

細胞毒性スクリーニングを簡便に！

CellTiter-Blue™ Cell Viability Assayのご紹介

By Terry Riss, Ph.D., and Rich Moravec, B.S., Promega Corporation

アブストラクト

In vitroでの細胞生存性測定をお手伝いするために、プロメガはCellTiter-Blue™ Cell Viability Assayを新しく発売しました。このアッセイは、マルチウェルプレートで生存細胞の数を検定するために開発された蛍光検出によるホモジニアスタイプのシステムです。操作は簡便で、1種類の試薬を血清を含む培地で培養した細胞に直接加えるだけです。本稿では、アッセイ方法と自動化細胞毒性スクリーニングの利点について記述しています。

CellTiter-Blue™ Cell Viability Assayは、生存細胞が酸化還元色素（レザズリン）を蛍光産物（レゾルフィン）に変換する能力を利用しています。ホモジニアス法は、培地中の細胞に直接1種類の試薬を加えるだけの簡便性を与えます。

はじめに

in vitroにおける細胞集団の生存性は、様々な実験手法で測定することができます。細胞の生存性を示すために用いられるパラメーターの1つは、代謝プロセスの活性が維持されているか否かを見ることです。生存細胞は、必要不可欠な構成成分の合成や膜電位の維持など、ホメオスタシスの維持に必要なエネルギーを生成するために代謝反応を行う必要があります。細胞がin vitroで膜の完全性を失うと、代謝プロセスを実行する能力が失われ、死を意味することになります。細胞生存性をモニタリングする方法の1つとして、代謝活性により測定可能な最終産物を生成する指示色素を利用するものがあります。

CellTiter-Blue™ Cell Viability Assay

CellTiter-Blue™ Cell Viability Assayは、ホモジニアス法を採用し、蛍光で細胞の生存性をモニタリングすることができるシステムです。このアッセイ法は、生細胞が酸化還元色素（レザズリン）を蛍光産物（レゾルフィン）に変換する能力を利用しています。CellTiter-Blue™ Reagentは、細胞生存試験で使用するために最適化されています。生存細胞はレザズリンをレゾルフィンに還元する能力を保持しています（図1）。生存性を失った細胞は代謝能が急速に失われるため、蛍光シグナルを生じません。CellTiter-Blue™ Reagentは、カイネティクス法としてよりもエンドポイントアッセイとして細胞増殖モニタリングを行うようにデザインされています。従って、テスト化合物暴露の終了時に本試薬を加えます。CellTiter-Blue™ Reagentのスペクトル特性は、レザズリンがレゾルフィンに還元されることにより変化します。レザズリンは濃青色でそれ自体には蛍光はほとんどありませんが、レゾルフィンに還元されるとピンク色の強い蛍光を生じます。CellTiter-Blue™ Reagentの可視光の吸収スペクトルは、レザズリンがレゾルフィンに還元されると青方偏移を受けます。レザズリンの最大吸収波長は605nm、還元されたレゾルフィンは573nmです。蛍光および比色のどちらでも定量することができますが、感度の高い蛍光による検出法をお勧めします。

CellTiter-Blue™ Assayのプロトコルの概要を図2に示します。ホモジニアスアッセイ法は、血清を含む培地で培養した細胞に直接1種類の試薬を加えるだけです。インキュベーション後、プレート用のフルオロ

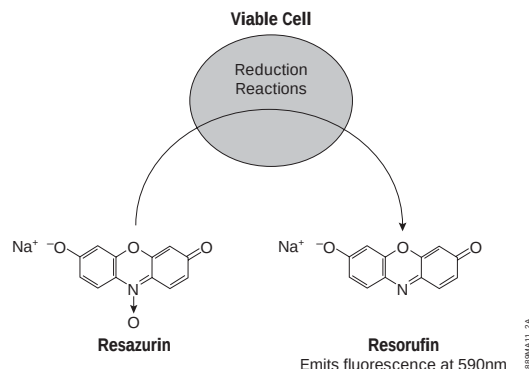


図1. CellTiter-Blue™ Cell Viability Assayの測定原理

蛍光産物は生存細胞の数に比例する。

メーターまたは分光光度計で測定することができます。細胞の洗浄、培地の除去、複数回のピペッティングは不要なので、細胞の生存または毒性試験の自動化ハイスループットスクリーニングに理想的です。

