

生細胞数を測りたい(吸光測定)

使用製品

Cell Counting Kit-8	[CK04]
Cell Counting Kit	[CK01]
MTT	[M009]

解析装置



I はじめに

生細胞数を測定する方法として、コロニー法、 ^3H チミジン取り込み法、MTT 法等が汎用されている。中でも MTT 法は、放射性同位体を使用せずかつ短時間で結果が得られるため、細胞毒性および薬剤感受性試験等のスクリーニング試験に使用されている。MTT 法はテトラゾリウム塩化合物である MTT が脱水素酵素の基質となる性質を利用している。細胞膜透過性の MTT は膜透過後、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。ほとんどの動物細胞に適用可能であり、生成したホルマザン量は生細胞数に対応する。放射性同位元素を使用しないので、特別な施設を必要とせず、またマイクロプレートを用いることで、一度に多量の検体を処理することができる。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、吸光度測定前に有機溶媒により溶解させる操作が必要である。再現性のよい結果を得るために、ホルマザンの溶解操作は重要なポイントとなる。

Cell Counting Kit ならびに Cell Counting Kit-8 は水溶性のホルマザンを生成するテトラゾリウム塩、WST-1 (Cell Counting

Kit) および WST-8 (Cell Counting Kit-8) を使用しているため MTT 法とは異なり、ホルマザンの溶解操作を必要としない(図 1 に Cell Counting Kit-8 の反応原理を示す)。細胞中の脱水素酵素により産生される NADH は 1-Methoxy PMS を介して WST-1 および WST-8 を橙色のホルマザンに還元する。このホルマザンの色素量は生細胞数に比例する。MTT 法ならびに ^3H チミジン取り込み法との相関は良好である(図 3 に Cell Counting Kit-8 と ^3H チミジンとの相関性を示す)。また試薬の細胞に対する毒性が低い(図 2 に試薬の細胞毒性を示す。HeLa 細胞を試薬溶液に 24 時間暴露後、90% 以上生存)、Cell Counting Kit または 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ある。

Cell Counting Kit は試薬 A、溶液 B の 2 液タイプ、また ready-to-use タイプの Cell Counting Kit-8 は 1 液タイプとなっている。いずれのキットも 1. 検体へ試薬溶液添加 2. 呈色反応 3. 測定、の 3 ステップで結果が得られるため、マイクロプレートを用いた High-Throughput Screening に適用可能である。

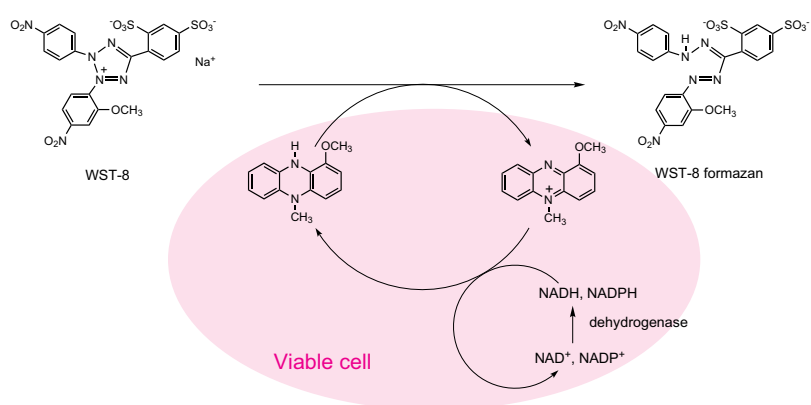
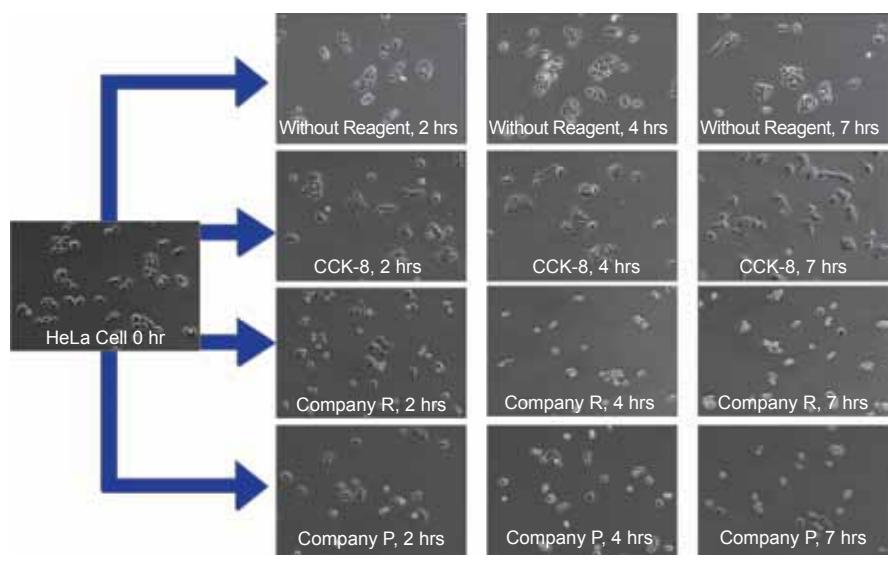


図 1 Cell Counting Kit-8 による細胞増殖アッセイ原理



それぞれの試薬添加後、2, 4, 7 時間後の写真。CCK-8 添加細胞の生存率が高いことがわかる。

図 2 HeLa 細胞を用いた各試薬の細胞毒性

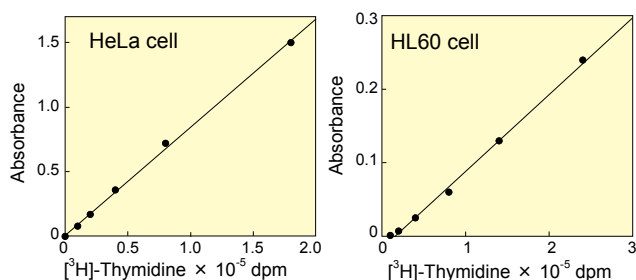


図3 Cell Counting Kit-8 と ³H-thymidine 取り込み法との相関

Medium:	MEM, 10% FBS (HeLa)	RPMI1640, 10% FBS (HL-60)
Reagent:	³ H-Thymidine 37 kBq/well	Cell Counting Kit-8 10 μl/well
Incubation:	³ H-Thymidine 4 h	Cell Counting Kit-8 4 h

