

# Monitor the Ratio of Live and Dead Cells Within a Population: MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assay

## 細胞集団における生細胞・死細胞比のモニタリング： MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assay

By Andrew L. Niles, M.S.<sup>1</sup>, Richard A. Moravec, B.S.<sup>1</sup>, Michael Scurria, B.S.<sup>2</sup>, William Daily, Ph.D.<sup>2</sup>, Laurent Bernad, Ph.D.<sup>2</sup>, Brian McNamara, Ph.D.<sup>1</sup>, Pam Guthmiller, B.S.<sup>1</sup>, Kay Rashka, B.S.<sup>1</sup>, Deborah Lange, B.S.<sup>1</sup>, Michele Arduengo, Ph.D.<sup>1</sup>, and Terry L. Riss, Ph.D.<sup>1</sup>, <sup>1</sup>Promega Corporation, <sup>2</sup>Promega Biosciences, Inc.

### アブストラクト

本稿では、1つの培養ウェル内で生細胞および死細胞の相対数を測定するホモジニアス-1液タイプの新しい試薬をご紹介します。この測定技術は逆相関する細胞毒性と細胞生存性から得られるレシオメトリックな値を得ることができ、細胞数に対して補正されたデータとして有用性が発揮されます。また、この試薬は他の蛍光法または発光法に適合性を持つため、マルチプレックスアッセイにも使用することができます。

### イントロダクション

細胞ベースのアッセイ系は、in vivoでの実験を予見できる可能性を秘めるため、現在の生物学や薬剤開発の分野において重要なツールとして機能しています。しかし、細胞内の複雑性は同時に特有の生物学的変動を示す結果となり、制御因子やシグナル経路あるいはテスト化合物の体内動態プロファイルの研究においてデータの解釈を複雑にしています。そのため、研究者は実験操作後に細胞の生存性について補正を行い、実験で得られた反応結果の有効性について確認する作業を余儀なくされる場合があります。現在、細胞ベースのアッセイ系で生存性や毒性を調べるために複数の定量反応が採用されています(1)。従来、これらの定量法は第一義的反応(本来調べるべき反応)の測定とは異なるプレートで並行して行われていました。このようなアプローチは通常、費用対効果が低く、第一義的反応を検証するために研究者に2重の労力と消耗品コストを強いる結果となっていました。これまでに我々は同一の測定ウェル内で、第一標的物の測定法と生存性あるいは毒性を測定する従来法が行える様々なアプリケーションを紹介してきました(2)。これらの方法は反応結果の確認とウェル内補正を可能にします。これらのアプリケーションは有用ですが、レサズリンの吸光プロファイルに関する技術的障害により蛍光または発光の変動的な着色消光が起こることがあります。

本稿では1つの培養ウェル内で生細胞および死細胞の相対数を測定するホモジニアス-1液タイプの新しい試薬をご紹介します。この測定技術は逆相関する細胞毒性と細胞生存性から得られるレシオメトリックな値を得ることができ、細胞数に対して補正されたデータとして有用性が発揮されます。また、この試薬は他の蛍光法または発光法に適合します。

### アッセイデザインと測定反応

MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assay (カタログ番号 G9200) は、細胞生存性または毒性を測定するために細胞膜の完全性の変化を見るという点は他の測定法に類似しています。しかし、色素の排出や乳酸脱水素酵素(LDH)漏出の代わりにMultiTox-Fluor Assay技術では細胞生存性または細胞毒性のマーカーとして識別可能な2種類のプロテアーゼ活性を同時に測定します。操作上、2つの蛍光基質は生理緩衝液に溶かし、細胞培養ウェルに運ばれます(図1、2)。生細胞由来のプロテアーゼ活性はインタクトな生存細胞に限定され、細胞透過性の蛍光前駆ペプチド基質Gly-Phe-7-amino-4 trifluoromethyl coumarin (GF-

