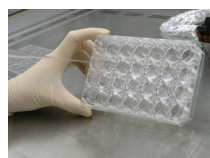


- ・ 室温にて 15 分間インキュベートする。

- ・ 70%EtOH 溶液を除去して、PBS(-)1 ml を添加する。

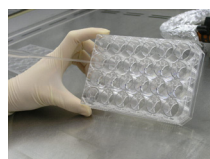


- ・ PBS(-) を除去して、各ウェルへ染色溶液 0.2 ml を添加する。



- ・ 遮光下にて、37℃で 15 ～ 30 分間インキュベートする。

- ・ 染色溶液を除去して、各ウェルに PBS(-)0.5 ml を添加する。



- ・ 蛍光顕微鏡にて蛍光染色像を観察する。

注意点・コツ

- ・ シャーレ又はマイクロプレート上で細胞密度が 30 ～ 50% コンフルエントになるよう細胞数をコントロールする。
- ・ 血球計算盤やセルカウンターなどを用いて細胞数を計測する。
- ・ ガラスボトムプレートを用いると、高倍率かつ鮮明画像を取得できる。
- ・ 固定溶液として、70-100% EtOH や 100% MeOH が一般的に使われる。また、細胞内分子を維持するために、-20℃に冷却したアルコールを用い、-20℃下で染色する場合もある。
- ・ 最適な蛍光染色像を得るために、細胞種に応じて試薬濃度や染色時間の検討が必要である。

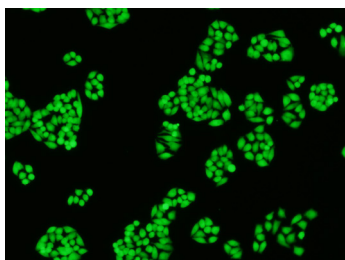
実験例

培養細胞を用いた蛍光染色例 - 1

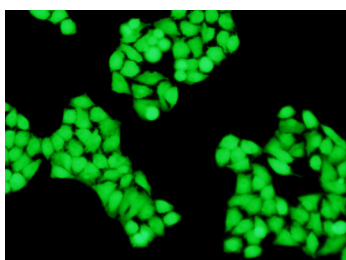
HeLa 細胞を用いて、『1. 培養プレート上で生細胞、死細胞を観察』に示した方法に従い、生細胞を各色素にて染色した。

生細胞染色試薬

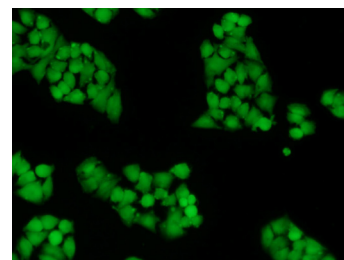
細胞内の加水分解により蛍光を発する色素による染色



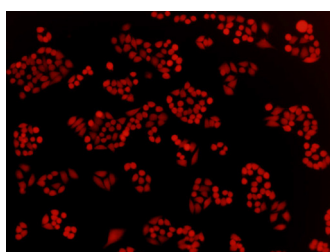
BCECF-AM (x200, B 励起)



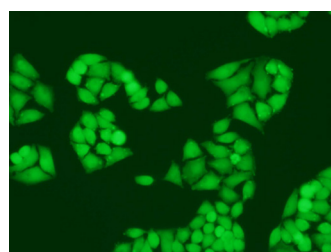
Calcein-AM (x400, B 励起)



CFSE (x400, B 励起)



CytoRed (x200, G 励起)

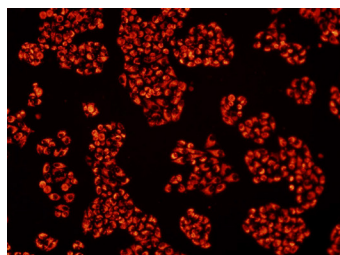


FDA (x400, B 励起)

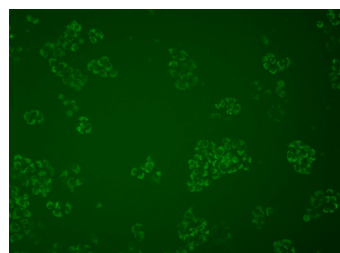
ミトコンドリア染色試薬

ミトコンドリア集積能を持った色素による染色
蛍光像

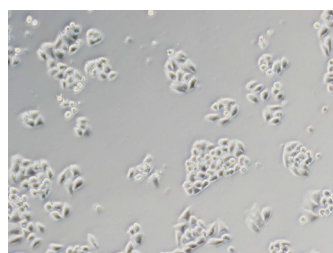
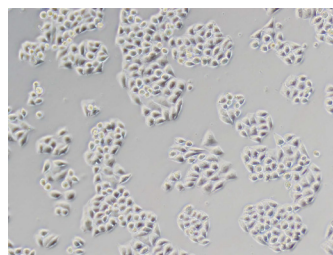
MitoRed
(x200, G 励起)



