

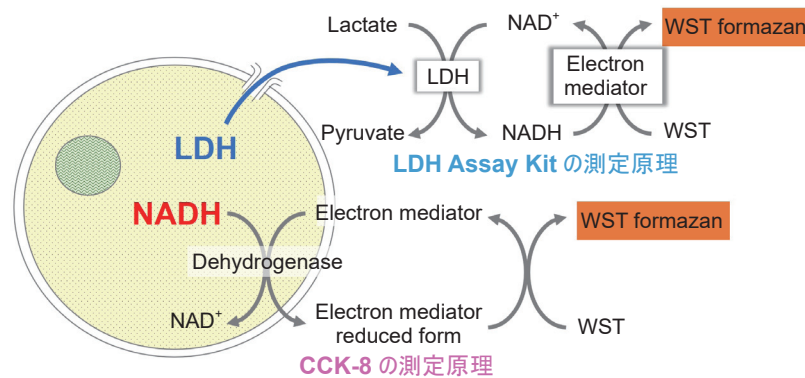
# Viability/Cytotoxicity Multiplex Assay Kit

## Technical Manual

### はじめに

細胞毒性評価として、生存細胞数を指標とする方法または死細胞数を指標とする方法が汎用されています。近年、複数の指標を用いて評価することにより細胞毒性を総合的に判断するケースが増えてきています。Viability/Cytotoxicity Multiplex Assay Kitは、生存細胞数を指標とする Cell Counting Kit-8 (CCK-8)と、死細胞数を指標とする Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST (LDH Assay Kit)を組合せたキットです。

CCK-8は生細胞内の脱水素酵素活性を、一方 LDH Assay Kitは細胞膜の傷害により細胞外へ漏れ出てきた乳酸脱水素酵素 (LDH)を指標とすることで、前者は生存細胞数を後者は死細胞数を算出します。LDH Assay Kitは細胞培養液に直接試薬を加えて測定するホモジニアスアッセイ、又は培養上清を用いて測定するノンホモジニアスアッセイが可能です。CCK-8とLDH Assay Kitのノンホモジニアスアッセイを組合せることで、同じ培養細胞を用いて二つの指標で細胞毒性評価を行うことができます。



### キット内容

	コード	容量	コンポーネント	
Cell Counting Kit-8	CK04	500 tests	Cell Counting Kit-8	5 ml × 1
Cytotoxicity LDH Assay Kit	CK12	500 tests	Dye Mixture	× 1
			Assay Buffer	55 ml × 1
			Lysis Buffer	5.5 ml × 1
			Stop Solution	27.5 ml × 1

### 保存条件

0 ~ 5 °Cで保存してください。

### 必要なもの (キット以外)

- プレートリーダー (450 nm 及び 490 nm の吸光フィルター)
- CO<sub>2</sub> インキュベーター
- 20 µl および 100 - 200 µl 8 チャンネルピペット
- 細胞培養用 96 穴マイクロプレート
- \*LDH 測定時、ホモジニアスアッセイでは付着細胞も浮遊細胞も平底プレートを使用しますが、浮遊細胞をノンホモジニアスアッセイで評価する場合は遠心操作が必要になるため、丸底またはV底プレートをご用意ください。
- 測定用 96 穴平底マイクロプレート (LDH Assay Kit のノンホモジニアスアッセイ時にのみ必要)

