

Measure Relative Numbers Of Live And Dead Cells And Normalize Assay Data To Cell Number

生細胞と死細胞の相対数の測定および細胞数に対するアッセイデータの補正

By Andrew Niles¹, Michael Scurreia², Laurent Bernad², Brian McNamara¹, Kay Rashka¹, Deborah Lange¹, Pam Guthmiller¹, Tracy Worzella¹ And Terry Riss¹,
¹Promega Corporation, ²Promega Biosciences

本稿では MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assay (1-3) の卓越した特徴について詳しく説明するとともに、発光法を用いた次世代技術である CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay と MultiTox-Glo Multiplex Cytotoxicity Assay についてもご紹介いたします。

イントロダクション

細胞生物学実験ではさまざまな *in vitro* 反応モデルにおいて多種多様な哺乳動物細胞が用いられています。初代培養細胞、形質転換細胞、形質導入細胞などはアッセイプレートのウェル内で培養され、化学的、物理的、生物学的な刺激により処理が施されます。このような“因果関係評価 (cause-and-effect)” モデルを用いる目的は、細胞における分子プロセスの重要なチェックポイントやモジュレーターの同定などから、実施した処理による細胞毒性の可能性検討まで多岐にわたります。いずれにせよ、細胞の反応は本質的に細胞生存性や細胞毒性と密接に結びついていますので、実験操作の終了後には細胞の健康状態について評価する必要があります。

細胞ベースのモデルで細胞生存性や細胞毒性を定量する方法は数多くあります(4)。ほとんどの細胞生存性測定法や細胞毒性測定法では、細胞外環境との障壁として機能する細胞膜の有無を直接的または間接的に測定します。本稿では、培養ウェルにおける生細胞・死細胞の双方の相対数を測定することができる CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay、MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assay、MultiTox-Glo Multiplex Cytotoxicity Assay について、そのテクノロジー特有の有用性と多機能性をご紹介します。これらのアッセイでは、細胞生存性と細胞毒性に関して反比例するレシオメトリックな値が得られます。このようなレシオメトリックな値は、データを細胞数に対して補正する上で有用であり、アッセイ干渉によるデータ誤解釈の低減に寄与します。これらのアッセイで用いられる試薬類は、測定方法や測定系の構成次第では他の蛍光法や発光法と適合しますので、マルチプレックスな測定を行うことができます。

アッセイの原理と反応

MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assay と MultiTox-Glo Multiplex Cytotoxicity Assay はどちらも同じ2種類の特異的プロテアーゼ活性を細胞生存性や細胞毒性のマーカーとして測定しますが、検出対象が蛍光であるのか発光であるのかというわずかな違いがあります(図1および2、これらのプロテアーゼマーカーについては11ページもご参照ください)。インキュベーション後、アッセイに利用される蛍光産物は標準的な蛍光定量法により簡便に測定することができます。発光シグナルはマルチモード装置カルミノメーターを使って測定します。

CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay は、AAF-Glo™ 試薬を用いて死細胞の相対数を発光シグナルとして測定します。しかし、発光反応の定常状態に達したシグナルには安定性があるため、溶解液を添加することで(細胞毒性の値を測定した後)、同じウェル内に存在する生細胞の相対数を検出できます。この“細胞生存性”の値は、死細胞由来プロテアーゼの総RLU値(実験処理による死細胞と、界面活性剤を用いた生細胞溶解による死細胞)から実験処理による死細胞の発光RLU値を差し引くことによって得られます。

レシオメトリックな反応によるデータ補正が可能

MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assay と MultiTox-Glo Multiplex Cytotoxicity Assay の細胞生存性マーカーと細胞毒性マーカーはそれぞれ独立したタンパク質分解反応ですが、プロテアーゼの半減期による制約を受けない限り相補的な反比例の関係を示します(図3、パネルAおよびB)。CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay では1つのマーカーしか用いませんが、各反応は実験処理後の死細胞数と生細胞数を反映するので(試薬溶解後)、両反応はレシオメトリックな関係となります(図3、パネルC)。したがって、アッセイデータを細胞数に対して補正することができます。誤った結論に導く可能性があるアッセイ干渉を軽減することができます。