Rh123
(x200, B 励起)

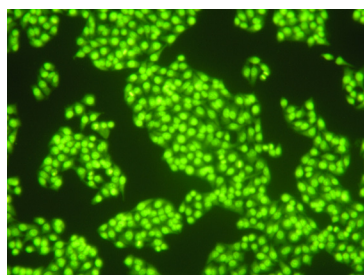


位相差像

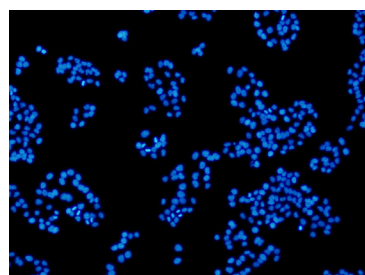


核染色用色素

生細胞・死細胞の核に結合し蛍光を発する色素による染色



AO (x200, B 励起)



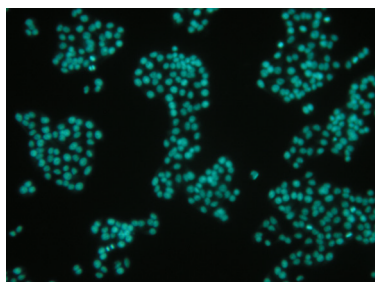
Hoechst 33258 (x200, U 励起)

培養細胞を用いた蛍光染色例 -2

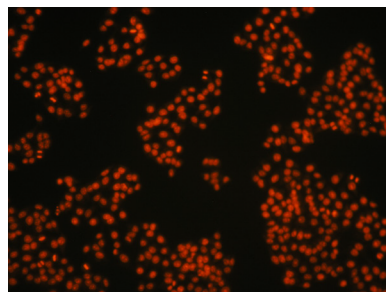
HeLa 細胞を用いて、『3. 細胞を固定化し観察』に示した方法に従い、細胞を固定化後に核染色試薬にて全細胞の核を染色した。

死細胞染色用試薬

死細胞選択性のある核染色用色素を用い、固定化した全細胞を染色

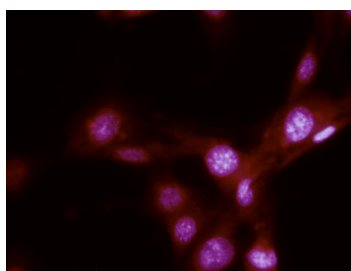


DAPI (x 200, U 励起)



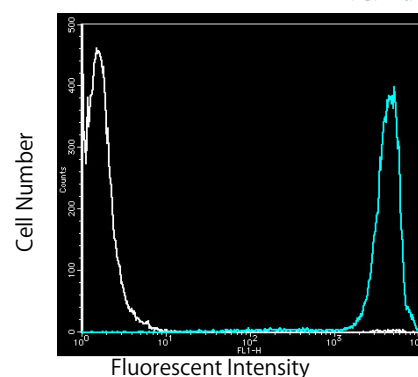
PI (x 200, G 励起)

培養細胞を用いた蛍光染色例 -3



3% グルタルアルデヒドで固定化した NIH3T3 細胞を核染色試薬 Hoechst 33258 を用いて染色した。また、アクチンフィラメントをビオチン標識ファロイジンおよび HyLite Fluor™555 標識抗ビオチン抗体を用いて二重染色した。

フローサイトメトリー測定例



HL60 細胞を生細胞染色用色素 Calcein-AM を用いて染色した後、フローサイトメトリー（488nm 励起）にて測定した。未染色の細胞（白線）に対して、染色後の生細胞は蛍光強度が増大した（青線）。

* 参考 *

細胞の固定化法

核染色色素は、低分子かつ染色対象の核酸が安定であることから、一般的な固定化方法であれば何れの方法を用いても染色は可能である。しかし、免疫染色などのようにターゲット（抗原など）分子がタンパクや低分子、未確認物質である場合には、最適な固定化法を選択する必要がある。

