

CytoTox 96[®] Non-Radioactive Cytotoxicity Assay

日本語プロトコール No. TB163J

2000年8月作製

目次

カタログ番号 G1780

I.	はじめに	2
II.	キットの構成	2
III.	考慮が必要な事項	
	A. バックグラウンドとなる吸光度の補正	4
	B. CytoTox 96 [®] Assay のコントロール	4
IV.	ターゲット細胞数の最適化	
	A. アッセイプレートの準備	5
	B. 細胞の溶解と上清の回収	5
	C. LDH の測定	5
V.	細胞を介した細胞毒性試験	
	A. アッセイプレートの準備	7
	B. 細胞の培養と上清の回収	8
	C. LDH の測定	8
	D. 結果の計算	9
VI.	単一細胞種を用いた試験	
	A. 総細胞数の試験	11
	B. 細胞毒性の試験	12
VII.	困った時には.....	13
VIII.	参考文献	14
IX.	付録	
	A. バッファーと溶液の組成	15
	B. 関連製品の紹介	15

I. はじめに

CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assayは、⁵¹Cr放出を利用した細胞毒性試験に代わる比色定量法を用いたキットです。CytoTox 96® Assayでは、RIを用いたアッセイにおいて⁵¹Crが放出されるのと同じように、溶解した細胞から放出される安定な細胞質性酵素であるラクテートデヒドロゲナーゼ(lactate dehydrogenase; LDH)を定量的に測定できます。培養上清におけるLDHの放出は、テトラゾリウム塩(INT)が赤色を呈するホルマザン産物へと変換される共役酵素反応によるアッセイ(30分間で終了する)で測定されます。呈色の量は溶解した細胞数に比例します。可視光波長での吸光度データは標準的な96ウェルプレートリーダーを用いて収集されます。ディアフォラーゼ(diaphorase)または代わりとなる電子受容体を介したテトラゾリウム塩を利用したLDHの測定方法は使われ始めて数十年になります(1)。

この測定技術の変法を使った天然物の細胞毒性試験が報告され、並行して行われた⁵¹Cr放出アッセイで測定された値と同等(実験誤差内)であることが示されています(2,3)。

CytoTox 96®は下記を含むさまざまな用途に、数種類の異なった細胞種に対して使われています。

細胞による細胞毒性(4)

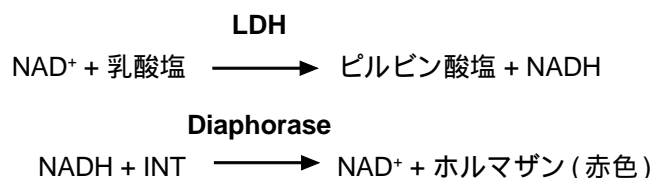
化学物質やその他の薬剤による細胞毒性(5-8)

総細胞数の測定(9)

CytoTox 96® Assayでは以下のように⁵¹Cr放出アッセイより優れた点がいくつか挙げられます。

- i) 実験に先立ってターゲット細胞を標識する必要がありません。
- ii) アイソトープの購入、アイソトープの廃棄コスト、安全管理用書類の作成が不要になります。
- iii) データは可視光波長を用いて標準的な96ウェルタイプのELISAプレートリーダーで測定できます。さらに、他の方法では測定できないことが多いとされる初期段階や低レベルの細胞傷害性を測定できます。

CytoTox 96® Assayの一般的な化学反応：



II. キットの構成

製品名	サイズ	カタログ番号
CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay	1,000 回分	G1780
• 5 vials	Substrate Mix	
• 60ml	Assay Buffer	
• 25µl	LDH Positive Control	
• 3ml	Lysis Solution (10 ×)	
• 65ml	Stop Solution	

保存条件：Substrate Mix と Assay Buffer は -20 で凍結保存してください。再溶解した Substrate Mix は失活することなく 6-8週間保存できます。LDH Positive Control、Lysis Solution (10 ×)、Stop Solution は 4 で保存してください。本製品は適正な保存および取り扱いをしていただいた場合、少なくとも6ヶ月は安定です。

アッセイプレートの準備

エフェクター細胞 (目的のエフェクター細胞濃度で) を Effector Cell Spontaneous LDH Release Control のウェルおよび実験用ウェルに加える