AFC)を用いて測定します。この基質はインタクトな細胞に入り、切断されて生細胞数に比例した蛍光シグナルを生じます。この生細胞由来プロテアーゼ活性マーカーは、細胞膜の完全性が失われて周囲の培地に漏出すると不活性化されます。2番目の蛍光前駆ペプチド基質bis-(Ala-Ala-Phe)-rhodamine 110 (bis-AAF-R110)は細胞非透過性で、細胞膜の完全性が失われると細胞から漏出する死細胞由来のプロテアーゼ活性の測定に使用されます。

### マルチプレックスシグナルの分離と測定

MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assayでは光学的に分離可能な蛍光産物を使用します。多くの蛍光色素と同様にAFCおよびR110の励起、蛍光プロファイルにはピークから離れた部分で幾分オーバーラップします。これは、フルオロメーターで励起および蛍光シグナルのピークに近く、それぞれのシグナルを分離するバンドパスフィルターセットを選ぶことで回避することができます。遊離したAFC蛍光物質およびR110蛍光物質をフルオロメーターで測定します(励起波長400nm, 蛍光波長505nm)(3)。またR110産物は励起波長485nm, 蛍光波長520nmで測定します(4; 図3)。ここで示した波長を変えることはアッセイの感度やパフォーマンスにマイナスの影響を与える可能性があることに十分注意してください。

### レシオメトリックな反応

MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assayで生細胞と死細胞の両方を測定する最も大きな利点は、測定値が反比例し、補完的であることです(図4)。すなわち、細胞生存性または細胞毒性のコントロールに対して一方の蛍光マーカーが強くなれば、他方は低くなります。これにより、細胞数に関係の無い補正されたデータとしてレシオメトリックな応答を提示します。この独立した値はアッセイコントロールとして機能し、ピベッティングや異なる増殖パターンあるいは測定法による干渉などを原因とするエラーを見つけ出し、補正する上で役立ちます。

### 感度

MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assayは迅速な触媒的切断効率を有する2つの異なるプロテアーゼ活性を直接的に測定します。これにより細胞を培養するウェル内に蛍光産物が迅速に蓄積されます。30分間インキュベーションを行った後、多くの細胞種(10,000個/ウェル)で生存性のわずかな減少(5%)でも測定することができます(図4)。インキュベーション時間を3時間まで延長することにより、シグナルウィンドウを広げ、細胞集団の2%(200個)の細胞毒性でも検出できる場合もあります。このアッセイ試薬は生存性に影響を与えないため、高レベルの感度が得られるまで複数回繰り返して測定することができます。