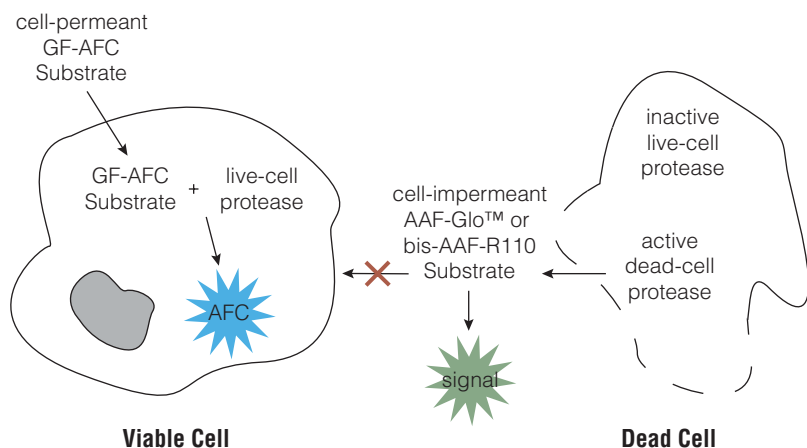


図1. MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assay と MultiTox-Glo Multiplex Cytotoxicity Assay の原理と反応

どちらのアッセイも生細胞プロテアーゼ活性は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) を用いて測定する。この生細胞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、生細胞で起こるような反応は見られなくなる。一方、死細胞プロテアーゼ活性マーカーは細胞膜の完全性が失われた細胞から漏出して初めて測定される。MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assay では、この活性を細胞非透過性の蛍光前駆ペプチド基質 bis-(Ala-Ala-Phe)-rhodamine 110 (bis-AAF-R110) で測定する。MultiTox-Glo Multiplex Cytotoxicity Assay では、この死細胞由来プロテアーゼ活性を細胞非透過性の発光基質 Ala-Ala-Phe-アミノルシフェリン (AAF-Glo™ 基質) を用いて測定する。

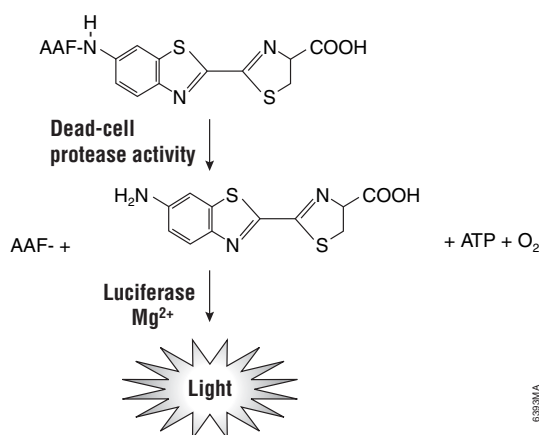


図2. 試薬成分のルシフェラーゼ、 Mg^{2+} 、ATP存在下における、死細胞由来プロテアーゼ活性による AAF-Glo™ 発光基質の切断

切断後、ルシフェラーゼの基質（アミノルシフェリン）が放出され、ルシフェラーゼによる発光反応が起こる。

長いプロテアーゼ半減期による利点

細胞毒性の測定に用いられる酵素マーカーには必ず活性半減期があります。プロメガのアッセイで用いられるプロテアーゼマーカーの安定性は、その他のルシフェラーゼベースの細胞毒性アッセイで用いられるマーカーを上回ります（図4）。しかし、細胞を被験化合物に24時間以上暴露した場合には細胞毒性の過小評価をまねくことがあります。24時間以上暴露する必要がある場合は、化合物の開始濃度を低下させることで細胞死のカイネティクスに影響を及ぼし、細胞毒性の測定精度を改善できる可能性があります。