ターゲット細胞を実験用ウェルに加える

ターゲット細胞を Target Cell Spontaneous LDH Release Control のウェルに加える

ターゲット細胞を Target Cell Maximum LDH Release Control のウェルに加える

培養液と Lysis Solution (10 ×) を Volume Correction Control のウェルに加える

培養液を Culture Medium Background Control のウェルに加える

プレートを 250 × g で 4 分間遠心する

細胞培養と上清の回収

37 °C で 4 時間インキュベーションする

遠心する 45 分前に、Target Cell Maximum LDH Release Control のウェルに Lysis Solution (10 ×) を加える

プレートを 250 × g で 4 分間遠心する

LDH の測定

50 μl の上清を酵素アッセイ用のプレートに移す

(オプション) 5,000 倍希釈した LDH Positive Control を別のウェルに加える

Assay Buffer を使って Substrate Mix を溶解する

溶解した Substrate Mix 50 μl を酵素アッセイ用プレートの各ウェルに加える

遮光したプレートを室温で 30 分間インキュベートする

50 μl Stop Solution を各ウェルに加える

490nm の吸光度を測定する

図 1. CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay の操作手順

III. 考慮が必要な事項

A. バックグラウンドとなる吸光度の補正

組織培養液中の2つの因子(培養液中のフェノールレッドと血清に含まれるLDH)が、CytoTox 96® Assayを使って測定される吸光度のバックグラウンドに影響します。

これらの因子に由来するバックグラウンドは培地のバックグラウンドコントロールを含めることによって補正することができます。このコントロールで決められた吸光度の値は、その他のサンプルから得られた吸光度の値を補正するために使われます(セクションV.D参照)。フェノールレッドから得られるバックグラウンドの吸光度はフェノールレッドを含まない培地を使うことによって除くことができます。

血清中のLDH量は、動物種、血清採集前の動物の健康状態や処理状態を含むいくつかのパラメーターに応じて変動します。LDH活性は、ヒトAB血清では比較的低く、仔ウシ血清では比較的高い値を示します。血清の濃度を下げることによって、吸光度のバックグラウンドとなるLDHの量を押さえることができます(3)。一般的に、血清濃度を5%まで低下させると、細胞の増殖に影響することなく、バックグラウンドを著しく下げることができます。細胞による細胞傷害試験において血清の代わりに1%のBSAを使用することは薦められません。

B. CytoTox 96® Assay のコントロール

CytoTox 96® Assay では下記のような5種類のコントロールを行う必要があります。コントロール#2と#3(ターゲット細胞が自然に放出するLDHのコントロールおよびターゲット細胞が最大にLDHを放出した場合のコントロール)は、標準的な⁵¹Cr放出アッセイで行われるものと同一です。残りの3種類のコントロールは、他の構成要素に起因するLDHを測定するためのコントロールです。

- # 1. **Effector Cell Spontaneous LDH Release(エフェクター細胞が自然に放出するLDHのコントロール)**: エフェクター細胞から自然に放出されるLDHに起因するバックグラウンドを補正します。
- # 2. **Target Cell Spontaneous LDH Release(ターゲット細胞が自然に放出するLDHのコントロール)**: ターゲット細胞から自然に放出されるLDHに起因するバックグラウンドを補正します。
- # 3. **Target Cell Maximum LDH Release(ターゲット細胞が最大にLDHを放出した場合のコントロール)**: 100%のLDHが放出された場合の測定値を決定するための計算に必要となります。
- # 4. **Volume Correction Control(液量補正用コントロール)**: Lysis Solution (10 ×)の添加による液量の変化を補正します。
- # 5. **Culture Medium Background(培養液のバックグラウンド用コントロール)**: 培養液中の血清に由来するLDH活性や培地に含まれるフェノールレッドによるバックグラウンドを補正します。

IV. ターゲット細胞数の最適化

さまざまなターゲット細胞のタイプ(YAC-1、K562、Daudiなど)では、それぞれに含まれるLDH量が異なります。そのため、CytoTox 96® Assayでの最適なターゲット細胞数を決定し、十分なS/N比が得られるように、目的とするターゲット細胞の予備実験の実施を推奨します(図2)。添付のLDH Positive ControlはLDHアッセイが正しく機能しているかどうか評価するために使います。

準備するもの

(溶液の組成はセクションIX.Aをご覧ください)

- ・丸底またはV底の96ウェル組織培養プレート
- ・マルチチャンネルピペッター
- ・オプション：PBS + 1% BSA (ウシ血清アルブミン)