### 使用上のご注意

- 細胞種により最適条件が異なります。初めて測定を行う際は、予備実験に従い、最適条件 (細胞数、インキュベーション時間等) をご確認ください。

#### CCK-8 を用いた生存細胞の評価

- ・ 予備実験 P. 2
- ・ 生存細胞評価 P. 2

#### LDH Assay Kit を用いた死細胞の評価

- ホモジニアスアッセイ
- ・ 予備実験 P. 3
  - ・ 死細胞評価 P. 4

- ノンホモジニアスアッセイ
- ・ 予備実験 P. 4
  - ・ 死細胞評価 P. 5

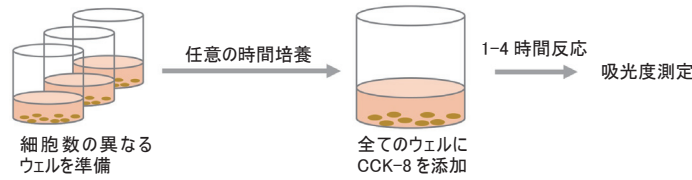
#### 同じ培養細胞を用いた生存細胞および死細胞の評価

- ・ 実験例 P. 6

- 段階希釈法 P. 6

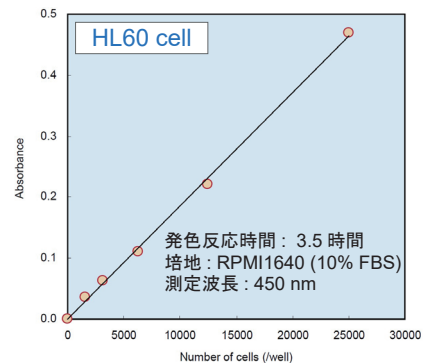
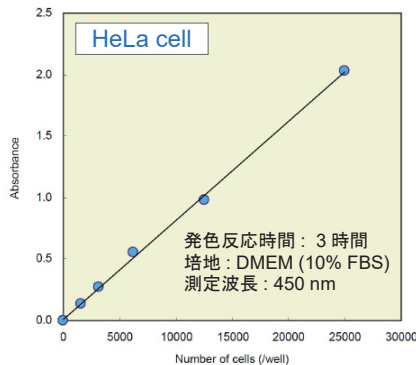
予備実験

予備実験では、最適な細胞数と発色反応時間を確認します。被験物質を添加しない状態の細胞（コントロール細胞）を使用してください。

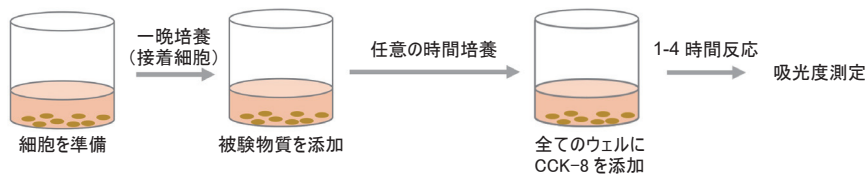


1. 対数増殖期にある細胞の懸濁液  $5 \times 10^5$  cells/ml を準備する。
2. 96 ウェルマイクロプレート上で段階希釈法 (P. 6 参照) により細胞数の異なる細胞懸濁液 (100  $\mu$ l) を調製する。
3. CO<sub>2</sub> インキュベーター内で任意の時間培養する。
4. CCK-8 溶液を各ウェルに 10  $\mu$ l ずつ添加する。
  - \* 気泡は測定値のバラツキの原因となるので、気泡を生じないように添加する。
5. CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 1 - 4 時間呈色反応を行う。
  - \* 発色量は細胞種や細胞数により異なります。CCK-8 添加後は 1 時間毎に吸光度を測定し、下記の吸光度の目安を参考に必要な細胞数とインキュベーション時間を決定する。
    - 細胞毒性評価時：1.0 - 1.5
    - 細胞増殖評価時：0.3 - 0.8
6. マイクロプレートリーダーにて吸光度を測定する。(フィルター：450 - 490 nm)

<実験例：細胞数毎の吸光度>



被験物質添加による  
生存細胞評価



1. 対数増殖期にある細胞を上記の予備実験で確認した細胞数となるよう細胞懸濁液を調製する。
2. 96 ウェルマイクロプレートの各ウェルに 100  $\mu$ l ずつ播種し、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で前培養する。
  - \* 附着細胞の場合、細胞をプレートに接着させるため一晩培養する。
3. 目的の濃度に調整した薬剤を各ウェルに 10  $\mu$ l ずつ添加し、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で一定時間 (6, 12, 24, 48 時間) 培養する。
  - \* 被験物質に着色または還元性がある場合には、Blank として細胞を含まない培地に被験物質と CCK-8 を添加したウェルを準備する。
4. CCK-8 溶液を各ウェルに 10  $\mu$ l ずつ添加する。
  - \* 気泡は測定値のバラツキの原因となりますので、気泡を生じないように添加して下さい。
5. CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 1 - 4 時間呈色反応を行う。
  - \* 発色量は細胞種や細胞数により異なります。上記の予備実験で確認した最適なインキュベーション時間で呈色反応を行ってください。
6. マイクロプレートリーダーにて吸光度を測定する。(フィルター：450 - 490 nm)