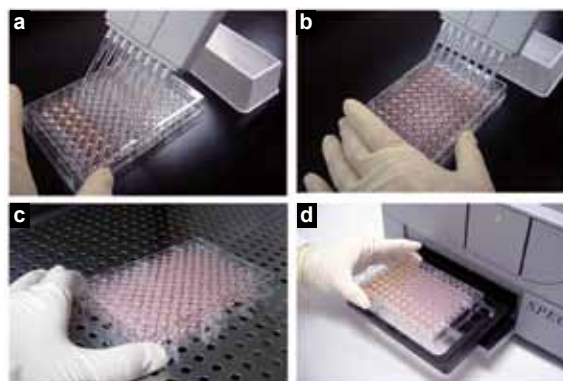


図4 測定操作図

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

II Cell Counting Kit 法 (Cell Counting Kit, Cell Counting Kit-8)

1. 最適細胞数決定法

(1) 試薬

- Cell Counting Kit (Code: CK01)
試薬 A に溶液 B を全量加える^{*1}。
< 500 回用 >
試薬 A: WST-1/HEPES (凍結乾燥品)
溶液 B: 1-Methoxy PMS 5 ml

- Cell Counting Kit - 8 (Code: CK04)^{*1}
< 500 回用 >
WST-8/1-Methoxy PMS 溶液 5 ml

(2) 装置

炭酸ガスインキュベーター、クリーンベンチ、プレートリーダー、倒立顕微鏡、オートクレーブ、マイクロプレートミキサー、8 あるいは 4 チャンネルマルチピペット、血球計算盤

(3) 方法

Cell Counting Kit 混合溶液および Cell Counting Kit - 8 の使用容量および操作は同じであるため、以後“Cell Counting Kit 溶液”と表記する。

- 1) 対数増殖期にある細胞を血球計算盤で計数して細胞懸濁液 (5 × 10⁵ cells/ml) を調製する。
- 2) マルチピペットを用いて 96 穴マイクロプレートの各ウェルに 100 μl ずつ培地を分注し、細胞懸濁液を希釈しながら添加する^{*2}(図 4 a)。
- 3) 炭酸ガスインキュベーター内で前培養する^{*3}。
- 4) Cell Counting Kit 溶液を、各ウェルに 10 μl ずつ添加する^{*4}(図 4 b)。
- 5) 炭酸ガスインキュベーター内に戻し、1 ~ 4 時間呈色反応を行う^{*6}(図 4 c)。
- 6) 発色むらがある場合は、プレートの側面を軽く叩き混合する。
- 7) マイクロプレートリーダーで 450 nm の吸光度を測定する^{*7}(図 4 d)。
- 8) 上記の結果より、この後の薬剤感受性試験に使用する細胞数及び呈色時間を決定する。

図 5 に HeLa 細胞と HL-60 を用いた場合の測定例を示す。比較として XTT、MTS、MTT でのデータも示す。

また、図 6 に代表的な細胞の細胞数と吸光度の関係を示す。細胞により、その関係は異なるためご注意ください。

2. 薬剤感受性試験法

(1) 試薬

(2) 装置

前項を参照

(3) 方法

- 1) 80% コンフルエントの細胞を血球計算盤で計数して細胞懸濁液を調製する^{*2}。
- 2) マルチピペットを用いて 100 μl ずつ、96 穴マイクロプレートの各ウェルに細胞懸濁液を分注する。ブランク (バックグラウンド値) 用のウェルには培地のみを 100 μl 加える。
- 3) 炭酸ガスインキュベーター内で 48 ~ 72 時間培養したのち、培地を吸引により除く^{*3}。浮遊細胞の場合には、吸引する前に遠心操作により、細胞を沈澱させておく。新たに培地 100 μl を各ウェルに加える (培地交換)。ブランク用のウェルには培地のみ 100 μl 加える。
- 4) 培地で種々濃度に調製した被験物質液を 10 μl ずつ添加する。ブランクおよび陰性対照のウェルには、培地を 10 μl ずつ加える^{*4}。
- 5) 37°C の炭酸ガスインキュベーター内で 24 ~ 72 時間、培養する^{*5}。
- 6) プレートを取り出し、Cell Counting Kit 溶液を各ウェルに 10 μl ずつ添加する^{*4}。

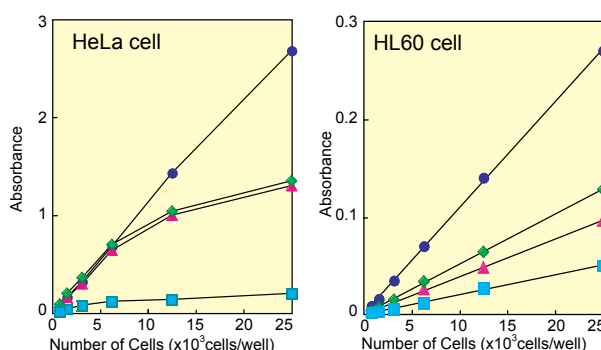
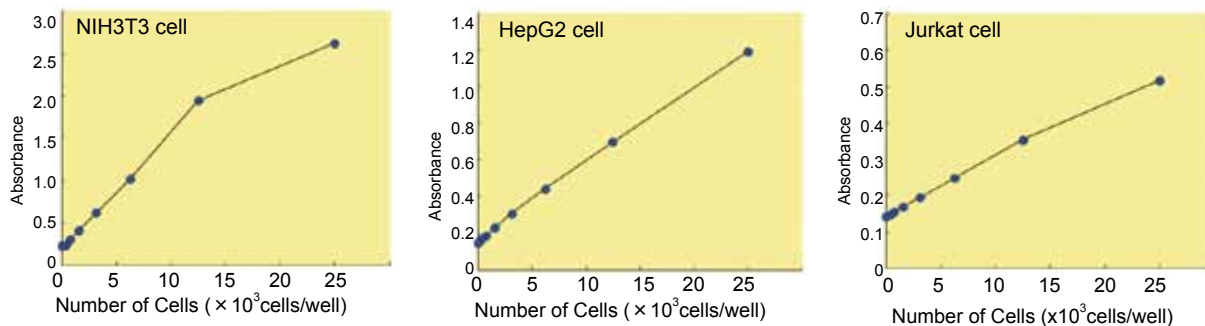