A. アッセイプレートの準備

1. 丸底またはV底の96ウェル組織培養プレートに段階希釈したそれぞれのタイプのターゲット細胞を3または4セット準備する。細胞毒性試験に使う時と同一の培養液と最終液量で準備する。通常の場合、50µl/ウェルのターゲット細胞と50µl/ウェルのエフェクター細胞を同時に培養するならば、100µl/ウェルで段階希釈を行う。
2. 細胞を含まないCulture Medium Background用に3または4セットのウェルを用意する。
3. **オプション:** LDH陽性コントロールの測定が必要な場合、LDH Positive Controlをボルテックスで穏やかに攪拌し、この溶液2µlを10ml PBS(1% BSAを含む)で希釈する(5,000倍希釈)。このストック溶液は用時調整する。細胞を含んだウェルで使われている量と等量を使う。3または4サンプルでの実施を推奨します。

B. 細胞の溶解と上清の回収

1. すべてのウェルに培養液100µlに対してLysis Solution(10 ×) 10µlを加える。
2. 37 °Cに設定した5% CO₂を含む湿式チャンバーで45分間インキュベートする。
3. 250 × g、室温で4分間プレートを遠心する。

C. LDHの測定

1. すべてのウェルから50µlずつを新規の96ウェル平底プレートに移す。
2. Assay Bufferを融解し、12ml取る。残りはすぐに20 °Cに戻して保存する。37 °Cの恒温水槽でAssay Bufferを融解することもできますが、必要以上に37 °Cで放置しないでください。
遮光した状態で、12ml Assay Bufferを室温に戻す。室温に戻したAssay BufferをSubstrate Mixのボトルに加える。基質を溶解するためにゆっくりと転倒混和する。1本のボトルには96ウェルプレート2枚をアッセイするために十分な量の基質が含まれています。溶解後の溶液は、強力な直射光から保護し、すぐに使用する。
3. 溶解したSubstrate Mixをプレートの各ウェルに50µlずつ加える。プレートをアルミホイルで覆うか、小さな暗箱に入れ、遮光する。30分間室温でインキュベートする。

注意: Target Cell Maximum LDH Releaseを得るためのLysis Solution(10 ×)の添加に代り、凍結/融解による細胞溶解を行った場合、Volume Correction Controlは行う必要がありません。

備考: プレートを-70 °Cで約30分間インキュベートし、37 °Cで15分間の融解により細胞を溶解することでステップ1と2に置き換えることができます。その後、ステップ3に進みます。

備考: 溶解したSubstrate Mixの残りはキャップを強く締めて-20 °Cに保存します。6~8週間以内なら使用できます。

4. Stop Solution を各ウェルに 50 μ l ずつ加える。
5. シリンジの針を使って大きな気泡を除き、Stop Solution の添加から 1 時間以内に 490nm または 492nm の吸光度を測定する。
6. Culture Medium Control のバックグラウンドで得られる吸光度の少なくとも 2 倍以上の吸光度の値が得られるターゲット細胞の濃度を決定する。

注意 : 通常の実験で、1 ウェルあたりに 100 μ l のターゲット細胞と 100 μ l のエフェクター細胞を同時に培養している場合、1 ウェルあたり 50 μ l の液量で同じ細胞数を同時に培養することで感度を上昇させることができます。この操作により放出される LDH の濃度は上がります。

希釈したターゲット細胞を調整する (0、5,000、10,000、20,000 cells/100 μ l)

V 底の 96 ウェルプレートに 1 ウェルあたり 100 μ l を加える

Lysis Solution (または凍結/融解) により細胞を破裂させる

250 × g で 4 分間プレートを遠心する

上清 50 μ l を酵素アッセイプレートに移す

Assay Buffer で Substrate Mix を溶解する

酵素アッセイプレートに 1 ウェルあたり 50 μ l の溶解した Substrate Mix を加える

遮光し、室温で 30 分間インキュベートする

各ウェルに 50 μ l の Stop Solution を加える

490nm の吸光度を測定する

図 2. ターゲット細胞数の最適化

V. 細胞を介した細胞毒性試験

A. アッセイプレートの準備

以下のガイドラインに従い、96ウェルプレートを準備する。それぞれの実験およびコントロール反応は3または4つの同一反応を行う。推奨するプレート準備の一例を図3に示す。