①アルコール固定

脱水および脂質溶解により、細胞内のタンパクを凝固させ、同時に細胞膜の脱脂により膜透過性をもたせる。アルデヒド固定法に比べ、抗原性の維持に優れているが、固定化後は細胞膜が収縮硬化するため細胞の微細構造や膜構造への影響が大きい。固定化時は、エタノール又はメタノールにて固定化後、更に膜透過性を上げる際は 0.5%Triton X-100 処理を行う。

②ホルムアルデヒド固定

アルデヒド基をもった化学物質は、タンパク中のアミノ基と結合し、さらに架橋反応を起こすことにより細胞内の組織を固定化することができる。アルコール固定法に比べ、細胞の形態維持に優れているが、架橋形成により抗原性や酵素活性が失われる場合がある。一般的には、3～4% パラホルムアルデヒドが用いられ、細胞内を固定化後は、膜に透過性を持たせるために 0.5%Triton X-100 処理を行う。

生細胞と死細胞を染め分けたい

はじめに

- **Cellstain** - Double Staining Kit (セルステイン 細胞二重染色キット) は、生細胞染色用蛍光色素 Calcein-AM と、死細胞染色用蛍光色素 PI (Propidium Iodide) を組み合わせたもので、生細胞及び死細胞を同時に染色することができます。

準備するもの

装置・器具

- ・炭酸ガスインキュベーター
- ・クリーンベンチ
- ・蛍光顕微鏡
- ・血球計算盤またはセルカウンター
- ・スライドガラス、カバーガラス
- ・マイクロピペット

試薬

- Cellstain - Double Staining Kit [同仁品コード：CS 01]

(キット内容)

A 液 : Calcein-AM stock solution (1 mmol/l)	4 vials
B 液 : PI stock solution (1.5 mmol/l)	1 vial

⚠ キットは密閉して、-20℃以下で遮光、冷凍保存する。

A 液 (Calcein-AM) は水分により加水分解する恐れがあるため、吸湿しないように注意する。

- ・ PBS(-)

調製

- ・ 染色溶液

A 液および B 液を室温に戻す。

5 ml の PBS(-) に、A 液 10 μ l と B 液 15 μ l を加えて混合する。

染色溶液中の試薬濃度

Calcein-AM: 2 μ mol/l, PI: 4 μ mol/l

⚠ 染色溶液は用時調製すること。

PI は変異原性物質の疑いがあるため、手袋・保護眼鏡・マスク等を着用して扱う。

万一、皮膚に付着した場合は、直ちに大量の水で洗い流す。

廃棄に関しては、発癌性の恐れがありますので、使用した器具の洗浄液などの廃液は各機関独自の取り扱いガイドラインに従い処理してください。

染色操作（蛍光顕微鏡観察用サンプルの調製）

HeLa 細胞を用いた場合の染色操作を示す。染色条件は、細胞の種類・濃度などの条件により変化するため、注意が必要である。条件に応じて、細胞の固定化や試薬濃度の調整など最適化が必要である。

操作

- ・測定対象の細胞を培養用フラスコから回収して、細胞懸濁液を準備する。

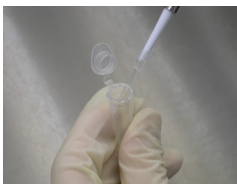


- ・細胞懸濁液を遠心分離する（1,000 rpm, 3 分間）。



- ・上清の培地を除去して、PBS(-) を添加する。
この際、細胞数が、 $10^5 \sim 10^6$ cells/ml となるように調製する。

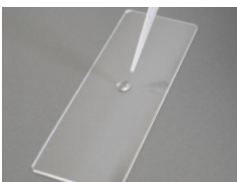
- ・マイクロチューブに細胞懸濁液 200 μ l を添加する。



- ・これに染色溶液 100 μ l を添加する。

- ・遮光下にて、37℃で 15 ～ 30 分間インキュベートする。

- ・スライドガラスの上に細胞染色液 10 μ l を滴下し、これにカバーガラスを重ねる。



注意点・コツ

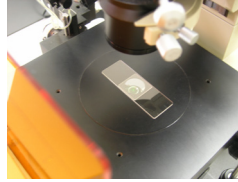
- ・付着性細胞の場合、トリプシン処理やセルスクレイパー等により回収する。

- ・生細胞染色試薬の場合、培地中に含まれるエステラーゼが残存すると、各色素のエステル部位が切断されて蛍光性を示す。これは、バックグラウンド上昇の原因となるため、必要に応じて数回洗浄を行う。
- ・血球計算盤やセルカウンターなどを用いて計測する。