細胞生存率の算出式

細胞培養液に被験物質および CCK-8 を添加した Sample の吸光度と細胞培養液に CCK-8 のみを添加した Control の吸光度から、細胞を含まない Blank の吸光度をそれぞれ引いた値 (3 重測定の平均値) を用いて算出する。

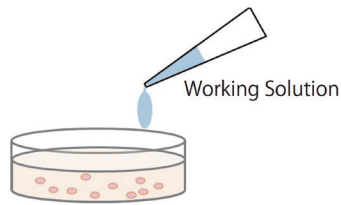
$$\text{細胞生存率 (\%)} = \frac{(\text{Sample} - \text{Blank})}{(\text{Control} - \text{Blank})} \times 100$$

Control: 細胞を含む培地に CCK-8 を添加したウェル  
Blank: 細胞を含まない培地に CCK-8 を添加したウェル  
Sample: 細胞を含む培地に被験物質、CCK-8 を添加したウェル

LDH Assay Kit を用いた死細胞の評価

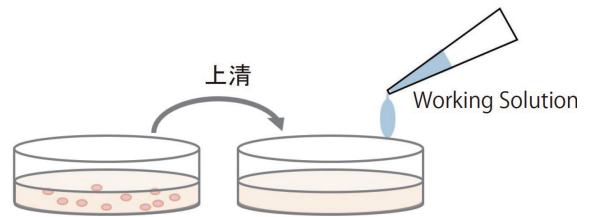
本キットは 2 つの測定法に対応しているため、実験状況に応じて測定方法を選択することができます。

ホモジニアスアッセイ



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、下記 P. 3 を参照。

ノンホモジニアスアッセイ



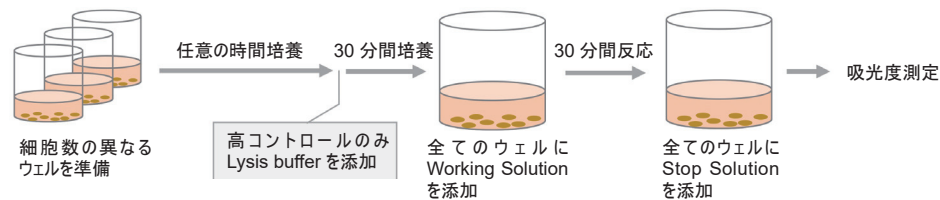
細胞培養液の上清を他のプレートに移し測定するため、アッセイで使った細胞（高コントロールを除く）は CCK-8 を用いた生存細胞の試験や細胞染色など他の実験に使用できる。  
本アッセイ法の操作は、P. 4 を参照。  
CCK-8 との併用実験例は、P. 5 を参照。

Working Solution の調製

- 1) Dye Mixture に適量の Assay Buffer を加えて、転倒混和により内容物を完全に溶解する。  
5 ml の Assay Buffer を Dye Mixture に加えると完全に溶解します。
- 2) 1) で調製した溶液全量を Assay Buffer のボトルに移して、転倒混和により混合する。  
Working Solution 調製後は遮光下、0 ~ 5 °C で保存してください(6ヶ月間安定)。

ホモジニアスアッセイ

予備実験



1. 対数増殖期にある細胞の懸濁液  $5 \times 10^5$  cells/ml を準備する。
2. 段階希釈法 (P. 6 参照) により細胞数の異なる細胞懸濁液を調製し、図 1 のプレート配置を参考に高コントロール及び低コントロールのウェルに細胞懸濁液および培地を各 50  $\mu$ l、バックグラウンドコントロールのウェルには培地のみを 100  $\mu$ l 添加する。
3. CO<sub>2</sub> インキュベーター内で任意の時間培養する。
4. 高コントロール用のウェルに Lysis Buffer 10  $\mu$ l を加える。
5. CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 30 分間インキュベーションする。
6. 全てのウェルに Working Solution 100  $\mu$ l を加える。遮光下、室温で 30 分間呈色反応を行う。
7. 全てのウェルに Stop Solution 50  $\mu$ l を加える。
8. プレートリーダーを用いて 490 nm の吸光度を測定する。  
\* 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します。  
- 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。