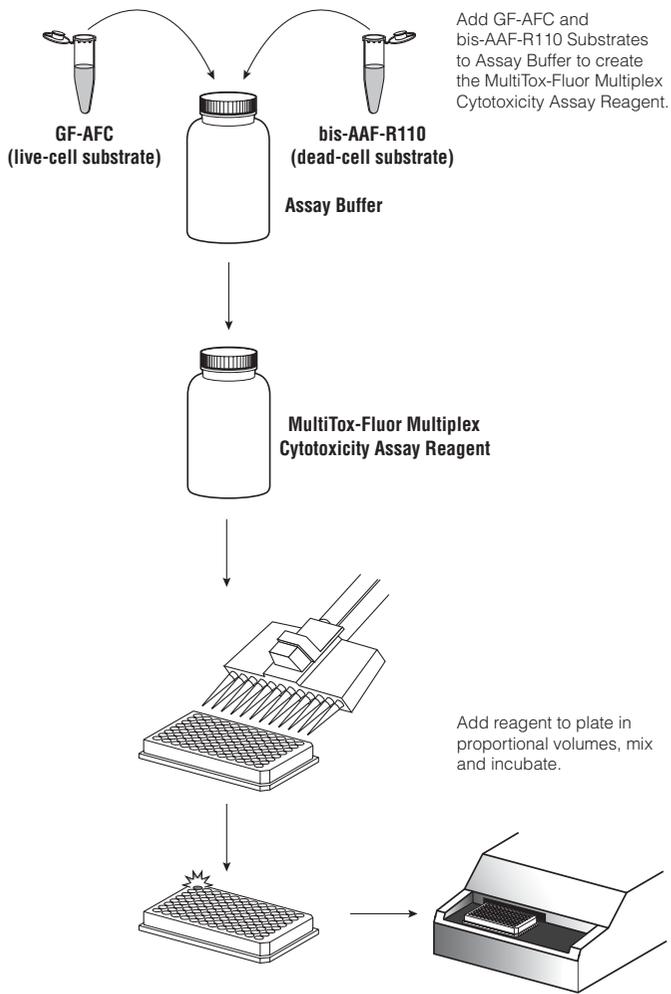


図1. MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assayの測定模式図

MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Reagentは、蛍光性ペプチド基質 [GF-AFC (“生細胞”由来プロテアーゼ基質)] およびbis-AAF-R110 (“死細胞”由来プロテアーゼ基質)]をアッセイ緩衝液に加えて作製する。その後この試薬をマルチウェルプレートに加える。37 °Cで少なくとも30分間インキュベートした後、発生する蛍光シグナルを測定する[“生細胞”シグナル(400Ex/505Em)、“死細胞”シグナル(485Ex/520Em)]。

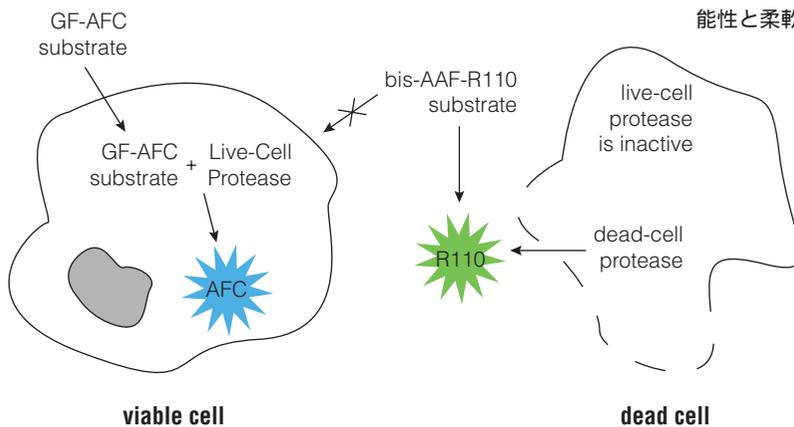


図2. MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assayの原理  
GF-AFC基質は生細胞に透過し、“生細胞”プロテアーゼによる切断でAFCを遊離する。bis-AAF-R110基質は生細胞に透過できず、漏出した“細胞死”由来のプロテアーゼ活性によりR110を遊離する。

## 従来の細胞生存性および細胞毒性試験との相関関係

MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assayテクノロジーは、培養細胞の生存性および毒性を測定する全く新しい方法です。しかし、この方法は細胞膜の完全性の明確な変化を測定するためにデザインされているため、得られたデータは従来法と非常に良く相関します。そのため、タンパク質分解活性の測定結果は、酵素漏出、レサズリンの還元、ATP定量、色素排出アッセイで得られたデータと類似します(図5)。

## マルチプレックスへの応用性

MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assay Reagentは、試薬中の基質濃度の調整により、ウェルに様々な液量で添加することができます。実例として、2×濃度の試薬を調製して培地と等量を添加したり、10×濃度の試薬を調製し、培地の1/10量を添加することもできます。少量を添加できることによって柔軟性が得られると同時に、レポーター活性やカスパーゼの活性化などを測定する第2のアッセイ試薬(マルチプレックス)を添加できるスペースを与えます。基質は実質的に無色で、生存性には影響を与えないため、スペクトルの異なる蛍光色素や発光アッセイを用いた数多くのオプションがマルチプレックスで利用できます(図6)。