高感度な化学反応系を用いた高品質データの収集

検出化学反応系の実用性と感度は、必要な総細胞数（“シグナル域”）、少ない処理細胞数と未処理細胞数でも見分けられるアッセイの能力（感度、ばらつき）、細胞や培地成分によるアッセイ干渉（バックグラウンドシグナル）によって規定されます。CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay、MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assay、MultiTox-Glo Multiplex Cytotoxicity Assayを用いれば、様々なウェルサイズのプレート（96、384、1536ウェル）でスケールを変えて高感度な測定を行うことができます。ハイスループットフォーマットにおけるこれらのアッセイの有用性は、自動分注システムを用いた2つの細胞毒性モデルで得られている高いZ' 因子によって証明されています（Z' 因子 ≥ 7.5 ；図5）。Z' 因子が0.5を上回る場合、“優れた”アッセイであると考えられます（5）。

信頼性の高い結果を取得でき、問題のあるデータを容易に同定可能

CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay、MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assay、MultiTox-Glo Multiplex Cytotoxicity Assayは、プロテアーゼ活性の測定という新しい方法で培養細胞の細胞生存性と細胞毒性を定量します。しかし、このアッセイは細胞膜の完全性の明確な変化を測定しますので、得られたデータは従来の測定法によるデータと非常によく相関します。そのため、タンパク質分解活性を測定する方法で得られるデータは、レサズリン還元（CellTiter-Blue® Assay）、乳酸脱水素酵素の漏出（CytoTox-ONE™ Assay）、ATP定量（CellTiter-Glo® Assay）で得られるデータと非常によく類似しています（図6）。繰り返しになりますが、これらのアッセイを用いた場合、プロテアーゼの半減期による制約を受けない限り生細胞と死細胞にはレシオメトリックな相関性が認められますので、異なるプロテアーゼによって（または、CytoTox-Glo™ Assay用として記載されている全溶解プロトコルを用いた場合には同じプロテアーゼによって）異なるチャンネルで得られたEC₅₀値にも、すぐれた一貫性が見られます。複数ポイントで

表1. 様々な用途に利用できる細胞毒性アッセイの一覧

	生細胞 プロテアーゼマーカー	死細胞 プロテアーゼマーカー	感度	特長	マルチプレックスアッセイが 可能なアッセイ法
MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assay (Cat. # G9200, G9201, G9202)	GF-AFC (蛍光)	bis-AAF-R110 (蛍光)	インキュベーション30分後、 2-5%の生存性の変化を 検出可能	レシオメトリックな測定により ウェル間で補正されたデータが 得られる。 2つの独立したチャンネルにより、 アッセイ阻害に対する警告が得られる。	Caspase-Glo® 3/7, 8 , 9 Assays; CellTiter-Glo® Assay および発光 レポーターアッセイ
CytoTox-Fluor™ Cytotoxicity Assay (Cat. # G9260, G9261, G9262)	Not applicable	bis-AAF-R110 (蛍光)	インキュベーション30分後、 2-5%の生存性の変化を 検出可能	スペクトルの異なるアッセイとの 併用が可能（カラークエンチングを 伴わないもの）	Caspase-Glo® 3/7, 8 , 9 Assays; CellTiter-Glo® Assay および発光 レポーターアッセイ
MultiTox-Glo Multiplex Cytotoxicity Assay (Cat. # G9270, G9271, G9272)	GF-AFC (蛍光)	AAF-aminoluciferin (発光)	インキュベーション15 または30分後、 2-5%の生存性の変化を 検出可能	レシオメトリックな測定により ウェル間で補正されたデータが 得られる。 2つの独立したチャンネルにより、 アッセイ阻害に対する警告が得られる。	
CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay (Cat. # G9290, G9291, G9292)	オプションの 全溶解プロトコルを 実施した場合 (Bulletin #TB359.)	AAF-aminoluciferin (発光)	インキュベーション15分後、 2-5%の生存性の変化を 検出可能	レシオメトリックな測定により ウェル間で補正されたデータが 得られる (全溶解プロトコルを実施した場合)。 蛍光に関する干渉が無い。	

