

はじめに

細胞の増殖速度をみることによって薬剤のスクリーニングや毒性試験などが可能です。細胞の増殖度の測定には $[^3\text{H}]$ チミジン取り込み法や MTT アッセイなどが用いられていますが、それぞれ問題点を抱えています。 $[^3\text{H}]$ チミジン取り込みは放射性同位元素を用いるため、専用の施設を必要としますし、MTT アッセイでは色素抽出の操作が要求されます。Cell Counting Kit (CCK) は水溶性の化合物を用いていますので、抽出操作の必要がなく、試薬溶液を添加後、一定時間後に吸光度測定するだけで細胞数を測定できます (図 1 参照)。

キット内容

- 500 回用 : 試薬 A、溶液 B 各 1 本
- 2500 回用 : 試薬 A、溶液 B 各 5 本

キット以外に必要なもの

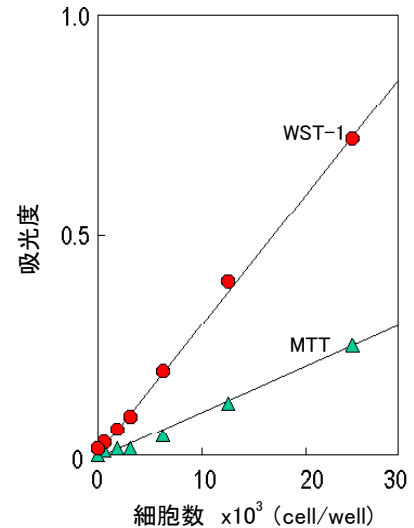
- プレートリーダー (450 nm の吸光フィルター)
- 96 穴マイクロプレート
- CO₂ インキュベーター
- 10 μl および 100 - 200 μl マルチチャンネルピペット

試薬溶液調製法

1. 溶液 B を全量注射器で吸い取り、試薬 A に注入溶解し試薬溶液 * とする (試薬 A は真空状態ですのでゴム栓を開けますと試薬が飛散するおそれがあります。注射器で溶液 B を注入した後お開けください)。
 - * 試薬溶液は冷蔵で 3 日間安定です。また、分注し冷凍保存すれば約 1 ヶ月は使用可能です。
2. 必要に応じて、試薬溶液は 0.22 μm のメンブランフィルターでろ過滅菌する。

注意事項

本キットにはガラス製容器およびアルミ製シールキャップを使用いたしております。お取扱に際しては、保護手袋などをご着用いただくなど、ご注意くださいますようお願い申し上げます。



使用細胞 : HeLa 細胞
 使用培地 : MEM 培地 (10% 牛胎児血清含有)
 前培養 : 37°C、3 時間、5% CO₂
 呈色反応 : WST-1 37°C、2 時間、5% CO₂
 MTT 37°C、3 時間、5% CO₂
 測定波長 : WST-1 450 nm (参照波長 650 nm)
 MTT 570 nm (参照波長 650 nm)

図 1 Cell Counting Kit アッセイと MTT アッセイの比較

プロトコール (96 穴プレート)

細胞数測定法

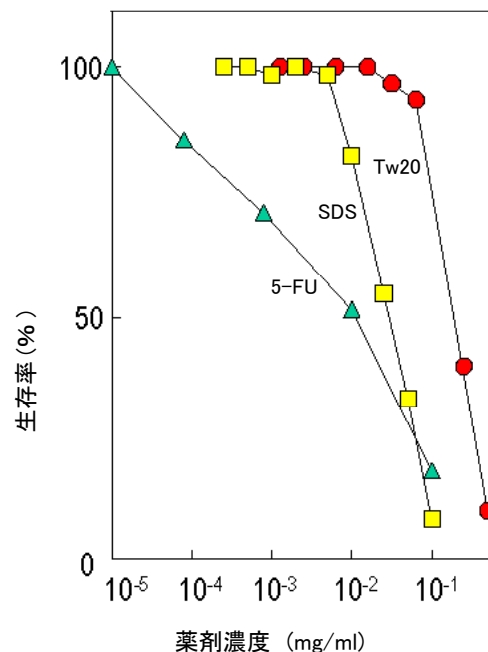
1. 対数増殖期にある細胞を目的の細胞数になるように計数する。96 穴マイクロプレートの各ウェルに 100 μl ずつ播種し、CO₂ インキュベーター内で前培養する。
2. 試薬溶液を各ウェルに 10 μl ずつ添加する。
気泡は測定値のバラツキの原因となりますので、気泡を生じないように添加して下さい。
3. CO₂ インキュベーター内で 1 - 4 時間呈色反応を行う。
発色感度は細胞種により異なります。発色の程度によりインキュベーション時間を調節して下さい。
4. マイクロプレートリーダーで 400 - 450 nm の吸光度を測定する。
時間を置いて測定する場合には、反応停止液 10 μl を各ウェルに加え、蓋をして冷暗所に保存してください。24 時間以内では吸光度変化はほとんど観測されません。反応停止液としては、0.1 mol/l HCl や 1 w/v% SDS を用いることができます。