## 細胞特異的なアッセイレスポンス

通常の生物学研究で利用される細胞株の形態や系統は様々です。細胞株ごとに還元能や酵素マーカの含有レベルが異なります。これらの因子は従来の生存試験や毒性試験の反応におけるインキュベーション時間や感度に影響を与える可能性があります。MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assayは米国国立癌研究所(NCI: National Cancer Institute)パネル60(5)の中から代表的な細胞株を選び有効性を確認し、様々なネクロシスあるいはアポトーシスモデルで良好な結果が得られています(表1)。

## 結論

MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assayは、実験処理後の細胞生存性および毒性の度合いを同一ウェルで高感度に測定でき、操作はシンプルでアッセイ容量を自由に変更することができます。MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assayによる“生細胞”と“死細胞”それぞれに由来するタンパク質分解活性の測定結果は、従来の細胞生存性測定法と非常に良く相関し、補正を目的とした有用なレシオメトリック応答を提供する内部補正值として機能します。さらに、このアッセイシステムは、他のアッセイ法とのマルチプレックス分析を可能とする機能性と柔軟性を有しています。

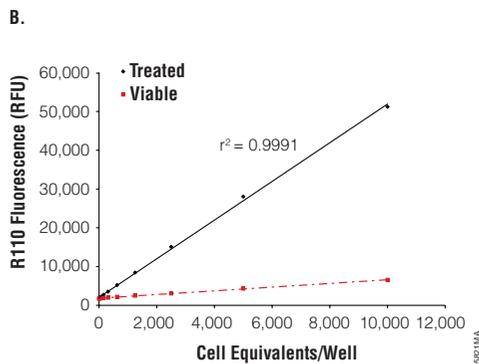
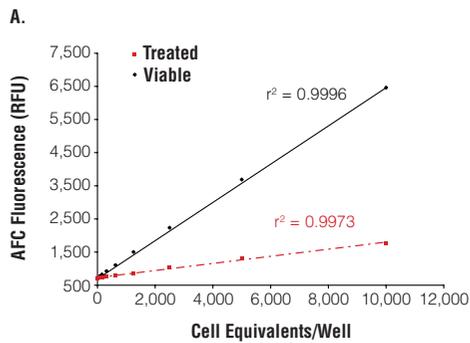


図3. 生存細胞または死細胞に限定された2つの異なるタンパク質分解活性を測定するMultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assay

Jurkat細胞のプールを2つに分け、一方に模擬的な細胞毒性を起こす処理を行い、もう片方には処理を施さなかった。2つのフラクションについてそれぞれRPMI 1640+10%ウシ胎児血清で2倍希釈系列を作成し、血清を含む培地を細胞を含まない無細胞コントロールとした。バッファーにGF-AFC基質およびbis-AAF-R110基質を添加して1種類の基質混合試薬を調製した。試薬を細胞に添加した後、37、30分間インキュベーションし、BMG POLARstar readerで蛍光を測定した。パネルA. “生細胞”基質の蛍光プロファイル (GF-AFC)。パネルB. “死細胞”基質の蛍光プロファイル (bis-AAF-R110)。

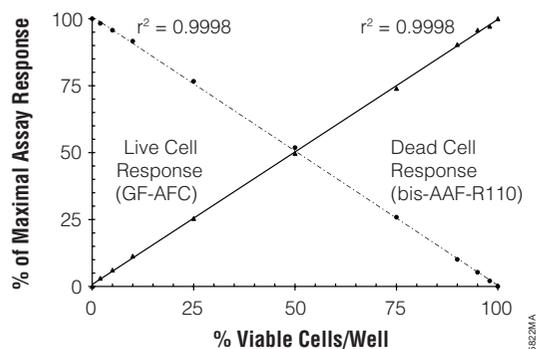


図4. MultiTox-Fluor Assayにより得られたレシオメトリックな応答

Jurkat細胞のプールを10%ウシ胎児血清を添加したRPMI 1640で100,000個/mlに調製し、2つに分けた。一方のフラクションは模擬的な細胞毒性を起こす処理を行い、もう一方は未処理のままとした。2つのフラクションを様々な比率でブレンドし、細胞生存率が100%から0%のものまでを作製した。各ブレンド100µlを96ウェルプレートに添加し、等量のMultiTox-Fluor Assay Reagentを加え、試薬が分散するように旋回式シェーカーで簡単に攪拌した。プレートは37、30分間インキュベーションした後にBMG POLARstar readerで蛍光を測定した。データは最大反応に対する%として補正した。破線は“死細胞”由来の蛍光シグナル、実線は“生細胞”由来の蛍光シグナル。