直線性と感度

多くの実験条件下で、CellTiter-Blue™ Reagentからの蛍光シグナルは生存細胞の数に比例します（図3）。直線範囲と検出限界は細胞のタイプに依存します。例えば、HepG2細胞はJurkat細胞に比べ高い代謝率を持っているため、より高いレザズリン還元能を有します。異なる細胞タイプにおけるレザズリン還元能は、細胞の代謝率やCellTiter-Blue™ Reagentとのインキュベーション時間により異なります。多くのアプリケーションでは1〜4時間のインキュベーション時間が標準的です。スクリーニングアッセイでのパフォーマンスを最適化するには、1ウェルあたりの細胞数やインキュベーション時間を経験的に決定する必要があります。

検出限界や直線的な応答範囲もインキュベーション時間に依存します。図4では、インキュベーション時間を22時間に延長することにより、少細胞数におけるS/N比が改善され、感度が上昇したことを示しています。しかし、インキュベーション時間の延長は、アッセイのダイナミックレンジを低下させる恐れもあります。図4のデータでは、4時間のインキュベーション時における検出限界390個細胞/ウェルが、インキュベーションを22時間に延ばすことにより49個細胞/ウェルに向上したが、蛍光と細胞数との相関性が12,500個細胞/ウェル以上では直線性を示さなくなったことを示しました。

その他のアッセイ法との比較

CellTiter-Blue™ Assayとその他の細胞生存性/毒性試験法には非常に高い相関性があります。CellTiter-Blue™ AssayとCellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay（カタログ番号 G3582; 細胞の生存性をMTSテトラゾリウムの還元により生じる呈色産物フォルマザンを測定することにより検出）およびCellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay（カタログ番号 G7570: ATP含量を測定）から得られた結果を比較しました。これらのアッセイで得られたIC₅₀値には高い相関性が認められました(1)。

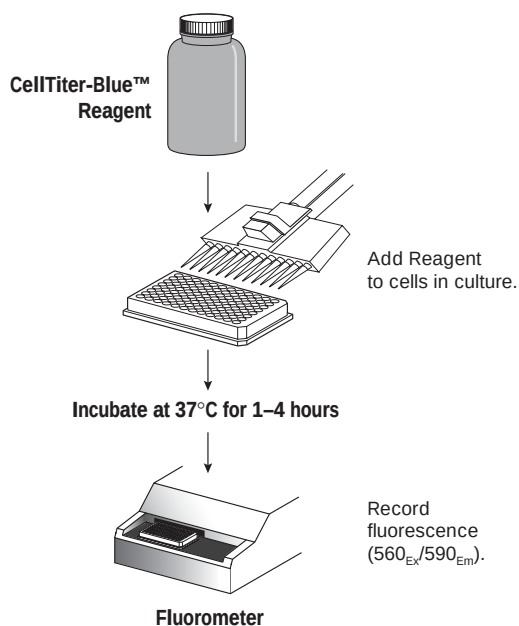


図2. CellTiter-Blue™ Cell Viability Assayのプロトコルの概要

蛍光プレートリーダーに適応するマルチウェルプレート（96または384ウェル）に、標準的な方法に従い細胞とテスト化合物を調製した。CellTiter-Blue™ Reagentを各ウェルに直接添加し、レサズリンをレゾルフィンに変換させるために細胞を37°Cでインキュベーションした後、蛍光信号を測定した。