図5 感度の比較

Medium:	MEM, 10% FBS (HeLa)	Detection:	Cell Counting Kit-8 (●) 450 nm
	RPMI1640, 10% FBS (HL-60)		(◆) 450 nm
Incubation:	37°C, 5% CO ₂ , 2 h (HeLa)		(▲) 490 nm
	37°C, 5% CO ₂ , 3 h (HL-60)		(■) 570 nm
			XTT
			MTS
			MTT



細胞種により細胞数と吸光度の関係は異なる

図6 細胞数と吸光度の関係

- 7) 炭酸ガスインキュベーター内に戻し、1～4時間、呈色反応を行う^{※6}。
- 8) 発色むらがある場合は、プレートの側面を軽く叩き混合する。
- 9) マイクロプレートリーダーで450 nmの吸光度を測定する^{※7}。

(4) 細胞傷害率の算定法

下記の式により細胞生存率を算出する。これを種々の被検物質濃度に対してグラフに表し、生存率が50%になる値をIC₅₀(50%細胞傷害率)とする。

$$\text{細胞生存率 (\%)} = [(A_s - A_b) / (A_c - A_b)] \times 100$$

A_s: 検体の吸光度 (細胞、被検物質および Cell Counting Kit 溶液の入ったウェル)

A_c: 陰性対照の吸光度 (細胞および Cell Counting Kit 溶液の入ったウェル 被検物質無し)

A_b: ブランク吸光度 (培地および Cell Counting Kit 溶液の入ったウェル 細胞無し)

(5) 注意事項

- ※1 Cell Counting Kit の混合溶液は、4℃で3日、-20℃で1ヶ月安定です。混合溶液を長期に使用する場合は、溶液調製後分注し -20℃で保存して下さい。Cell Counting Kit - 8 は4℃で12ヶ月安定です。長期に保存する場合は -20℃で保存して下さい。いずれの溶液も凍結・融解は繰り返さないで下さい。
- ※2 ウェルあたりの細胞数は、細胞の種類や増殖度によって異なる。HeLa, S3(sc) 細胞では、2,000～3,000 cells 程度の播種が適しています。
- ※3 附着細胞を接着させるのに必要な前培養時間は、2～4時間です。附着細胞でも接着の必要がない場合あるいは浮遊細胞の場合は前培養を省略することも可能です。多くの細胞は48～72時間で対数増殖期に達します。
- ※4 Cell Counting Kit 溶液や被検物質の添加量が少ないためウェルの側壁に附着することがあるのでプレートの底をたたいて培地と混合させて下さい。
- ※5 被検物質の処理時間は被検物質の性質および細胞の感受性によって異なります。(一般には、細胞周期に依存した感受性変動も考慮して、少なくとも処理時間を細胞の1世代時間以上になるよう処理することが多い。)
- ※6 細胞の種類によって生成するホルマザンの量が異なるため、発色が十分でない時は継続して培養し、発色条件を決定して下さい。特に血液細胞ではホルマザンの生成量が少ないため、長時間(5～6時間)の呈色反応が必要です。

※7 Cell Counting Kit の場合 400～450 nm、Cell Counting Kit-8 の場合 430～490 nm の波長フィルターが使用可能です。また細胞培養液中の濁りによるバックグラウンドを排除する場合は、600～650 nm の吸光度を測定し実測値から差し引いて下さい。

3. Cell Counting Kit-8 を用いた毒性試験・増殖試験例

(1) Actinomycin D を用いた毒性試験例

- 1) 96 ウェルプレートの各ウェルに HeLa 細胞 (3 × 10⁵ cells/ml) を 100 μl ずつ播種し、炭酸ガスインキュベーター (37℃) 内で 24 時間培養する。
- 2) 培地を吸引した後、種々の濃度の Actinomycin D (1.25, 0.63, 0.32, …, 0 μg/ml) を含む培地 100 μl に交換し、炭酸ガスインキュベーター (37℃) 内で 24 時間静置する。
- 3) Cell Counting Kit-8 溶液 10 μl 添加した後、炭酸ガスインキュベーター (37℃) 内で 4 時間呈色反応を行う。
- 4) 450 nm 吸光度を測定する。

(2) IL-2 を用いた増殖試験例

- 1) 96 ウェルプレートの各ウェルに培地 50 μl ずつ添加する。
- 2) 1 μg/ml IL-2 溶液 50 μl を一番左の列に添加し、倍々希釈 (500 ng/ml ～ 5.96 × 10⁻⁵ ng/ml) し、各ウェルに添加する。
- 3) CTLL-2 細胞溶液 (8 × 10⁴ cells/ml) を各ウェルに 50 μl ずつ添加する。(IL-2 終濃度 250ng/ml ～ 2.98 × 10⁻⁵ ng/ml)
- 4) 炭酸ガスインキュベーター (37℃) 内で 72 時間培養する。
- 5) Cell Counting Kit-8 溶液 10 μl 添加した後、炭酸ガスインキュベーター (37℃) 内で 4 時間呈色反応を行う。
- 6) 450 nm 吸光度を測定する。

図7に Actinomycin D による細胞毒性試験の例を、図8に IL-2 を用いた増殖試験の例を示す。

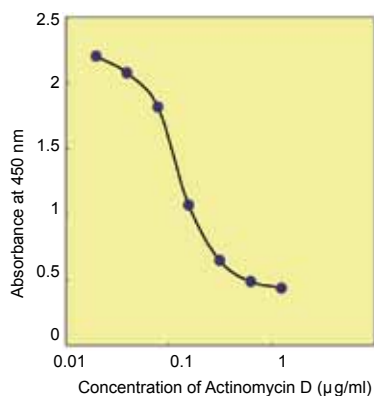


図7 細胞毒性試験 (Actinomycin D)