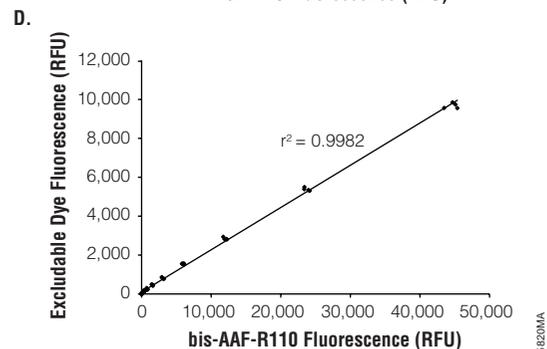
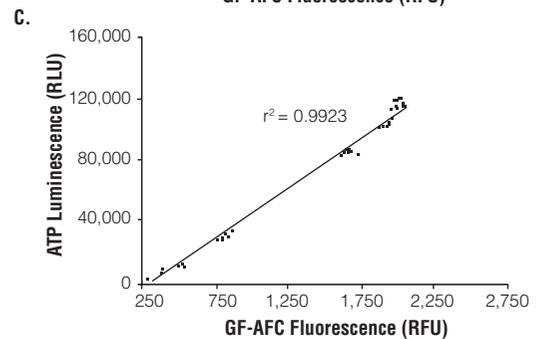
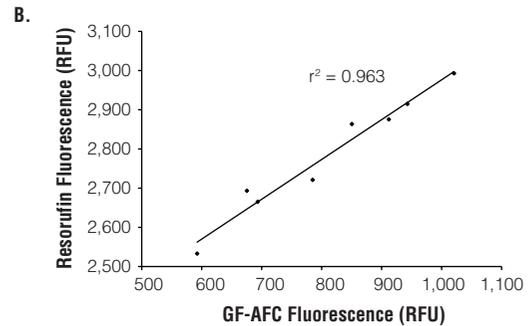
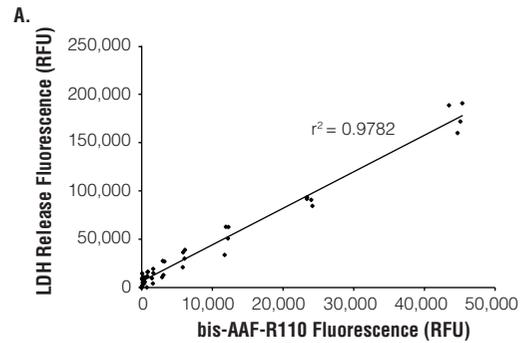


図5. MultiTox-Fluor Assayと従来の細胞生存性および細胞毒性試験との相関性

MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assay Technical Bulletin #TB348に従い、U937、Jurkat、HL-60細胞に異なる程度の細胞毒性を誘導する様々な処理を施した。並行処理するためのプレートを準備し、細胞毒性、細胞生存性をMultiTox-Fluor AssayおよびCytoTox-ONE™ Assay (パネルA)、CellTiter-Blue® Assay (パネルB)、CellTiter-Glo® Assay (パネルC)、エチジウムホモダイマー色素排出試験 (パネルD, Molecular Probes) を用いて測定した。MultiTox-Fluor Assayの測定値に対するそれぞれの蛍光シグナルをプロットした。