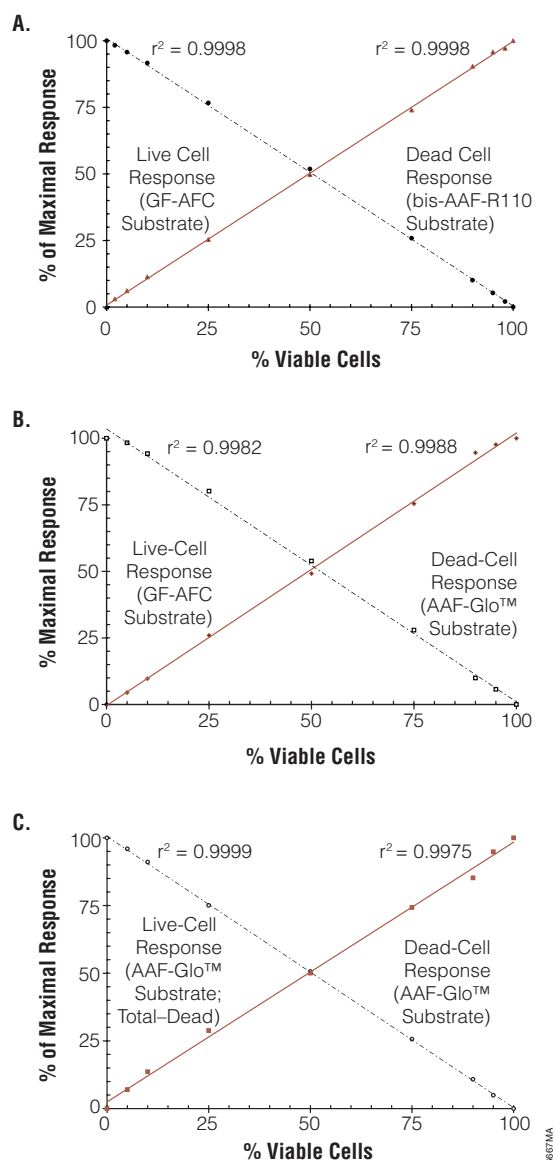


図3. CytoTox-Glo™, MultiTox-Fluor, MultiTox-Gloの各アッセイから得られるレシオメトリックな反応

Jurkat 細胞のプールを1mlあたり100,000個の細胞密度に調整し、2つのフラクションに分割した。一方には細胞毒性を引き起こす処理を施し、もう一方には処理を施さなかった。次いで、細胞生存率が0~100%となるように2つのフラクションをさまざまな割合で混合し、1ウェルあたり約10,000個の細胞 (100 μ l) を播種した。付属のTechnical Bulletinsにしたがってアッセイ試薬を添加し、BMG POLARstarマルチモードプレートリーダーでシグナルを測定した。生細胞反応と死細胞反応のデータは、最大反応の割合に対して補正した (全溶解プロトコルについては Technical Bulletin #TB359を参照)。**パネルA**：MultiTox-Fluor Assay。**パネルB**：MultiTox-Glo Assay。**パネルC**：CytoTox-Glo™ Assay (全溶解プロトコルを実施)。