- ・細胞にダメージを与えないように、ピペッティングは穏やかに行う。

- ・最適な蛍光染色像を得るために、細胞種に応じて試薬濃度や染色時間を調整する検討が必要である。

- ・ 蛍光顕微鏡にて蛍光染色像を観察する。



- ・ 490±10 nm の励起フィルターを用いることで、黄緑色に染色された生細胞が観察される。また、赤色に染色された死細胞も同時に観察することができる。
- ・ 545 nm の励起フィルターを用いると、赤色に染色された死細胞のみを蛍光観察することができる。

色素の最適濃度

Calcein-AM 及び PI の最適濃度は、細胞種に依存するため、染色する細胞毎に最適色素濃度を求める必要がある。以下の操作により、細胞毎の最適濃度を求めることを勧める。

① PI の最適濃度

目的の細胞を、0.1 ~ 10 $\mu\text{mol/l}$ の PI 溶液を用いて染色し、細胞質を染めることなく核のみを赤色に染色する濃度域を目安とする。

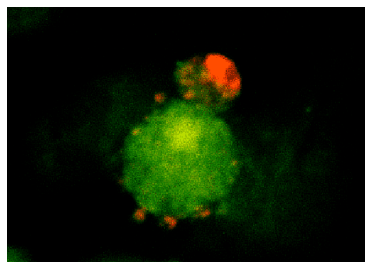
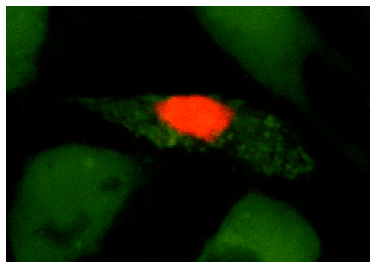
必要に応じて染色前に、以下に示した何れかの固定処理を行うとよい。

- ・ 0.1% サポニンまたは 0.1 ~ 0.5% ジギトニンで 10 分間処理する。
- ・ 70% エタノールで 30 分間処理する。

② Calcein-AM の最適濃度

①の死細胞を使用して、0.1 ~ 10 $\mu\text{mol/l}$ の Calcein-AM 溶液を用いて染色し、死細胞の細胞質を染色しない濃度域を決定する。次に、生細胞を用いて、その濃度域で細胞が十分染色されることを確認する。染色が十分に行われない場合は、Calcein-AM の濃度を上げていくことで最適濃度を決定する。

実験例



-Cellstain- Double Staining Kit を使用した二重染色例

MHD-1 細胞を用いた二重染色像 (480 nm 励起フィルター使用)
[写真提供] 広島大学医学部 山本正夫先生

トラブルシューティング

トラブル	考えられる原因	解決方法
細胞が上手く染まらない。	色素を長期間保存していた。	長期間保存すると、色素は劣化します。長期保存を避け、長期保存していた色素は使用しない。
	(生細胞染色色素の場合) PBS で希釈した染色溶液を保存し、その溶液を使用した。	生細胞染色色素は水溶液に希釈後、非常に不安定になります。 希釈溶液は、用時調製して下さい。
	色素を直射日光に当てた。	直射日光により色素は劣化します。直射日光を避けて保存して下さい。
色素が細胞に取り込まれない。	使用している細胞の種類が、色素を取り込み難いものである。	試薬濃度を高くして下さい。界面活性剤 (Pluronic F-127 [®]) を使用する方法もあります。
	細胞に対して試薬量が少ない。	試薬濃度を高くして下さい。
細胞から色素が漏れてしまう。	細胞は自分にとって余計なものである色素を自然に排出する機能があるため。	出来るだけ早く観察して下さい。 陰イオントランスポーター阻害剤 (Probenecid) を使用する方法、または、細胞の膜に結合する -Cellstain-CFSE を使用する方法があります。
細胞に色素が取り込まれているのに、見えない。	使用しているフィルター (励起・蛍光) 及び光源が違う。	使用しているフィルターの波長および光源が色素とあっているか、確認して下さい。
	色素の排出が早く起きている。	取り込み後、出来るだけ早く観察して下さい。
色素が上手く溶けない。	色素が劣化している。	既定の調製量で溶解していても溶け残りが生じる場合は、色素が劣化している可能性があります。 保管期間が著しく長いものや、所定の条件で保存していなかった場合は、色素全体が分解することがありますので、再調製して下さい。
	溶かす溶媒を間違えている。	使用する溶媒を染色溶液調製の項目で確認して下さい。 それ以外の溶媒では、色素が劣化したり、溶けない可能性があります。
色素が溶けているかどうか分からない。	溶かす濃度を間違えている。	溶かす溶媒を調製の項目で確認して下さい。色素が完全に溶解すると、溶液は透き通った状態に見えます。濁りがある場合は、溶け残りの可能性があります。
	色素が完全に溶けていない。	1mg の粉末製品は遠心濃縮で小分けを行っている為、チューブの底にフィルム上に固まっております。ボルテックスミキサーや超音波照射で十分混合して下さい。