図5では、HepG2細胞におけるタモキシフェンの影響を示しています。得られたデータはCellTiter-Blue™ AssayおよびCytoTox-ONE® Homogeneous Membrane Integrity Assay（カタログ番号G7890: 細胞毒性試験において細胞膜の完全性を測るマーカーとして一般的に使用されるLDHの放出を測定）を使用しました。タモキシフェン濃度が上昇するに従いHepG2への細胞毒性は高まりCellTiter-Blue™ Assayで得られる蛍光信号は減少しました。生存性のインジケータであるレサズリンの還元と細胞毒性のインジケータであるLDH放出には逆相関性が認められました。2つのアッセイ方法で決定されたIC₅₀値は同様の値を示しました。

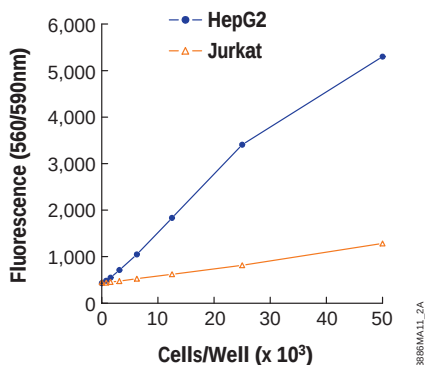


図3. 異なる細胞タイプのレサズリン還元能の比較

2倍希釈系列のJurkatおよびHepG2細胞（100μl/ウェル）を96ウェルプレートに調製し、37°Cで1.5時間培養した。CellTiter-Blue™ Reagent（20μl/ウェル）を添加した細胞を1時間インキュベートし、Labsystems Fluoroskan Ascent plate reader（560(20)Ex/590(10)Em）で蛍光を測定した。

CellTiter-Blue™ Reagentの使用量

CellTiter-Blue™ Reagentは、96または384ウェルプレートで正確なピペティングが行えるように使いやすいボリュームに設計されています。CellTiter-Blue™ Reagentは、96ウェルフォーマットでは培地 100μlに対して20μl、384フォーマットでは培地25μlに対して5μl加えます。Labsystem社のFluoroskan Ascent Plate reader [560(20)Ex/590(10)Em フィルター] を使用し、このCellTiter-Blue™ Reagentと培地の比率を用いた場合、市販されるレサズリン系のアッセイに比べ、高い蛍光信号、低い蛍光バックグラウンドを示しました。CellTiter-Blue™ Reagentと細胞培養量の比率は、パフォーマンスを上げるために調整することもできます。

レサズリンが還元される場所

レサズリンが、生細胞の中でレゾルフィンに還元されていることが顕微鏡による観察で示されています(2)。レサズリンは細胞内に入ることができ、そこで様々な還元酵素により蛍光物質レゾルフィンに還元されると考えられます。蛍光レゾルフィン、周囲の培地に拡散します。急速に成長する細胞から採取した培養培地だけではレサズリンを還元しません(2)。様々な肝性細胞成分分画を用いた分析では、レサズリンがミトコンドリア、細胞質、ミクロゾームの酵素により還元されることを示唆しています(3)。