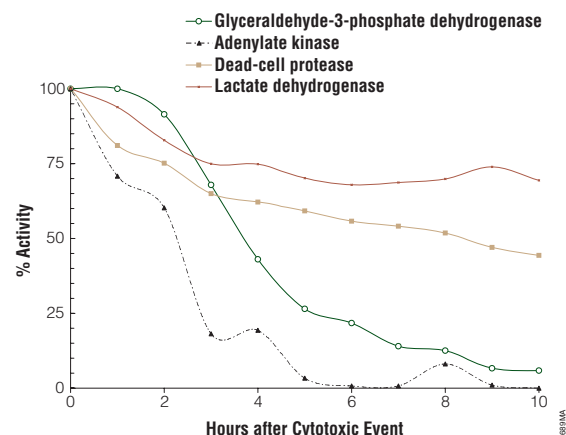


図4. 細胞毒性測定用の酵素マーカーの半減期

Jurkat細胞を1ウェルあたり10%FBS含有 RPMI 1640 培地100 μ lに対して10,000個となるように白色プレートに播種した。ジギトニンをレプリケートのウェルに、最大細胞毒性が得られるよう1時間ごとに10 μ lずつ計10時間添加した (最終濃度30 μ g/ml)。この間、プレートは37℃でインキュベーションした。CytoTox-Glo™, aCella™-Tox (CellTechnology), Toxi-Light™ (Cambrex) の各試薬を調製し、説明書にしたがって添加した。15分後に発光をBMG POLARstarルミノメーターで測定した。CytoTox-ONE™ Reagentを調製し、説明書にしたがって添加した。蛍光はFluoroskan Ascentリーダーで測定した。いずれのデータもバックグラウンドを差し引いた後、最終溶解時点に対する割合としてプロットした。

データ収集する化合物スクリーニングを実施する場合には、レシオメトリックなEC₅₀値が得られるという特性は特に強みとなります。力価の同等性は信頼性を高めますが、同等性の低い値はアッセイ干渉や実際の力価をゆがめる細胞増殖抑制作用の存在を示している可能性があります (図7)。1つのパラメーターしか用いない細胞毒性・細胞生存性アッセイには、問題があるデータの同定に役立つこのような“内蔵型”コントロールは存在しません。

より多くの情報取得を目的としたマルチプレックスアッセイの実施

CytoTox-Fluor™ Cytotoxicity AssayとMultiTox-Fluor Cytotoxicity Assay Reagentは、1ウェルあたりの情報量を増やすために、他のエンドポイントアッセイと併用するマルチプレックスアッセイが可能です。たとえば、MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assayを実施したあとに任意の発光アッセイ (ATP、レポーター、カスパーゼアッセイ) を行うことができます。このようなマルチプレックスアッセイは、化合物や処理によって生じる細胞死のメカニズムを調べる際に特に有用です (図8)。

要約

CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay, MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assay, MultiTox-Glo Multiplex Cytotoxicity Assayは、細胞生存性・細胞毒性の測定技術に大きな一歩をしるすものです。これらのアッセイを用いることにより、細胞溶解を必要としないホモジニアスでアッセイボリューム可変なフォーマットにおいて、細胞生存性と細胞毒性を迅速かつ高感度に検出することができます。また、これらのアッセイは、蛍光シグナルと発光シグナルの組み合わせを選択できる柔軟性を持ち合わせています。アッセイではレシオメトリックな反応が得られ、細胞数に対する補正やアッセイ干渉の内部標準として機能します。また、MultiTox-FluorおよびCytoTox-Fluor™ アッセイシステムは、他のアッセイとのマルチプレックスアッセイを可能とする実用性と柔軟性も兼ね備えています。