- 1. Effector Cell Spontaneous LDH Release (エフェクター細胞から自然に放出されるLDH量を測定するためのコントロール):** エフェクター細胞から自然に放出されるLDH量を測定するために、培養液を入れた3または4つのウェルに、実験で使用する**それぞれの細胞濃度**になるようにエフェクター細胞を加える。ここでの最終容量は実験用ウェルと**同一でなければなりません**(細胞を含まない培養液を使用して容量を合わせる)。
- 2. 実験用ウェル:** V底または丸底の96ウェル培養プレートのすべての実験用ウェルへ一定数(セクション4で決定された数値)のターゲット細胞を加える。いくつかのエフェクター細胞: ターゲット細胞の比率を試験するために、いろいろな数のエフェクター細胞を3または4セットのウェルに加える。両方の細胞を合わせた最終容量は少なくとも100 μ l/ウェルにする。
- 3. Target Cell Spontaneous LDH Release (ターゲット細胞から自然に放出されるLDH量を測定するためのコントロール):** 培養液を入れた3または4セットのウェルへターゲット細胞(セクション4で決定した細胞数)を加える。最終容量は、ターゲット細胞とエフェクター細胞を入れた実験用ウェルと同じにしなければなりません(容量を調整するためには培養液を使う)。
- 4. Target Cell Maximum LDH Release (ターゲット細胞が最大にLDHを放出した場合のコントロール):** 培養液を入れた3または4セットのウェルへターゲット細胞(セクション4で決定した細胞数)を入れる。最終容量は実験用ウェルと同じにしなければなりません。100 μ lの培養液あたり10 μ lのLysis Solution(10 \times)を添加する。これにより、Triton[®] X-100の濃度はターゲット細胞を完全に溶解するのに十分な約0.8%となる。Lysis Solutionを加えたターゲット細胞を、上清回収前に45分間インキュベートする。
- 5. Volume Correction Control (液量補正用コントロール):**100 μ lの培養液(細胞を含まない)を加えた3または4セットのウェルに10 μ lのLysis Solution(10 \times)を加える。このコントロールは、Lysis Solution(10 \times)の添加に伴い生じる容量変化を補正するために行う。この容量変化は吸光度の測定値に影響を与えるフェノールレッドと血清の濃度に影響する。
- 6. Culture Medium Background (培養液のバックグラウンド測定用コントロール):**3または4セットのウェルへ100 μ lの培養液を加える。このコントロールは、培養液中の血清に由来するLDH活性によるバックグラウンド、および培養液中に存在するフェノールレッドによるバックグラウンドを補正するために必要となります。
- 7. オプション:LDH Positive Control (LDHの陽性コントロール):**キットの性能チェックを行うために、プロメガでは陽性コントロール(ウシ心臓LDH)を添付しています。陽性コントロールの測定を行う場合は、LDH Positive Controlをボルテックスで穏やかに攪拌し、この溶液2 μ lを10mlのPBS + 1% BSAに希釈する(5,000倍希釈)。このストック溶液は使用ごとに新しいものを調製してください。5,000倍希釈したLDH Positive Controlは、約13,500個のL929繊維芽細胞溶解物から検出される酵素活性と同等になります。
- 8. エフェクター細胞とターゲット細胞の接触を確実にするために、250 \times gで4分間アッセイプレートを遠心する。**

D. 結果の計算

1. 実験試料、Target Cell Spontaneous LDH Release、Effector Cell Spontaneous LDH Release で得られた吸光度の値から、平均した Culture Medium Background の値を差し引く。
2. Target Cell Maximum LDH Release Control で得られた吸光度の値から Volume Correction Control の吸光度値の平均を差し引く。
3. 上記のステップ1と2で得られた補正值を使い、各々のエフェクター細胞：ターゲット細胞の比率ごとに、以下の計算式にしたがって細胞毒性のパーセントを算出する。

$$\% \text{細胞毒性} = \frac{\text{実験試料} - \text{Effector Spontaneous} - \text{Target Spontaneous}}{\text{Target Maximum} - \text{Target Spontaneous}} \times 100$$

サンプルの計算の実際例

以下のサンプルの計算は、CytoTox 96® Assay を用いて下記の実験条件で行った結果から得られた図4のデータに基づいて行っています。

エフェクター細胞：オスの C3H/HeJ マウスから作成された NK/LAK 細胞。ナイロンウール非接着性脾臓細胞は細胞毒性試験に使う前に、リコンビナントヒト IL-2(500ng/ml) を添加し、5日間培養した。