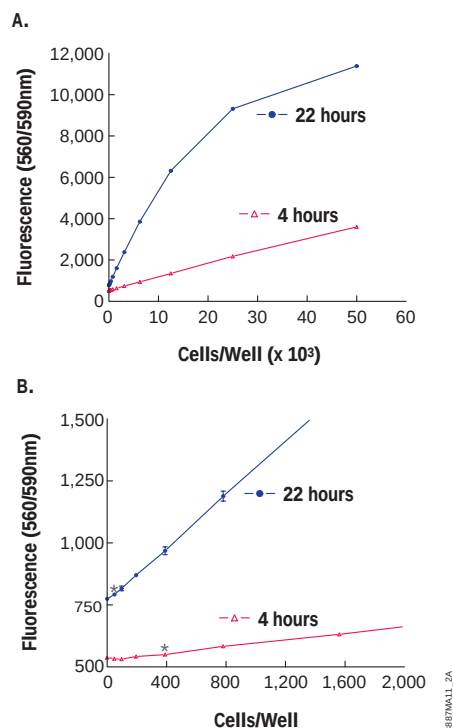


図4. シグナル生成に対するCellTiter-Blue™ Assayインキュベーション時間の影響

2倍希釈系列のJurkat細胞（0～50,000個）をCellTiter-Blue™ Reagentとともに4時間または22時間インキュベーションした。パネルA. 4時間のインキュベーション時間で蛍光と細胞数の間に直線的な相関性 ($r^2=0.99$) を示した。検出限界は390個細胞/ウェル。22時間のインキュベーションでは、検出限界を49個細胞/ウェルまで感度上昇させたが、12,500個細胞/ウェル以上における直線性を失った。パネルB. 0～2,000個細胞/ウェルのレンジ幅での相関性。4時間のインキュベーション後、390個細胞でのシグナルは、0個細胞+3標準偏差での値よりも高い値を示した。22時間のインキュベーション後、49個細胞でのシグナルは、0個細胞+3標準偏差 ($n=4$) の値よりも高い値を示した。

アッセイコントロール

テスト化合物の内因性の蛍光およびレザズリンの還元に対する科学的な干渉をチェックするために、細胞を含まない培地のみのネガティブコントロールをセットすることを推奨します。アッセイ系に対する干渉の可能性をテストするために、ネガティブコントロールのウェルにテスト化合物を溶かす溶媒を加えます。また、細胞毒性のポジティブコントロールとして、ご自身のモデルシステムに既知の細胞毒性化合物で処理した細胞を含むウェルセットを加えることを推奨します。

レザズリンとレゾルフィンの光学的特徴

CellTiter-Blue™ Reagentの吸光および蛍光特性は、レザズリンからレゾルフィンへの細胞内還元により変化するので、吸光および蛍光の測定とともに結果のモニタリングに使用することができます。RPMI1640+10%ウシ胎児血清中でのレザズリンの最大吸収波長は605nmで、レゾルフィンの最大吸収波長は573nmです(1)。吸光度測定でデータをとる場合、570nmで読み取り、600nmを参照波長として使用するをお勧めします。その値は細胞を含まないCellTiter-Blue™ Reagentを含むブランクと比較することができます。レザズリンおよびレゾルフィンの最大吸収波長は比較的広いため、570nmまたは600nmのフィルターの無い機器を利用する場合に異なる波長でも測定することができます。しかし、通常は、感度とダイナミックレンジの広さから、データを得る場合、蛍光を用いることを推奨します。蛍光フィルターセットのオプションとして、励起フィルターでは530~570nmと蛍光フィルターでは580~620nmがあります。

異なるアッセイとのマルチプレックス

CellTiter-Blue™ Reagentは、短時間処理の場合、細胞の破壊性は比較的低いため、同じ培養ウェルを用いて2種類以上のアッセイを行うことができます。例として、CellTiter-Blue™ Reagentを用いた細胞生存性試験とApoONE® Homogeneous Caspase-Assay (カタログ番号G7790)を用いたアポトーシス測定を図6に示します。

レザズリンのバックグラウンド蛍光と光感受性

CellTiter-Blue™ Reagentのレザズリン色素とその産物であるレゾルフィンは光に感受性を持ちます。CellTiter-Blue™ Reagentに光を当て続け

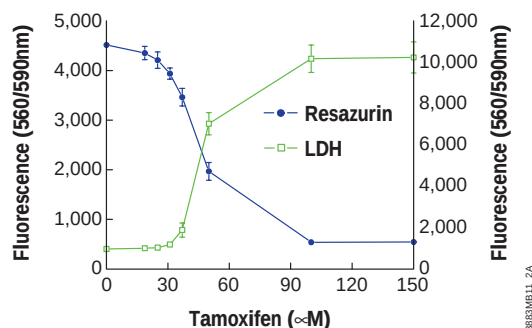


図5. CellTiter-Blue™ ReagentとLDHベースのCytoTox-ONE® Homogeneous Membrane Integrity Assayの比較