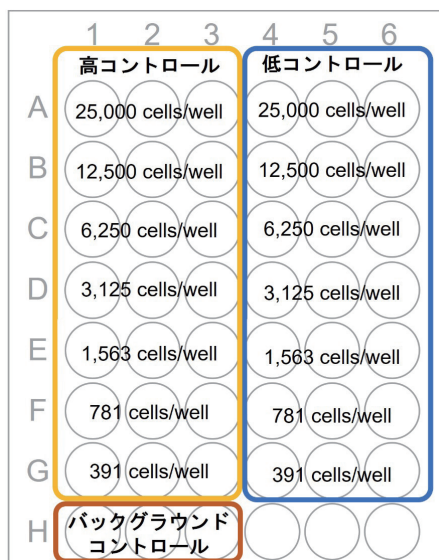


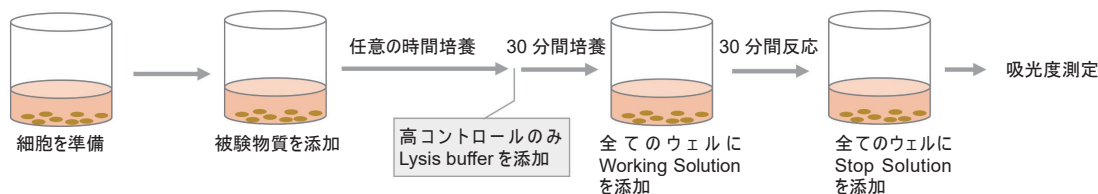
図 1 プレート配置図

表 1 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 $\mu$ l	50 $\mu$ l	100 $\mu$ l
細胞懸濁液	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	-
被験物質	50 $\mu$ l	-	-	-
Lysis Buffer	-	10 $\mu$ l	-	-

\* 実験サンプルと高コントロールの液量の違いは測定結果に影響を与えません。

実験サンプル：被験物質を細胞に加えたことにより傷害を受けた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



1. 平底 96 穴マイクロプレートに培地で調製した細胞懸濁液 50  $\mu$ l を加える。  
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 50  $\mu$ l に交換した後に操作 2) へ進む。
2. 培地で目的の濃度に調製した被験物質溶液 50  $\mu$ l を 1) の細胞懸濁液に加える (表 1)。
3. 37  $^{\circ}$ C で適切な時間 CO<sub>2</sub> インキュベーター内でインキュベーションする。
4. 高コントロールウェルに Lysis Buffer 10  $\mu$ l を加え、37 $^{\circ}$ C、30 分間 CO<sub>2</sub> インキュベーター内でインキュベーションする。
5. 各ウェルに Working Solution 100  $\mu$ l を加える。遮光下、室温で 30 分間呈色反応を行う。
6. 全てのウェルに Stop Solution 50  $\mu$ l を加える。
7. プレートリーダーを用いて 490 nm の吸光度を測定する。

#### 細胞毒性の算出式

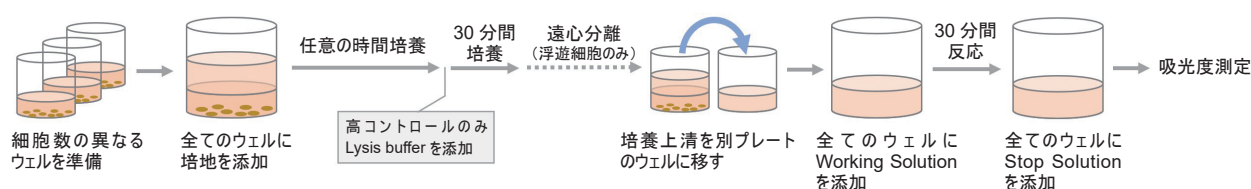
被験物質および各コントロールの吸光度からバックグラウンドコントロールの吸光度を引いた値 (3 重測定の平均値) を用いて算出する。