Cell line : HeLa
 Culture medium : DMEM, 10% FBS
 Drug : Actinomycin D
 Exposure : 24 hours
 Incubation : 37°C, 5% CO₂, 4 hours
 Detection : 450 nm

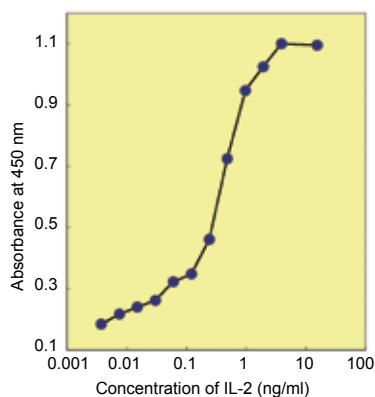


図8 細胞増殖試験 (IL-2)

Cell line : CTLL-2
 Culture medium : RPMI1640, 10% FBS
 Drug : Human Interleukin-2 (IL-2)
 Exposure : 72 hours
 Incubation : 37°C, 5% CO₂, 4 hours
 Detection : 450 nm

V 日産化学工業株式会社、3次元培養培地 FCEM[®] シリーズを用いた毒性試験

(1) 試薬

- Cell Counting Kit-8 (Code: CK04)
- FCEM[®]-MEM (wako code: 384-06375)
- Mitomycin C
- HeLa 細胞

(2) 装置

炭酸ガスインキュベーター、クリーンベンチ、プレートリーダー、マルチチャンネルピペット、血球計算盤

(3) 方法

- 対数増殖期にある HeLa 細胞を培地で洗浄し、FCEM[®]-MEM 培地 (10%FBS) 中で 5 日間培養し、スフェア (細胞塊) を作成する。
- 1) で前培養した HeLa 細胞を FCEM[®]-MEM 培地で希釈し、 1.0×10^5 cells/ml の細胞懸濁液を調製する。
- 96 ウェルプレートの各ウェルに 1) で調製した HeLa 細胞懸濁液を 50 µl ずつ播種する。
- 種々の濃度の Mitomycin C (終濃度 $1 \sim 24 \times 10^{-6}$ mmol/l) を含む培地 50 µl を添加する。

- 48 時間炭酸ガスインキュベーター (37°C) で培養する。
- Cell Counting Kit-8 溶液 10 µl を添加した後、炭酸ガスインキュベーター (37°C) で 2 時間呈色反応を行う。
- 450 nm の吸光度を測定する。
- 下記計算式より細胞生存率を算出する。

$$\text{細胞生存率 (\%)} = [(A_s - A_b) / (A_c - A_b)] \times 100$$

A_s: 検体の吸光度

A_b: 陰性対照の吸光度

A_c: ブランク吸光度

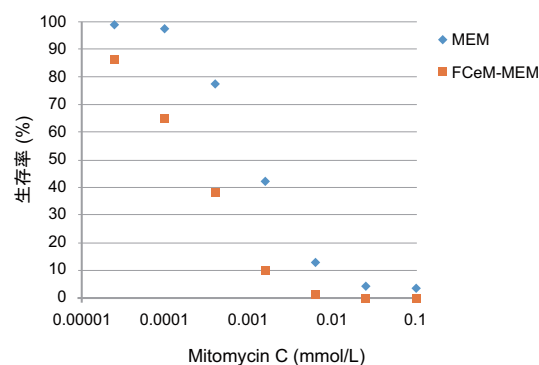


図9 細胞毒性試験 (Mitomycin C) による細胞毒性試験の比較

VI MTT 法

1. 最適細胞数決定法

(1) 試薬

- MTT (Code: M009)
- PBS(-): カルシウム、マグネシウムを含まないダルベッコリン酸緩衝塩類溶液。1,000 ml の純水に以下の試薬を溶解する。

NaCl	8.00 g
KCl	0.20 g
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	2.90 g
KH ₂ PO ₄	0.20 g

溶解後、オートクレーブで滅菌する。

・ MTT 溶液 :

MTT 25 mg に 5 ml の PBS(-) を加え溶解する。必要に応じて 0.22 µm フィルターで濾過滅菌する。

・ 4 mol/l 塩酸 :

濃塩酸を蒸留水または精製水で 4 mol/l に希釈する。

・ 0.04 mol/l HCl/ イソプロピルアルコール :

イソプロピルアルコールに 1/100 容量の 4 mol/l 塩酸を添加する。

(2) 装置

炭酸ガスインキュベーター、クリーンベンチ、プレートリーダー、倒立顕微鏡、オートクレーブ、マイクロプレートミキサー、8 あるいは 4 チャンネルマルチピペット、血球計算盤

(3) 方法

- 対数増殖期にある細胞を血球計算盤で計数し、細胞懸濁液 (5×10^5 cells/ml) を調製する。
- マルチピペットを用いて 96 穴マイクロプレートの各ウェルに 100 µl ずつ培地を分注し、細胞懸濁液を希釈しながら添加する^{*1}。
- 炭酸ガスインキュベーター内で前培養する^{*2}。
- MTT 溶液を各ウェルに 10 µl ずつ添加する^{*3}。

- 5) 炭酸ガスインキュベーター内に戻し、2～4時間呈色反応を行う^{※5}。
- 6) 各ウェルに200 μlのPBS(-)を加え、1分間ほど置いたのち、液を吸引する^{※6}。
- 7) 0.04 mol/l HCl/イソプロピルアルコールを200 μlずつ加える^{※7}。
- 8) プレートをマイクロプレートミキサーにのせ、10分間振動させるか、もしくは超音波照射によりホルマザンを溶解させる^{※8}。
- 9) マイクロプレートリーダーで570 nmの吸光度を測定する^{※9}。
- 10) 上記の結果より、この後の薬剤感受性試験に使用する細胞数及び呈色時間を決定する。