ターゲット細胞：アッセイで使用するまで完全な浮遊培養細胞株として維持されていた YAC-1 細胞。

アッセイで使用した培養液：フェノールレッドを含む RPMI 1640 + 15mM HEPES + 5% FBS

プレート：96 ウェル丸底プレート

ターゲット細胞のプレATING：1 ウェルあたり 50µl の培養液中に 10,000 個のターゲット細胞

エフェクター細胞のプレATING：50µl の培養液に 10:1 から 0.02:1 の比率とする。

インキュベーション：5%CO₂ 存在下、37 °C で 4 時間。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	.477	.478	.641	.549	.501	.515	.490	.485	.503	.496	.459	.480
B	.469	.436	.660	.541	.513	.501	.478	.478	.495	.482	.451	.472
C	.471	.470	.644	.548	.521	.499	.498	.470	.502	.476	.474	.471
D	.474	.472	.661	.552	.528	.501	.491	.483	.490	.485	.484	.475
E	.638	.443	.816	.686	.619	.556	.499	.501	.515	.481	.497	.478
F	.655	.447	.809	.705	.610	.554	.529	.495	.511	.477	.504	.486
G	.664	.446	.824	.697	.620	.558	.520	.497	.495	.483	.462	.484
H	.680	.440	.829	.709	.593	.563	.523	.511	.511	.485	.489	.493
			10:1	5:1	2.5:1	1.25:1	0.62:1	0.31:1	0.16:1	0.08:1	0.04:1	0.02:1

Effector:Target Cell Ratios

図4. プロメガで行った CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay での代表的なデータ。
これらのデータを作成するために使われた条件はこのセクションで前に示した。

1. 実験試料、細胞比 10:1 (平均値) – Culture Medium Background (平均値) =
0.819 – 0.464 = **0.355**

Target Spontaneous (平均値) – Culture Medium Background (平均値) =
0.472 – 0.464 = **0.008**

Effector Spontaneous (平均値) – Culture Medium Background (平均値) =
0.651 – 0.464 = **0.187**

2. Target Maximum (平均値) – Volume Correction Control (平均値) =
0.659 – 0.444 = **0.215**

3. %細胞毒性 = $\frac{\text{実験試料} - \text{Effector Spontaneous} - \text{Target Spontaneous}}{\text{Target Maximum} - \text{Target Spontaneous}} \times 100$

$$\begin{aligned} \% \text{細胞毒性} &= \frac{0.355 - 0.187 - 0.008}{0.215 - 0.008} \times 100 \\ &= \mathbf{77.3\%} \text{ (エフェクター細胞対ターゲット細胞の比率が 10:1 の場合)} \end{aligned}$$

VI. 単一細胞種を用いた試験

A. 総細胞数の試験

CytoTox 96® Assay では、インタクトな細胞の細胞質に存在するラクテートデヒドロゲナーゼ活性を間接的に測定します。そのため、細胞中に存在する LDH を放出するために細胞が溶解される場合にのみ、細胞数の測定が行えます。ある種の界面活性剤(SDSやcetrimide)では最終的な赤色を呈するホルマザン産物の生成を阻害することが示されました。しかし、CytoTox 96® Assay に含まれる Lysis Solution は細胞溶解に使うことができ、推奨するように使えばアッセイを阻害しません。目的の細胞サンプルは、100µl の培養液あたり 15µl Lysis Solution(10 ×)(容積比9%となるよう Triton® X-100 を水に溶解)の添加とそれに続く 37 °C、45~60 分のインキュベーションにより溶解されます。サンプルの上清(50µl)を新規の酵素アッセイ用の96ウェルプレートに移します。溶解したSubstrate Mix(50µl)をそれぞれの上清サンプルに加え、遮光した状態で室温30分間の酵素反応を行います。酵素アッセイを1ウェルあたり50µl Stop Solutionの添加により止めます。ELISA プレートリーダーを用いて490nmの吸光度を測定します。存在する細胞数はLDH活性に相当する吸光度の値に対して直接比例します。結果として得られたデータは、Y軸に490nmの吸光度の値、X軸に細胞数をとってプロットできます。図5にこれらのステップの要約を示します。