$$\text{細胞傷害率 (\%)} = \frac{(A-C)}{(B-C)} \times 100$$

A: 被験物質  
B: 高コントロール  
C: 低コントロール

#### 予備実験

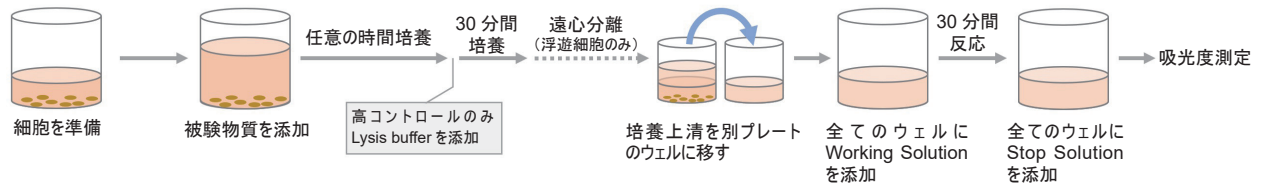
#### ノンホモジニアスアッセイ



1. 対数増殖期にある細胞を培地で洗浄し、培地を用いて  $5 \times 10^5$  cells/ml の細胞懸濁液を準備する。
2. 96 ウェルマイクロプレートの各ウェルに、段階希釈法 (P. 6 参照) により調製した細胞懸濁液を 100  $\mu$ l ずつ入れる。併せて高コントロール、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) を各々 3 ウェルずつ準備する (図 2)
3. 培地 100  $\mu$ l を全てのウェルに加える。
4. 37  $^{\circ}$ C の CO<sub>2</sub> インキュベーター内でインキュベーションする。
5. 高コントロール用のウェルに Lysis Buffer 20  $\mu$ l を加える。
6. 37  $^{\circ}$ C、30 分間 CO<sub>2</sub> インキュベーター内でインキュベーションする。
7. 250  $\times$  g、2 分間、マイクロプレートを遠心する。(浮遊細胞の場合)
8. 各ウェルから上清 100  $\mu$ l を注意深く取り、測定用 96 穴マイクロプレートに移す。
9. 全てのウェルに Working Solution 100  $\mu$ l を加える。遮光下、室温で 30 分間呈色反応を行う。
10. 全てのウェルに Stop Solution 50  $\mu$ l を加える。
11. プレートリーダーを用いて 490 nm の吸光度を測定する。

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します。

- 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。



1. 96 穴マイクロプレートに培地で調製した細胞懸濁液 100 μl を加える。  
\* 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 μl に交換した後に操作 2) へ進む。
2. 培地で目的の濃度に調製した被験物質溶液 100 μl を 1) の細胞懸濁液に加える (表 2)。
3. 37°C の CO<sub>2</sub> インキュベーターで適切な時間インキュベーションする。
4. 高コントロールウェルに Lysis Buffer 20 μl を加え、37°C、30 分間 CO<sub>2</sub> インキュベーター内でインキュベーションする。
5. 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)
6. 各ウェルから上清 100 μl を注意深く取り、測定用 96 穴マイクロプレートに移す。
7. 全てのウェルに Working Solution 100 μl を加える。遮光下、室温で 30 分間呈色反応を行う。
8. 全てのウェルに Stop Solution 50 μl を加える。
9. 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。

$$\text{細胞傷害率 (\%)} = \frac{(A-C)}{(B-C)} \times 100$$

A: 被験物質  
B: 高コントロール  
C: 低コントロール

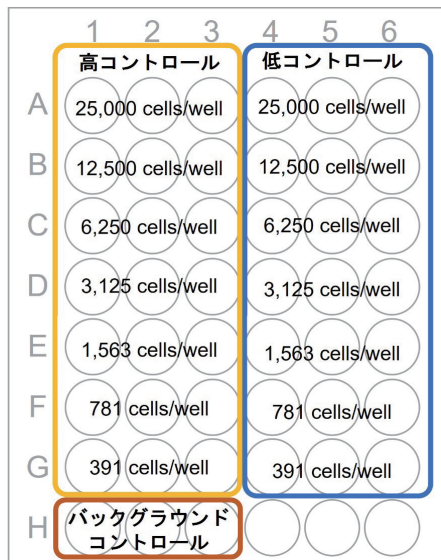


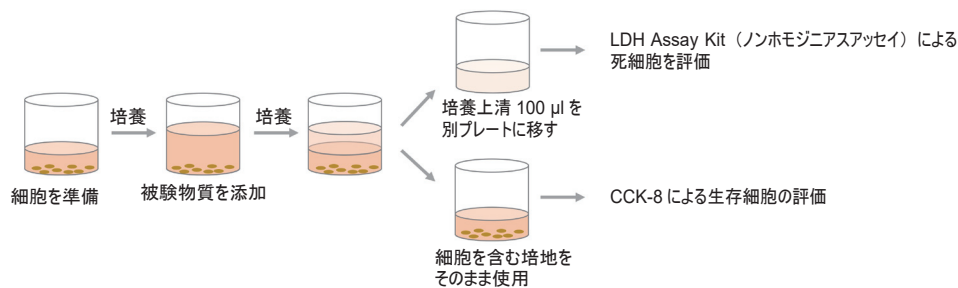
表 2 各ウェルの溶液量 (ノンホモジニアスアッセイ)