Q & A

生細胞染色試薬

Q: 粉末で購入した場合、何に溶解すれば良いですか？

A: DMSO に溶解してください。開封後時間がたった DMSO には、空気中の水分が溶け込んでいることがあります。生細胞染色試薬は水分で劣化しますので、DMSO は出来るだけ未開封のものをご使用ください。

Q: 生細胞染色試薬の中で細胞内に長く留まるのはどれですか？

A: CFSE が比較的細胞の中に長くとどまることが出来ます。論文では、8 週間細胞の中に蛍光色素が残っていることが確認されています。また、Calcein-AM、BCECF-AM では、3 日間細胞中での蛍光が観察されています。詳細は下記の文献を参照してください。

ES. A. Weston, *et al.*, *J. Immunol. Methods*, **1990**, 133, 87.

EH. P. Zhong, *et al.*, *Hum. Immunol.*, **1993**, 37, 264.

Q: 生細胞染色試薬の中で細胞障害活性が低いのはどれですか？

A: Calcein-AM、BCECF-AM は、細胞への影響が低いと言われております。詳細は下記の文献を参照してください。

EL. S. D. Clerck, *et al.*, *J. Immunol. Methods*, **1994**, 172, 115.

Q: 生細胞染色色素の特徴は？

A: 製品ごとの特徴は下記の通りです。

BCECF-AM : 元々細胞内の pH を測定する試薬として利用されていたものであり、生細胞を染色する色素としても利用されます。

Calcein-AM : 細胞機能への影響が一番少ないといわれています。

C F S E : 細胞内に導入後、細胞質内（細胞膜）のアミノ基と結合するため他の色素に比べ細胞外への漏出が少ないといわれています。

CytoRed : 小社にて開発した化合物で、Calcein-AM よりも高い蛍光強度を示します。

F D A : 一番古くから知られている色素ですが、細胞からの漏出が早いといわれています。

Q: 色素の細胞毒性について報告されている論文はありますか？

A: Calcein-AM、BCECF-AM、CFDA、CFSE が細胞に与える障害活性を比較した論文がありますので参照してください。

L. S. D. Clerck, *et al.*, *J. Immunol. Methods*, **1994**, 172, 115.

Q: 細菌の染色をしたいのですが、どの色素を使えば可能でしょうか？

A: 細菌は、細胞壁を持つため、その細胞壁を通過できない色素が多くあります。例えば、Calcein-AM や BCECF-AM は細胞膜は通過しますが、細胞壁は通過できません。細菌の染色目的に使用できる色素としては、AO がマラリア原虫の染色として使われています。死菌の場合には、PI、EB、DAPI など使用できます。生菌の場合には、FDA を使用した報告があります。詳細は下記の文献を参照してください。

Appl. Microbiol. Biotechnol., **1992**, 38, 268.

Q & A

核染色試薬 (生・死細胞)

Q: 核染色に使用される色素の違いは何ですか？

A: 蛍光波長以外の違いは以下の点があります。

A O : 2 重鎖にインターカレーションしたときと、単鎖のリン酸に結合したときでは蛍光波長が異なることを利用して、2 重鎖と単鎖を区別して検出できます。生細胞の細胞膜を透過します。

Hoechst 33258、Hoechst 33342 :

基本的には DNA のアデニン - チミジン部に特異的に結合します。

生細胞の膜を透過し、生細胞の DNA も染色できる色素です。膜の透過率は「Hoechst33342」のほうが若干高いと言われています。

Q: 使用後の廃液の処理方法を教えてください。

A: 核染色試薬は、発癌性の恐れがあります。使用した器具の洗浄液などの廃液は各機関独自の取り扱いガイドラインに従い処理してください。あるいは下記処理方法を参考にして分解後廃棄してください。