実験用ウェルに細胞を加える。

バックグラウンドコントロール用として、別のウェルに培養液を加える。

すべてのウェルに Lysis Solution(10 ×)を加え、37 °C で 45~60 分間インキュベーションする。

酵素アッセイ用プレートに50µlの上清を移す。

(オプション) 細胞を加えていない空いたウェルに5,000倍希釈したLDH Positive Controlを加える。

Assay Buffer を使って、Substrate Mix を溶解する。

酵素アッセイ用プレートの各ウェルに溶解したSubstrate Mixを50µlずつ加える。

プレートを遮光し、室温で30分間インキュベーションする。

各ウェルに50µl Stop Solutionを加える。

490nmの吸光度を記録する。

図5. 総細胞数を測定するための改良型CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assayのプロトコール

B. 細胞毒性の試験

CytoTox 96® Assay は、細胞毒性を示す薬剤による処理で起こるような、単一細胞種の死(つまり、エフェクター細胞を使わない)を培養液中で測定するために使うこともできます(10)。N-methyl-D-aspartate(NMDA)レセプターのトランスフェクションによって開始された細胞死(11)を測定するために CytoTox 96® Assay を使ったプロトコルの例を図6に示しました。

調整手順

リン酸カルシウム法を使い、必要とするNMDAレセプターのサブユニットをコードする遺伝子をHEK 293細胞にトランスフェクションし、インキュベートする(12)。

20時間後、細胞死によって放出されたLDH量を評価するため培養液をサンプルとして回収する。4 で5分間遠心した後、培養液で希釈し、96ウェルプレートに移す。

トランスフェクションされた細胞を凍結/融解で溶解し、溶解液を回収した後、上記の処理を行い最大のLDH活性を評価する。

細胞から自然に放出されるLDHを測定し、フェノールレッドや血清中に含まれる内在性のLDH活性を補正する。

アッセイ手順

溶解した Substrate Mix (50µl) をそれぞれのサンプルに加える。

アッセイ用プレートを遮光し、室温で30分間インキュベートする。

Stop Solution を加え、490nmの吸光度を測定する。

サンプルの吸光度の読み値からバックグラウンドの値を差し引く。

以下の式を使って細胞死のパーセントを決める。

$$\% \text{細胞毒性} = \frac{\text{Experimental LDH release (OD}_{490})}{\text{Maximum LDH release (OD}_{490})}$$

図6. NMDAレセプターのトランスフェクションにより開始された細胞死(11)を測定するための改良型 CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay のプロトコル(単一細胞種を使った細胞毒性試験)

VII. 困った時には...

トラブルの症状	可能性のある原因	コメント
バックグラウンド吸収が高い。	培養液中の動物血清に由来する内在性LDHによる。	このバックグラウンド吸収は通常 Culture Medium Background Control で補正できます。バックグラウンド吸収を減少させるには、血清を変更したり血清濃度を減らしてください。血清中のLDH活性は血清の種類により異なり、ヒトAB血清、ウマ血清、ウシ胎児血清、ウシ血清の順でLDH活性は増加します。一般には、血清濃度を5%まで下げても、細胞の生存に影響を与えることなくバックグラウンドを有意に低下させます。細胞性の細胞傷害アッセイでは、血清の代わりに1%のBSAを使用することはお薦めしません。
	培養液中のフェノールレッドによる。	このバックグラウンド吸収は通常 Culture Medium Background Control で補正できます。フェノールレッド不含培養液を使用します。
Effector Cell Spontaneous LDH Release Control または Target Cell Spontaneous LDH Release Control の値が高い。	最適ではない培養条件や取り扱いにより、細胞膜が破損を生じた。	細胞密度を低く ($1.5 \times 10^6 \text{ cells/ml}$) 抑え、新鮮な培養液で維持します。培養液や洗浄バッファの大きな温度変動を避けます。細胞を再懸濁する場合は強いピペティングを避け、遠心時のGを250 × g以下にします。
観察される細胞傷害性の比率 (%) が低い。	簡便な定量をおこなうのには、細胞傷害性の比率 (%) が低すぎる。	細胞傷害性の比率 (%) を増加させたい場合には、細胞傷害性をもたらす細胞とターゲット細胞とのインキュベーション時間を、本来の4時間から6~8時間へ延長します (セクション V.B.3)。一晩インキュベートすると細胞の増殖により正確な結果が得られないことがあるため、お薦めしません。
吸光度がプレートリーダーの直線性範囲を超える。	プレートウェル中に気泡がある。	注射針で静かに気泡をこわし、再度吸収の読み取りを行ないます。
	LDH 活性が高すぎる。	アッセイをやり直しますが、その際にLDH反応時間 (セクション V.C.3) を15~20分間に短縮します。
全般にわたり吸光度が低い。	プレートリーダーの吸光度測定波長の設定が誤っている。	プレートリーダーの測定波長を490nmか492nmに設定し、もう一度吸収を測定します。
	光により基質が分解された。	基質の調整およびLDH反応 (セクション V.C.2およびV.C.3) が遮光下でおこなわれていることを確認します。
Target Cell Maximum Release の値が低い。	ターゲット細胞の数が最適化されていない。	アッセイ (セクション IV) に用いるターゲット細胞の数を最適化します。