2. 薬剤感受性試験法

(1) 試薬

(2) 装置

前項を参照

(3) 方法

- 1) 80% コンフルエントの細胞を血球計算盤で計数して細胞懸濁液を調製する^{※1}。
- 2) マルチピペットを用いて100 μlずつ、96穴マイクロプレートの各ウェルに細胞懸濁液を分注する。ブランク(バックグラウンド値)用のウェルには培地のみを100 μl加える。
- 3) 炭酸ガスインキュベーター内で48～72時間培養したのち、培地を吸引により除く^{※2}。浮遊細胞の場合には、吸引する前に遠心操作により、細胞を沈澱させておく。新たに培地100 μlを各ウェルに加える(培地交換)。ブランク用のウェルには培地のみ100 μl加える。
- 4) 培地で種々濃度に調製した被験物質液を10 μlずつ添加する。ブランクおよび陰性対照のウェルには、培地を10 μlずつ加える^{※3}。
- 5) 37°Cの炭酸ガスインキュベーター内で24～72時間、培養する^{※4}。
- 6) プレートを取り出し、MTT溶液を各ウェルに10 μlずつ添加する^{※3}。
- 7) 炭酸ガスインキュベーター内に戻し、2～4時間、呈色反応を行う^{※5}。
- 8) 各ウェルに200 μlのPBS(-)を加え、1分間ほどおいたのち、液を吸引する^{※6}。
- 9) 0.04 mol/l HCl/イソプロピルアルコールを200 μlずつ加える^{※7}。
- 10) プレートをマイクロプレートミキサーにのせ、10分間振動させるか、もしくは超音波照射によりホルマザンを溶解させる^{※8}。
- 11) マイクロプレートリーダーで570 nmの吸光度を測定する^{※9}。

(4) 細胞傷害率の算定法

下記の式により細胞生存率を算出する。これを種々の被検物質濃度に対してグラフに表し、生存率が50%になる値をIC₅₀(50%細胞傷害率)とする。

$$\text{細胞生存率 (\%)} = [(A_s - A_b) / (A_c - A_b)] \times 100$$

A_s: 検体の吸光度(細胞、被検物質およびMTT溶液の入ったウェル)

A_c: 陰性対照の吸光度(細胞およびMTT溶液の入ったウェル被検物質無し)

A_b: ブランク吸光度(培地およびMTT溶液の入ったウェル細胞無し)

(5) 注意事項

- ※1 ウェルあたりの播種細胞数は、細胞の種類や増殖度によって異なる。HeLa.S3(sc)細胞では、2,000～3,000 cells/well程度の播種が適しています。
- ※2 附着細胞を接着させるのに必要な前培養時間は、2～4時間です。附着細胞でも接着の必要がない場合あるいは浮遊細胞の場合は前培養を省略することも可能です。多くの細胞は48～72時間で細胞が対数増殖期に達します。
- ※3 MTT溶液や被験物質液がウェルの側壁に附着することがあるのでプレートの底をたたいて振り落として下さい。
- ※4 被験物質の処理時間は被験物質の性質および細胞の感受性によって異なります。(一般的に、細胞周期に依存した感受性変動も考慮して、少なくとも細胞の1世代時間以上になるよう処理することが多い。)
- ※5 倒立顕微鏡で、細胞内に青紫色のホルマザン結晶が生成しているか否かを確認して下さい。細胞の種類によって生成するホルマザンの量が異なります。特に血液細胞ではホルマザンの生成量が少ないため、長時間(5～6時間)の呈色反応が必要です。
- ※6 MTTを加えた細胞はかなり剥がれやすいので、マルチピペットを用いて手早く加えて下さい。また、吸引除去の際は、細胞を吸引しないよう注意して下さい。浮遊細胞の場合は、吸引除去の前に遠心して下さい。
- ※7 イソプロピルアルコールは生成したホルマザンを溶解するために用いますが、ウェルに多くの培養成分(とくに血清)が残っていると不溶性の沈殿物が生じ、正確な吸光度が得られないことがあるため、培養成分は良く除いて下さい。溶解剤としてDMSOを使用することが出来ます。
- ※8 超音波照射する場合は、マイクロプレートごと超音波振動台に置くか、水を張った超音波槽の中にシールで密閉したマイクロプレートを浮遊させます。その際、超音波振動によってウェル内の液が飛び散ることがあるので注意して下さい。
- ※9 MTTホルマザンを0.04 mol/l HClイソプロピルアルコールで溶解した場合、570 nm付近に極大吸収を示しますが、他の溶媒では吸収スペクトルが変化するので注意して下さい。その場合あらかじめ極大吸収を調べ、最適なフィルターを用いて吸光度を測定して下さい(DMSOの場合には530 nmのフィルターが適しています)。

◆ 選択ガイド

細胞毒性 比較 同仁 検索

細胞毒性検出試薬・キットを一覧で掲載しています。

◆ プロトコル集



細胞増殖測定細胞染色プロトコル

細胞増殖測定試薬 (Cell Counting Kit, Cell Counting Kit-8 他) と細胞染色試薬 (-Cellstain-) に関して操作の基礎からわかりやすく解説。