HepG2細胞を96ウェルプレートに15,000個細胞/ウェルで播種 (10% FBS、非必須アミノ酸、1mM ビルビン酸ナトリウム含有90μl MEM培地) し、37°C、24時間培養した。タモキシフェンを培養培地で希釈 (0~150μM) した。CytoTox-ONE® (LDH) Assayを行うプレートはCytoTox-ONE® Reagentを加える前に22°Cまで冷ました。CellTiter-Blue™ AssayはCellTiter-Blue™ Reagentを添加後37°Cで1時間インキュベーションした。

るとバックグラウンドの蛍光が増加し、感度が低下します。バックグラウンド蛍光は細胞を含まない血清含有培養培地の蛍光を測定するために各プレートにセットしたコントロールにより補正することができます。数時間のインキュベーション後に、細胞を含まないウェルのバックグラウンド蛍光がやや増加する可能性があります。詳細な技術情報についてはCellTiter-Blue™ Cell Viability Assayに添付されるプロトコル Technical Bulletin (1)をご覧ください。

まとめ

ホモジニアスフォーマットで蛍光検出法を採用したCellTiter-Blue™ Cell Viability Assayは、自動化スクリーニングに理想的なシステムです。CellTiter-Blue™ Assayは、プロメガのISO9001品質標準下で開発されました。試薬は追跡可能な原料を使用して製造され、“CellTiter”のブランドに相応する純度を保つために厳密な品質管理が行われています。本製品の開発は、プロメガのホモジニアスな細胞生存性、細胞毒性およびアポトーシス検出アッセイのプロダクトラインへの新たな一歩を象徴しています。

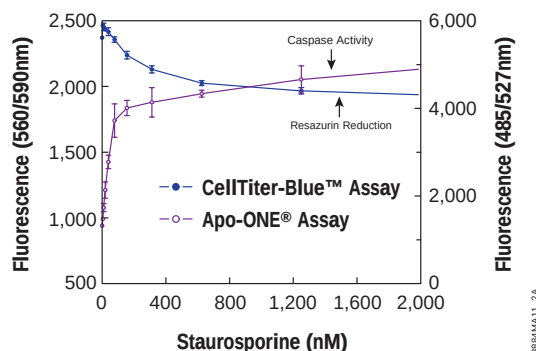


図6. 同一ウェルでのマルチプレックスアッセイ (2アッセイ)

Jarvis細胞 (100μl/ウェル) を様々な濃度のスタウロスポリンで5時間処理した。薬剤を添加後すぐにCellTiter-Blue™ Reagent (20μl/ウェル) を加え、5時間インキュベーション後に蛍光を測定 (560Ex/590Em) した。カスパーゼ活性は、同じウェルにApo-ONE® Homogeneous Caspase 3/7 Assay Reagent 120μlを加えて測定した。細胞はさらに1時間インキュベーションし、蛍光を測定 (485Ex/527Em) した。

参考文献

1. CellTiter-Blue™ Cell Viability Assay Technical Bulletin #TB317, Promega Corporation.
2. O'Brien, J. et al. (2000) *Eur. J. Biochem.* **267**, 5421–6.
3. Gonzalez, R.J. and Tarloff, J.B. (2001) *Toxicology in Vitro* **15**, 257–9.

プロトコール

- ◆ CellTiter-Blue™ Cell Viability Assay Technical Bulletin #TB317, Promega Corporation.
(www.promega.com/tbs/tb317/tb317.html)

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
CellTiter-Blue™	20ml	G8080	16,000
Cell Viability Assay	100ml	G8081	45,000
	10×100ml	G8082	390,000