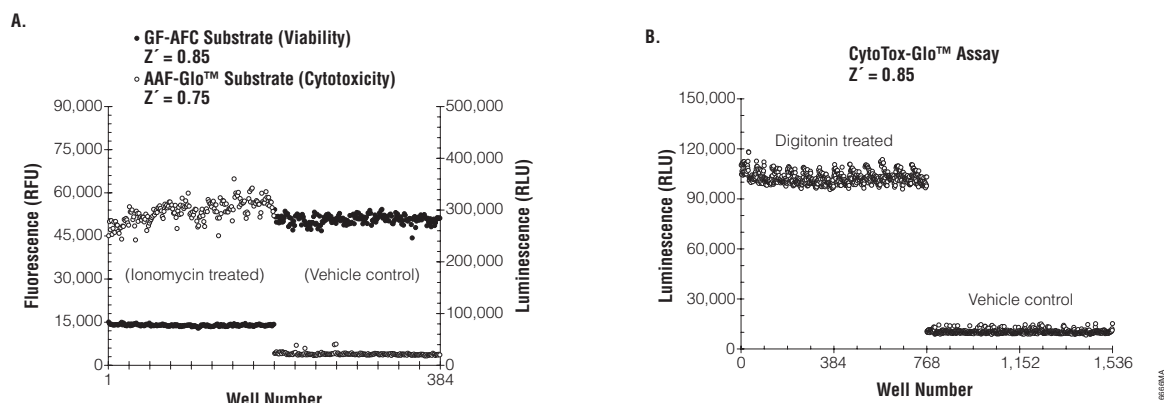
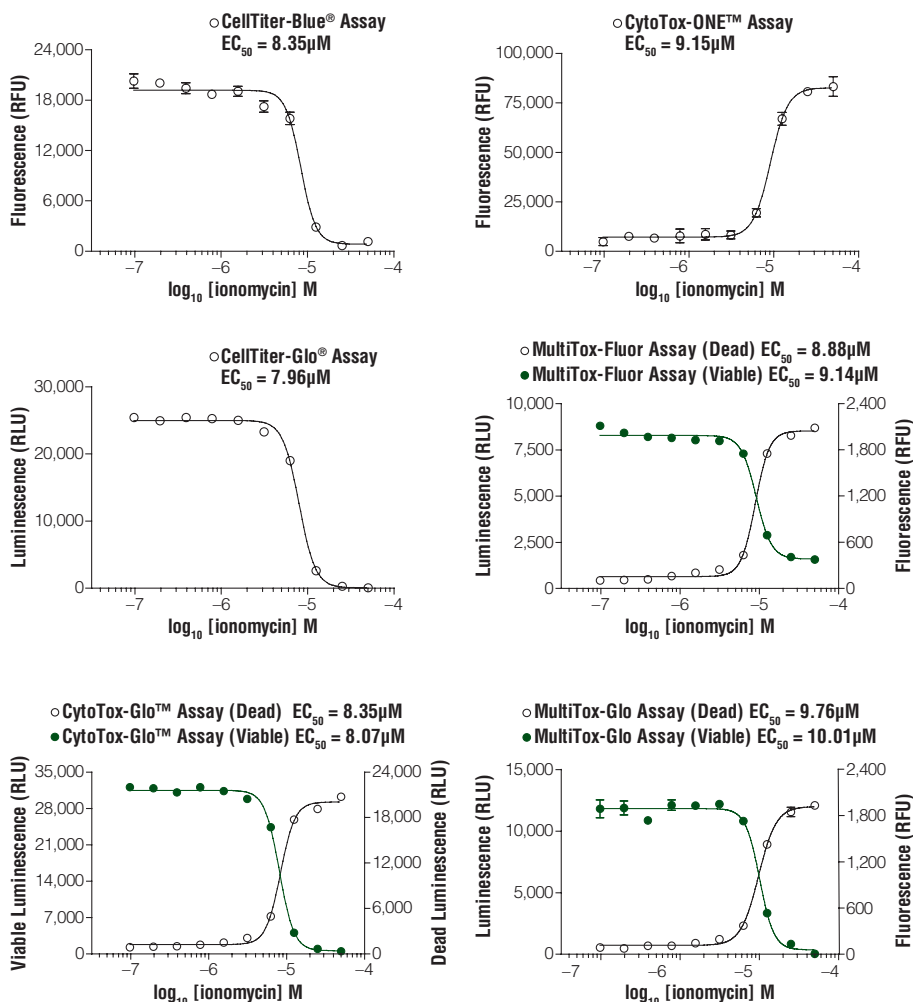