細胞増殖および細胞毒性試験

1. 対数増殖期にある細胞を 5000 cells/well となるよう計数する。96 穴マイクロプレートの各ウェルに 100 μl ずつ播種し、CO₂ インキュベーター内で前培養する。
2. 目的の濃度に調整した薬剤を各ウェルに 10 μl ずつ添加し、CO₂ インキュベーター内で一定時間 (6, 12, 24, 48 時間) 培養する。
3. 試薬溶液を各ウェルに 10 μl 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。
4. CO₂ インキュベーター内で 1 - 4 時間呈色反応を行う。
発色感度は細胞種により異なります。発色の程度によりインキュベーション時間を調節して下さい。
5. マイクロプレートリーダーで 400-450 nm の吸光度を測定する (実験例を図 2 に示す)。
時間を置いて測定する場合には、反応停止液 10 μl を各ウェルに加え、蓋をして冷暗所に保存してください。24 時間以内では吸光度変化はほとんど観測されません。反応停止液としては、0.1 mol/l HCl や 1 w/v% SDS を用いることができます。

使用上の注意

1. 本アッセイは生細胞内の脱水素酵素活性に基づいていますので、脱水素酵素活性に影響を及ぼす薬剤の存在や細胞の状態によっては、本キットで求めた生細胞数と実際の値に差が見られることがあります。
2. 還元剤が存在すると WST-1 が還元され、バックグラウンドが上昇することがあります。還元能のある薬剤を細胞増殖・毒性試験に用いる場合は、薬剤自身による発色の有無を確認してください。
3. 気泡は測定値のバラツキの原因となりますので、ご注意ください。
4. フェノールレッドを含む培地も使用できます。
5. 本キットは滅菌処理をしております。滅菌が必要な場合は、ろ過滅菌してご使用下さい。
6. 発色に要する時間は細胞種や細胞数に依存します。一般的に、浮遊細胞による発色は弱く、長時間のインキュベーション時間（～4 時間）と多くの細胞（ $\sim 10^5$ cell/well）が必要です。
7. 本キット自身の細胞毒性は非常に低いため、吸光度測定後も更に発色反応を実行することができます。また、本アッセイを行った後に、ニュートラルレッドやクリスタルバイオレットなどの他の細胞増殖アッセイを行うことも可能です。
8. 使用する細胞数が多いことにより細胞懸濁液の濁りが強い場合は、600 nm - 650 nm を参照波長として測定してください。



使用細胞 : HeLa 細胞
使用培地 : MEM 培地 (10% 牛胎児血清含有)
使用薬剤 : 5-フルオロウラシル (5-FU)
ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)
Tween20(Tw20)
薬剤処理 : 37°C、48 時間、5% CO₂
前培養 : 37°C、3 時間、5% CO₂
呈色反応 : 37°C、2 時間、5% CO₂
測定波長 : 450 nm (参照波長 650 nm)

図2 薬剤濃度と細胞生存率の関係

FAQ

1. アッセイに必要な細胞数はどのくらいですか？
96 穴プレートでアッセイする場合、1 ウェル当たり少なくとも付着細胞で 1000 cells、浮遊細胞では発色感度が低いため、2500 cells が必要です。1 ウェル当たりの最大細胞数は 96 穴プレートで 25000 cells を推奨します。24 穴や 6 穴プレートをご使用の際は、96 穴プレートの場合のそれぞれ 4 倍、16 倍を目安に細胞数を調整し、培地の 10% の試薬溶液を添加して下さい。
2. 試薬溶液は細胞を染色しますか？
いいえ。WST-1、及び WST-1 ホルマザンは高い水溶性を有しているため、細胞は染色されません。
3. フェノールレッドはアッセイに影響を与えますか？
いいえ。培地中のフェノールレッドの吸収の影響は、それぞれのウェルの吸光度からブランクの吸光度を差し引くことで排除することができます。そのため、フェノールレッド含有培地でもアッセイは可能です。
4. 試薬溶液は細胞毒性を持っていますか？
試薬溶液の細胞毒性はほとんどありません。そのため、本アッセイを行った後に、ニュートラルレッドやクリスタルバイオレットなどの他の細胞増殖アッセイを行うことも可能です。
5. 450 nm 以外のフィルターは使用できますか。
405 nm のフィルターもご使用いただけます。

Cell Counting Kit
Revised Feb. 10, 2010

ご質問・ご要望は下記までお問い合わせください。

DOJINDO <試薬製造元>
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
E-mail: info@dojindo.co.jp URL: 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
フリーダイヤル : 0120-489548
フリーファックス : 0120-021557