参考文献

- 1) T. Mosmann, "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival, appcaion to proliferation and cytotoxicity assay" ,*J. Immunol. Methods*, **1983**, 65, 55.
- 2) T. F. Slaer, B. Sawyer and U. Stauli, "Studies on succinate-tetrazolium reductase systems. III. Points of coupling of four different tetrazolium salt" ,*Biochem. Biophys. Acta.*, **1963**, 77, 383.
- 3) F. Denizot and R. Lang, "Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: Modification to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability" , *J. Immunol. Methods*, **1986**, 89, 271.
- 4) M. Ishiyama, M. Mizoguchi, M. Shiga and K. Sasamoto, " A new tetrazolium salt that produces a highly water-soluble dye" , *Chem. Pharm. Bull.*, **1993**, 41, 1118.
- 5) M. Ishiyama, H. Tominaga, M. Shiga, K. Sasamoto, Y. Ohkura, K. Ueno and M. Watanabe, "Novel cell proliferation and cytotoxicity assays using a tetrazolium salt that produces a water-soluble formazan dye" , *In Vitro Toxicology*, **1995**, 8, 187 .
- 6) M. Ishiyama, H. Tominaga, M. Shiga, K. Sasamoto, Y. Ohkura and K. Ueno, "A combined assay of cell viability and in vitro cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet" , *Biol. Pharm. Bull.*, **1996**, 19, 1518.
- 7) M. Ishiyama, Y. Miyazono, K. Sasamoto, Y. Ohkura and K. Ueno, "A highly water-soluble disulfonated tetrazolium salt as a chromogenic indicator for NADH as well as cell viability, *Talanta*, **1997**, 44, 1299.
- 8) H. Tominaga, M. Ishiyama, F. Ohseto, K. Sasamoto, T. Hamamoto, K. Suzuki and M. Watanabe, "A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay" , *Anal. Commun.*, **1999**, 36, 47.
- 9) Y. Morita, T. Naka, Y. Kawazoe, M. Fujimoto, M. Narazaki, R. Nakagawa, H. Fukuyama, S. Nagata and T. Kishimoto, "Signals transducers and activators of transcription (STAT)-induced STAT inhibitor-1 (SSI-1)/suppressor of cytokine signaling-1 (SOCS-1) suppresses tumor necrosis factor -induced cell death in fibroblasts", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2000**, 97, 5405
- 10) T. Araki, M. Yamada, H. Ohnishi, S. Sano, T. Uetsuki and H. Hatanaka, "Shp-2 Specifically regulates several tyrosine-phosphorylated proteins in brain-derived neurotrophic factor signal" , *J. Neurochem.*, **2000**, 74, 659.
- 11) H. Shimura, H. Suzuki, A. Miyazaki, F. Furuya, K. Ohta, K. Haraguchi, T. Endo and T. Onaya, "Transcriptional activation of the thyroglobulin promoter directing suicide gene expression by thyroid transcription factor-1 in thyroid cancer cells" , *Cancer Res.*, **2001**, 61, 3640.
- 12) Y. Tomii, J. Kamochi, H. Yamazaki, N. Sawa, T. Tokunaga, Y. Ohnishi, H. Kijima, Y. Ueyama, N. Tamaoki and M. Nakamura, "Human thrombospondin 2 inhibits proliferation of microvascular endothelial cells" , *Int. J. Oncol.*, **2002**, 20 339.
- 13) M. L. Spencer, H. Shao and D. A. Andres, "Induction of neurite extension and survival in pheochromocytoma cells by the rit GTPase" , *J. Biol. Chem.*, **2002**, 277, 20160.

細胞
増殖/毒性
酸化
ストレス
分子
生物学
細胞内
蛍光プローブ
細胞
染色
ミトコンドリア
関連試薬
細菌研究用
試薬
膜タンパク質
可溶化剤
ラベル
化剤
二価性
試薬
イオン
電極
その他
機能性
有機材料

死細胞数を測りたい(吸光測定)

使用製品

Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST [CK12]

解析装置



I はじめに

死細胞を測定する方法として、トリパンプルー、Propidium iodide(PI) などによる染色、放射性同位元素 (^{51}Cr など) の放出を測定する方法、細胞から培地中に放出された乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性を測定する方法が用いられている。中でも LDH 活性を測定する方法は、放射性同位体を使用しない、操作が簡単かつ短時間で測定が可能、などの理由から広く用いられている。

細胞から培地中に放出された 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 を生成させ次に生じた NADH は、電子メディエーターを介してテトラゾリウム塩をホルマザンに還元する。生成したホルマザンの量は、放出された LDH 活性に比例するため、ホルマザンの吸光度を測定することで LDH 活性を測定することができる。

Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST は、生細胞と反応せず、かつ、細胞にダメージを与えないため、生細胞と死細胞が混在する細胞培養液中に直接試薬を加えて細胞傷害を測定することが可能である (ホモジニアスアッセイ)。また、細胞培養液を取り出して LDH 活性を測定することも可能である (ノンホモジニアスアッセイ)。以下に Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST を用いた細胞毒性試験の例を紹介する。

II キット内容

- Dye Mixture
- Assay Buffer
- Lysis Buffer
- Stop Solution

III Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST を用いた測定方法

1. 最適細胞数決定法

※ 細胞種ごとに LDH 量は異なる為、以下の実験を行い、高コントロールと低コントロールの吸光度差が最大となる細胞数を設定することを推奨する。下記の方法を参照いただきたい。

(1) 試薬

• Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST

Working Solution の調製

Dye Mixture に 100 tests の場合 1 ml、500 tests の場合 5 ml の Assay Buffer を加えて溶解する。転倒混和し完全に溶解させた後、Assay Buffer のボトルに全量移す。

(2) 装置

炭酸ガスインキュベーター、クリーンベンチ、プレートリーダー、マルチチャンネルピペット、血球計算盤

(3) 方法 (図 2 参照)

- 1) 対数増殖期の細胞を培地で洗浄し、血球計算盤で計数して培地を用いて 5×10^5 cells/ml の細胞懸濁液を調製する*。
- 2) 培地 100 μl を 96 穴マイクロプレートの各ウェルに加える。
- 3) マルチチャンネルピペットを用いて 2 倍希釈系列を調製する。High control、Low control 及びバックグランドコントロール (培地のみ) を各々 3 ウェルずつ準備する (図 3)。
※ 1) の細胞懸濁液 100 μl をウェル (A 列) に加え、ピペティングで混合する (2.5×10^4 cells/well)。100 μl を B 列のウェルに移して 2 倍に希釈する。この操作を繰り返して 2 倍希釈系列を作成する。
- 4) 37 °C の炭酸ガスインキュベーターでインキュベーションする。
※ インキュベーションは実際の細胞毒性試験と同じ時間に合わせる。
- 5) 高コントロール用のウェルに Lysis Buffer 10 μl を加える。
- 6) 37 °C、30 分間炭酸ガスインキュベーター内でインキュベーションする。