図5. 高いアッセイ感度により得られる高い Z' 因子

パネルA：1ウェルあたり5,000個（10 μ l）となるようCyBio CyBi®-Well 384/1536分注装置を使って384ウェルプレートに細胞を播種した。イオノマイシン（50 μ M）または溶媒を添加し、37℃で2時間インキュベーションした。MultiTox-Gloの各試薬を Technical Bulletin #TB358の手順にしたがって添加した。Tecan Safire²™ プレートリーダーで蛍光と発光を測定した。**パネルB**：細胞プールを1 mlあたり 6.25×10^4 個の細胞密度に調整し、2つのフラクションに分割した。一方のフラクションにはジギトニン処理を施して模擬的な細胞毒性を引き起こした。もう一方は未処理とした。これらの細胞フラクションをCyBi®-Well分注装置で4 μ lずつ分注した。CytoTox-Glo™ ReagentをCyBi®-Well分注装置を使って分注し、Tecan Safire²™ プレートリーダーで発光を測定した。

図6. 従来の細胞生存性・細胞毒性測定法との類似性

Jurkat 細胞を96ウェルプレートに1ウェルあたり10,000個の密度となるよう播種した。イオノマイシンを様々な濃度で添加し、37℃で6時間インキュベーションした。CellTiter-Blue®, CytoTox-ONE™, CellTiter-Glo®, MultiTox-Fluor, CytoTox-Glo™, MultiTox-Gloの各試薬を調製して添加し、技術文献に記載されている手順にしたがってシグナルを測定した。力価の決定には GraphPad Prism® ソフトウェアを使用した。



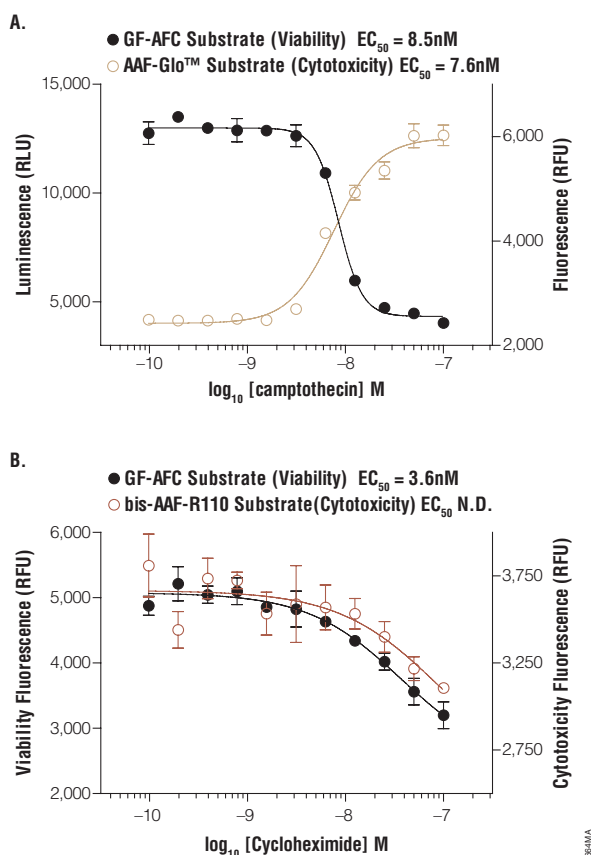


図7. アッセイコントロールとしての相補的な EC_{50} 値

Jurkat細胞に、所定の濃度のカンプトテシンまたはシクロヘキシミドを添加して37℃で24時間インキュベーションした。パネルA：MultiTox-Glo Reagentを添加し、発生したシグナルを既報にしたがって測定した。生細胞数の減少はGF-AFC基質で測定し、細胞毒性の増大はAAF-Glo™基質で測定した。最高濃度のカンプトテシン添加時のデータは、カンプトテシンが細胞毒性を引き起こすことを示している。パネルB：MultiTox-Fluor Reagentを添加し、蛍光反応を測定した。AFC蛍光の減少に応じたR110蛍光の増加は認められなかった。細胞を形態学的に観察したところ、最高濃度のシクロヘキシミド添加時には細胞周期の停止が生じていたものの細胞毒性は生じていないことが確認された。したがって、最高濃度のシクロヘキシミドによる生細胞数マーカーの“低下”は、細胞分裂を停止した細胞が未処理のコントロールよりも多いことを反映していると考えられる。