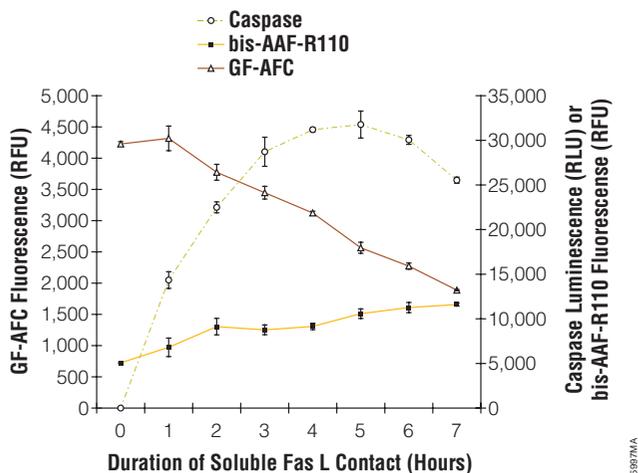


図6. MultiTox-Fluor Assayと他のアッセイを組み合わせたマルチプレックスアッセイ Jurkat細胞を1ウェルあたりRPMI 1640培地 (+10%ウシ胎児血清) 50 $\mu$ lに対して10,000個になるように播種し、37 $^{\circ}$ C、5%CO $_2$ で2時間平衡化した。RPMI 1640培地 (+10%ウシ胎児血清) で希釈したrhFasL (400ng/ml, R&D Systems) 50 $\mu$ lを1時間毎に異なるウェルセットへ添加した (最長7時間)。20 $\times$ のMultiTox-Fluor Reagent 10 $\mu$ lを添加し、旋回式シェーカーで混和した。その後、30分間インキュベーションを行い、蛍光を測定した。さらに、Caspase-Glo $^{\circ}$  3/7 Reagent 100 $\mu$ lを添加し、10分間のインキュベーション後に発光を測定した。蛍光、発光ともBMG POLARstar plate readerを使用した。細胞毒性、細胞生存性およびバックグラウンドを差し引いたカスパーゼ3/7の反応性から得られるシグナルは作用時間ごとにプロットした。

#### 参考文献

1. Riss, T.L. and Moravec, R.A (2004) *Assay Drug Dev. Technol.* **2**, 51–62.
2. Farfan, A. *et al.* (2004) *Cell Notes* **10**, 15–8.
3. Smith, R.E. *et al.* (1980) *Thrombin Res.* **17**, 393–402.
4. Liu, J. *et al.* (1999) *Bioorg Med Chem Lett.* **9**, 3231–6.
5. Shoemaker, R.H. (1988) *Prog. Clin. Biol. Res.* **276**, 265–86.

#### プロトコル

- ◆ MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assay Technical Bulletin #TB348, Promega Corporation.  
[www.promega.com/tbs/tb348/tb348.html](http://www.promega.com/tbs/tb348/tb348.html)

#### 製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格( ¥ )
MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assay	10 ml	G9200	27,000
	5 $\times$ 10 ml	G9201	76,000
	2 $\times$ 50 ml	G9202	140,000

表1. MultiTox-Fluor Assayの評価に使用した多様なNational Cancer Institute-60 (NCI-60) パネルの代表的な細胞株

Cell Line	Sex	Age	Histology	Source/Origin
HCT-116	M	>18	carcinoma	colon
HL-60 (TB)	F	36	promyleocytic	PBL leukemia
SK-MEL-28	M	51	melanoma	melanoma/skin
MCF-7	F	69	adenocarcinoma	mammary
PA-1	F	12	teratocarcinoma	ovary
ACHN	M	22	carcinoma	kidney
PC-3	M	62	adenocarcinoma	prostate
DU-145	M	69	carcinoma	prostate
NCI-H226	M	na	squamous	lung
LN-18	M	65	glioblastoma	brain
HeLa	F	31	carcinoma	cervix
Jurkat	M	na	T-cell leukemia	lymphocyte
HEK 293	N/A	fetal	transformed	kidney
HepG2	M	15	hepatocarcinoma	liver
NK-92CI	M	50	lymphoma	NK cell
U937	M	37	histocystic lymphoma	monocyte