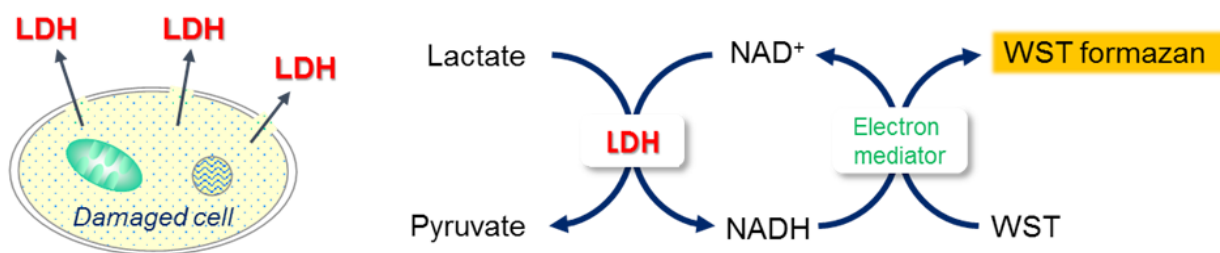


図 1 Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST を用いた細胞毒性の測定原理

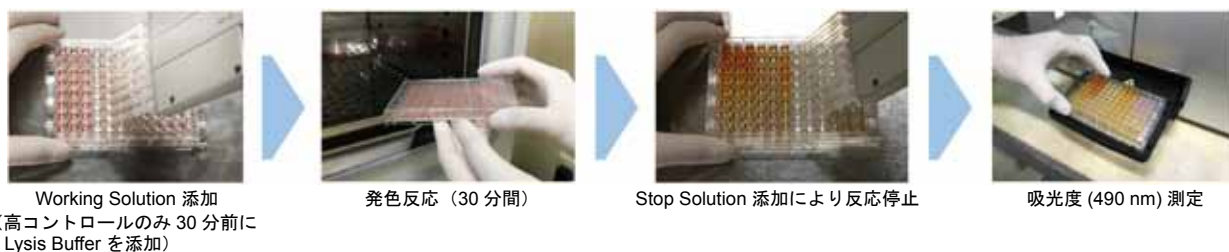


図 2 Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST を用いた測定方法

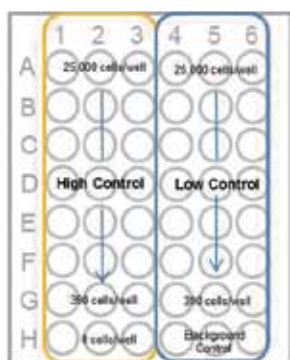


図3 細胞数の最適化の配置例

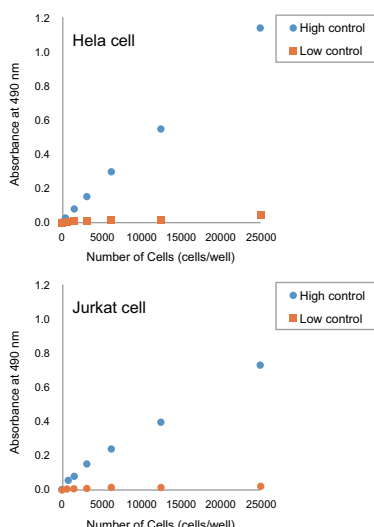


図4 細胞数の最適化

Medium : MEM, 10%FBS (HeLa)
RPMI1640, 10%FBS (Jurkat)
Incubation : 37°C, 5%CO₂, 24 h (HeLa)
37°C, 5%CO₂, 2 h (Jurkat)

- 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。
- 10) 得られた吸光度を縦軸に、細胞数を横軸にプロットし、最適な細胞数を決定する。
 - ・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。

2. 細胞毒性試験法

(1) 試薬

前項を参照

(2) 装置

前項を参照

※ ホモジニアスアッセイの場合、浮遊細胞も平底を使用する。
ノンホモジ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。

(3) 方法

(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、血球計算盤で計数し、
1. 最適細胞数決定法の操作で決定した細胞数を基に細胞懸濁液を調製する。
- 2) 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 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 50 µl に交換した後に操作 3) へ進む。

- 3) 培地で目的の濃度に調製した被験物質溶液 50 µl を 1) の細胞懸濁液に加える (N=3 で測定する)。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) を各々 3 ウェルずつ準備する (表 1 参照)。

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 µl	50 µl	100 µl
細胞懸濁液	50 µl	50 µl	50 µl	-
被験物質	50 µl	-	-	-
Lysis Buffer	-	10 µl	-	-

※ 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。

- 4) 37 °C で適切な時間炭酸ガス インキュベーター内でインキュベーションする。
- 5) 高コントロールウェルに Lysis Buffer 10 µl を加え、37°C、30 分間炭酸ガスインキュベーター内でインキュベーションする。
- 6) 各ウェルに Working Solution 100 µl を加える。遮光下、室温で 30 分間呈色反応を行う。
- 7) 全てのウェルに Stop Solution 50 µl 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。

(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、血球計算盤で計数し、上記 1) の操作で決定した細胞数を基に細胞懸濁液を調製する。
- 2) 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、新しい培地 100 µl に交換した後に操作 3) へ進む。
- 3) 培地で目的の濃度に調製した被験物質溶液 100 µl を 2) の細胞懸濁液に加える (N=3 で測定する)。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) を各々 3 ウェルずつ準備する (表 2 参照)。

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	-	-

- 4) 37°C の炭酸ガス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。
- 5) 高コントロールウェルに Lysis Buffer 20 µl を加え、37°C、30 分間炭酸ガスインキュベーター内でインキュベーションする。
- 6) 250 × g、2 分間、マイクロプレートを遠心する。
- 7) 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。
- 8) 全てのウェルに Working Solution 100 µl を加える。
- 9) 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 µl 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。

(細胞毒性の算出)

被験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。

$$\text{細胞毒性 (\%)} = [(A-C) / (B-C)] \times 100$$

A: 被験物質の吸光度

B: 高コントロールの吸光度

C: 低コントロールの吸光度

細胞増殖/毒性
酸化ストレス
分子生物学
細胞内蛍光プローブ
細胞染色
ミトコンドリア関連試薬
細菌研究用試薬
膜タンパク質可溶化剤
ラベル化剤
二価性試薬
イオン電極
その他
機能性有機材料