- ・ UV 照射や日光にさらし分解する。
- ・ 次亜塩素酸ナトリウムにより酸化分解後、中和処理する。

核染色試薬 (死細胞)

Q: 核染色に使用される色素の違いは何ですか？

A: 蛍光波長以外の違いは以下の点があります。

P I : 塩基特異性はありませんが、インターカレーションした時の蛍光強度が高いため、広く使用される色素です。

DAPI : 2 重鎖の副溝 (minor groove) と結合、アデニン - チミジン配列に高い結合性を持っています。

ミトコンドリア染色試薬

Q: MitoRed と Rh123 はなぜミトコンドリア染色用なのですか？

A: MitoRed、Rh123 はともに Rhodamine (ローダミン) と呼ばれる化学構造を有しています。この Rhodamine は 細胞の中に入ると、ミトコンドリアに集積していく特性があるためミトコンドリア染色色素として使用されます。多量に細胞内に導入すると他の部分も染色されてしまいますので、濃度をご検討の上適量をご使用ください。

Q & A

-Cellstain- Double Staining Kit

Q: どのような原理で細胞は染色されるのですか？

A: 生細胞を Calcein-AM が、死細胞を PI が染色します。Calcein-AM は、蛍光色素 Calcein の四つのカルボキシル基をアセトキシメチル (AM) 化して脂溶性を高め細胞膜透過性としたものです。Calcein-AM 自体は蛍光を示しませんが、生細胞の細胞膜を透過して細胞内に入ると、細胞内各種エステラーゼにより AM 基が加水分解されて黄緑色の強い蛍光を示します。一方、PI は核酸染色色素の一つで、細胞膜が破壊されている死細胞内に入り込み、細胞内の DNA の二重らせん構造にインターカレートすることにより特有の強い赤色蛍光を示します。PI は生細胞の細胞膜を通過しません。この作用の異なる二つの色素を用いることにより、生細胞は黄緑色に、死細胞は赤色に染め分けることができます。

Q: 蛍光観察するときの波長について教えてください。

A: 490 ± 10 nm の波長で励起して観察すると、黄緑色に染色された生細胞、及び赤色に染色した死細胞を同時に観察することが出来ます。更に 545 nm の波長で励起することにより赤色に染色した死細胞だけを観察することができます。

Q: 全ての細胞に対して染色は可能でしょうか？

A: 基本的には、エステラーゼ活性を持つ動物細胞です。植物は細胞壁があるため、Calcein-AM での染色は原理的に難しいです。細胞壁を除いたプロトプラストであれば、染色は可能です。

Q: 動物細胞であれば、どの細胞にも一定の濃度の色素で染色できるのでしょうか？

A: どの細胞にも一定という訳ではありません。使用する Calcein-AM 及び PI の最適濃度は、細胞の種類に大きく依存します。使用する細胞毎に最適色素濃度を求めるようにしてください。方法は本書 33 ページを参照してください。

Q: Calcein-AM 自体に細胞毒性はありませんか？

A: Calcein-AM の細胞毒性は、他の細胞染色色素に比べ非常に低いと報告されております。
詳細は、下記の文献を参照してください。
L. S. D. Clerck, *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 1994. 172, 115.

Q: キットの保存方法について教えてください。

A: 密封して -20℃以下で保存してください。Calcein-AM は水分により加水分解する恐れがありますので、吸湿しないようにして下さい。緩衝液や培養液などに希釈した染色溶液は、用時調製してください。PI 溶液は -20℃保存で 1 年間安定です。

Q: 使用後の廃液の処理方法を教えてください。

A: PI は発癌性の恐れがあります。使用した器具の洗浄液などの廃液は各機関独自の取り扱いガイドラインに従い処理してください。



株式会社 同仁化学研究所

〒861-2202 熊本県上益城郡益城町田原 2025-5

熊本テクノ・リサーチパーク

URL: <https://www.dojindo.co.jp/>

ドージン・イースト

〒105-0012 東京都港区芝大門2-1-7朝川ビル7F

初 版第1刷 2007年10月 1日発行
初 版第2刷 2008年 3月11日発行
第2版第1刷 2008年12月15日発行
第2版第4刷 2012年10月 1日発行
第3版第1刷 2017年 6月25日発行
第4版第1刷 2023年10月30日発行