VIII. 参考文献

1. Nachlas, M.M. *et al.* (1960) The determination of lactic dehydrogenase with a tetrazolium salt. *Anal. Biochem.* **1**, 317.
2. Korzeniewski, C. and Callewaert, D.M. (1983) An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. *J. Immunol. Meth.* **64**, 313.
3. Decker, T. and Lohmann-Matthes, M.L. (1988) A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *J. Immunol. Meth.* **115**, 61.
4. Brander, C. *et al.* (1993) Carrier-mediated uptake and presentation of a major histocompatibility complex class I-restricted peptide. *Eur. J. Immunol.* **23**, 3217.
5. Behl, C. *et al.* (1994) Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity. *Cell* **77**, 817.
6. Lappalainen, K. *et al.* (1994) Comparison of cell proliferation and toxicity assays using two cationic liposomes. *Pharm. Res.* **11**, 1127.
7. Allen, M.J. and Rushton, N. (1994) Use of the CytoTox 96™ Assay in routine bio-compatibility testing in vitro. *Promega Notes* **45**, 7.
8. Sinensky, M.C., Leiser, A.L. and Babich, H. (1995) Oxidative stress aspects of the cytotoxicity of carbamide peroxide: in vitro studies. *Toxicol. Lett.* **75**, 101.
9. Moravec, R. (1994) Total cell quantitation using the CytoTox 96™ Non-Radioactive Cytotoxicity Assay. *Promega Notes* **45**, 11.
10. Singer, C.A. *et al.* (1999) The mitogen-activated protein kinase pathway mediates estrogen neuroprotection after glutamate toxicity in primary cortical neurons. *J. Neurosci.* **19**, 2455.
11. Miroslav, C. *et al.* (1995) Using Promega's CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay to measure cell death mediated by NMDA receptor subunits. *Promega Notes* **51**, 21.
12. Gorman, C.M., Gies, D.R. and McCray, G. (1990) Transient production of proteins using an adenovirus transformed cell line. *DNA Prot. Eng. Technol.* **2**, 3.

IX. 付録

A. バッファーと溶液の組成

PBS + 1% BSA

0.2g/l KCl

8.0g/l NaCl

0.2g/l KH₂PO₄1.15g/l Na₂HPO₄

1%(w/v) bovine serum albumin

脱イオン水に溶解し、使用する前にフィルター濾過滅菌する

Lysis Solution (10 ×)

9% (v/v) Triton[®] X-100

Stop Solution

1M acetic acid

B. 関連製品の紹介

製品名	サイズ	カタログ番号
CellTiter 96 [®] Non-Radioactive Cell Proliferation Assay	1,000 回分	G4000
	5,000 回分	G4100
CellTiter 96 [®] AQ _{ueous} Non-Radioactive Cell Proliferation Assay ^(a)	1,000 回分	G5421
	5,000 回分	G5430
	50,000 回分	G5440
CellTiter 96 [®] AQ _{ueous} MTS Reagent Powder ^(a)	1g	G1111
	250mg	G1112
CellTiter 96 [®] AQ _{ueous} One Solution Cell Proliferation Assay ^(a)	200 回分	G3582
	1,000 回分	G3580
	5,000 回分	G3581

(a)The MTS tetrazolium compound is the subject of U.S. Pat. No. 5,185,450 assigned to the University of South Florida and is licensed exclusively to Promega Corporation.

© 1992–2000 Promega Corporation. All Rights Reserved.

CellTiter and CytoTox 96 are trademarks of Promega Corporation and are registered with the U.S. Patent and Trademark Office.

Triton is a registered trademark of Union Carbide Chemicals and Plastics Co., Inc.