3. Mitomycin C を用いた細胞毒性試験 (ホモジニアスアッセイ)

- (1) 試薬
前項を参照
- (2) 装置
前項を参照
- (3) 方法
 - 1) 対数増殖期にある HeLa 細胞を培地で洗浄し、血球計算盤で計数し、 1.0×10^5 cells/ml の細胞懸濁液を調製する。
 - 2) 平底 96 穴マイクロプレートに培地で調製した HeLa 細胞懸濁液 50 μ l を加える。
 - 3) 一晚インキュベーションした後、新しい培地 50 μ l に交換する。
 - 4) 培地で目的の濃度に調製した Mitomycin C (終濃度 $1 \sim 24 \times 10^{-6}$ mmol/l) を含む培地 50 μ l を添加する。
 - 5) 37°C で 48 時間炭酸ガス インキュベーター内でインキュベーションする。
 - 6) 高コントロールウェルに Lysis Buffer 10 μ l を加え、37°C、30 分間炭酸ガスインキュベーター内でインキュベーションする。
 - 7) 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。
 - 8) 全てのウェルに Stop Solution 50 μ l 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。
 - 10) 前ページの細胞毒性の算出式を用いて細胞毒性を算出する。

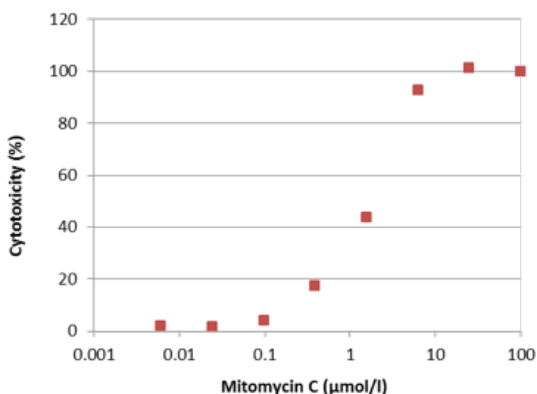


図5 細胞毒性試験 (Mitomycin C)

4. TritonX-100 を用いた細胞毒性試験 (ノンホモジニアスアッセイ)

- (1) 試薬
前項を参照
- (2) 装置
前項を参照
- (3) 方法
 - 1) 対数増殖期にある HL60 細胞を培地で洗浄し、血球計算盤で計数し、 10×10^5 cells/ml の細胞懸濁液を調製する。
 - 2) 96 穴マイクロプレートに調製した細胞懸濁液 100 μ l を加える。
 - 3) 培地で目的の濃度に調製した TritonX-100 (終濃度 $2 \sim 78 \times 10^{-6}$ mmol/l) を含む培地 50 μ l を添加する。
 - 4) 37°C の炭酸ガス インキュベーターで 1.5 時間インキュベーションする。
 - 5) 高コントロールウェルに Lysis Buffer 20 μ l を加え、37°C、30 分間炭酸ガス インキュベーター内でインキュベーションする。
 - 6) 250 \times g、2 分間、マイクロプレートを遠心する。
 - 7) 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。

- 8) 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。
- 9) 全てのウェルに Stop Solution 50 μ l を加える。
- 10) プレートリーダーを用いて 490 nm の吸光度を測定する。
- 11) 前ページの細胞毒性の算出の式を用いて細胞毒性を算出する。

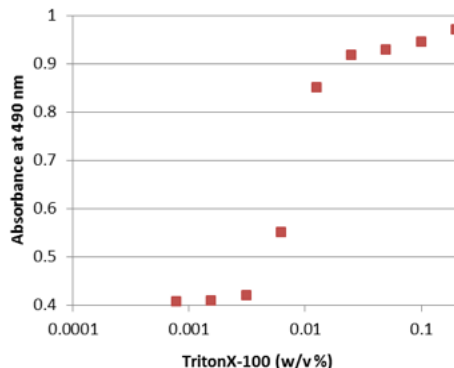


図6 細胞毒性試験 (TritonX-100)

5. 補体依存性細胞障害性試験 (CDC assay)

- (1) 試薬
 - ・ Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST
 - ・ 培地 (RPMI1640)
 - ・ ヒト血清補体
 - ・ 抗ヒト CD20 マウスモノクローナル抗体 (B-H20)
- (2) 装置
前項を参照
- (3) 方法
 - 1) 対数増殖期にある Raji 細胞を 5% 補体含有培地 (RPMI1640、5% complement 添加) で洗浄し、血球計算盤で計数し、 40×10^4 cells/ml の細胞懸濁液を調製する。
 - 2) 96 穴マイクロプレートに調製した細胞懸濁液 50 μ l を加える。
 - 3) 5% 補体含有培地で目的の濃度に調製した抗 CD20 抗体溶液 (終濃度 $100 \sim 1.0 \times 10^{-5}$ μ g/ml) 50 μ l を加える (N=3 で測定)
 - 4) 37°C の炭酸ガスインキュベーターで 2 時間インキュベーションする。
 - 5) 全てのウェルに Working Solution 100 μ l を加える。
 - 6) 遮光下、室温で 15 分間呈色反応を行う。
 - 7) 全てのウェルに Stop Solution 50 μ 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。

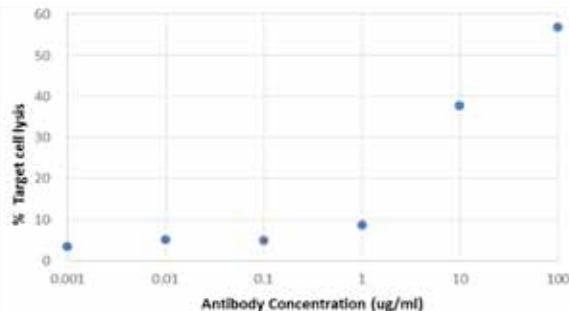


図7 補体依存性細胞障害試験

最新の測定データやアプリケーション、論文情報を小社 HP にて掲載。ご興味のある方は、小社 HP にて最新情報をご確認下さい。

LDH 同仁 検索