	実験サンプル	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	-	-

実験サンプル：被験物質を細胞に加えたことにより傷害を受けた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

図 2 プレート配置図

## 同じ細胞を用いた CCK-8 及び LDH Assay Kit による実験例



1. HeLa 細胞 (ヒト子宮頸癌細胞) 5000 cells/100  $\mu$ l を 96well ウェルプレートに播種する。
2. CO<sub>2</sub> インキュベーター (37°C) で 1 晩インキュベーションする。
3. 被験物質 100  $\mu$ l を添加する。
4. CO<sub>2</sub> インキュベーター (37°C) で 1 時間インキュベーションする。  
\* 被験物質の薬剤暴露時間となるので、インキュベーション時間は実験によって適切な時間行う。
5. 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  $\mu$ l を添加する。

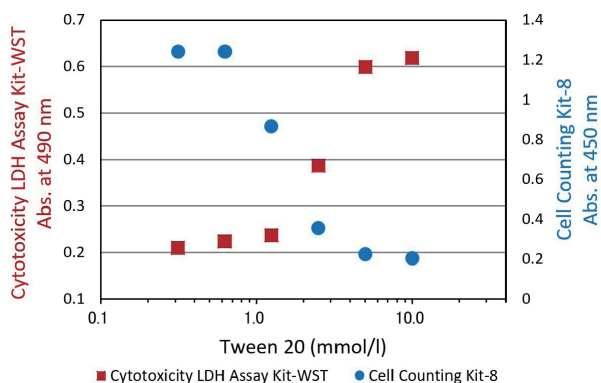
### 培養上清を用いた LDH アッセイ (ノンホモジニアスアッセイ法に基づき操作)

6. 培養上清 100  $\mu$ l を別のプレートへ添加する。
7. 各ウェルに Working Solution 100  $\mu$ l を添加する。
8. 遮光下、室温で 30 分間呈色反応する。
9. 全てのウェルに Stop Solution 50  $\mu$ l を添加する。
10. 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

11. 上清 100  $\mu$ l を除いた細胞を含む培地 100  $\mu$ l に CCK-8 を 10  $\mu$ l 添加する。
12. CO<sub>2</sub> インキュベーター (37°C) で 3 時間呈色反応する。  
\* 呈色反応時間は、予備実験の項を参考に最適な発色時間を確認する。
13. プレートリーダーを用いて 450 nm の吸光度を測定する。

### < Tween 20 を用いた細胞毒性試験 >



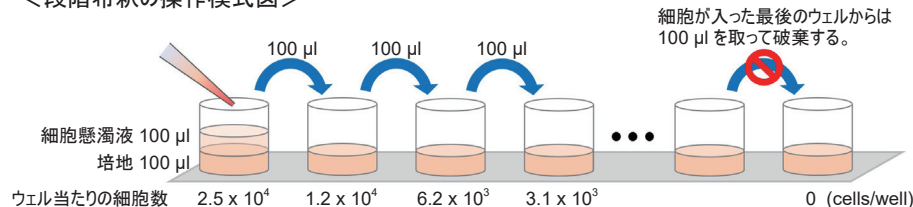
細胞 : HeLa 細胞  
培地 : MEM、10% FBS  
被験物質 : Tween 20  
薬剤暴露時間 : 1 時間

図 3 細胞毒性試験

### 段階希釈法

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  $\mu$ l を入れて、次に  $5 \times 10^5$  cells/ml に調製した細胞懸濁液 100  $\mu$ l を細胞数が最大となるウェルに加えてピペティングする。その後、細胞濃度が半分となった細胞懸濁液 100  $\mu$ l を次のウェルに移して、同様にピペティングにて混合する。以降、この操作を繰り返す。

### < 段階希釈の操作模式図 >



ご質問・ご要望は下記までお問い合わせください。

**DOJINDO** 株式会社同仁化学研究所  
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 〒861-2202  
Tel: 096-286-1515 (代表) Fax: 096-286-1525  
URL: [www.dojindo.co.jp](http://www.dojindo.co.jp)

ドージン・イースト (東京)  
東京都港区芝大門 2-1-17 朝川ビル 7F 〒105-0012  
Tel: 03-3578-9651 (代表) Fax: 03-3578-9650