参考文献

- Niles, A. *et al.* (2006) *Cell Notes* **15**, 11–5.
- Niles, A. *et al.* (2006) *Cell Notes* **16**, 12–5.
- Niles, A. *et al.* (2006) *Promega Notes* **94**, 22–6.
- Riss, T.L. and Moravec, R.A. (2004) *ASSAY Drug Dev. Tech.* **2**, 51–62.
- Zhang, J.H., Chung, T.D., and Oldenberg, R. *et al.* (1999) *J. Biomol. Screen.* **4**, 67–73.

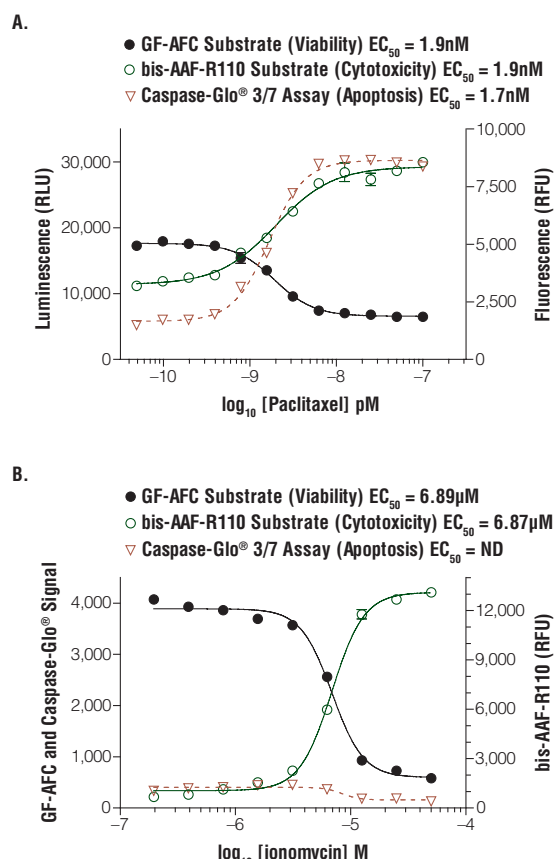


図8. さらにマルチプレックス測定を行うことにより情報量が増える

Jurkat細胞を、さまざまな濃度のパクリタキセル（24時間）またはイオノマイシン（6時間）存在下でインキュベーションした。MultiTox-Fluor Reagentを添加してデータを収集した。Caspase-Glo® 3/7 Reagentを添加して発光を測定した。パネルA：パクリタキセルはアポトーシス（カスパーゼ誘導）により細胞毒性を引き起こす。パネルB：イオノマイシンは細胞毒性を引き起こすが、カスパーゼは誘導しない（一次ネクロシスである可能性が高い）。

プロトコル

- ◆ MultiTox-Glo Multiplex Cytotoxicity Assay Technical Bulletin #TB358
www.promega.com/tbs/tb358/tb358.html
- ◆ MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assay Technical Bulletin #TB348
www.promega.com/tbs/tb348/tb348.html
- ◆ CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay Technical Bulletin #TB359
www.promega.com/tbs/tb359/tb359.html
- ◆ CytoTox-Fluor™ Cytotoxicity Assay Technical Bulletin #TB350
www.promega.com/tbs/tb350/tb350.html

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
MultiTox-Glo Multiplex Cytotoxicity Assay	10 ml	G9270	27,000
MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assay	10 ml	G9200	27,000
CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay	10 ml	G9290	15,000
CytoTox-Fluor™ Cytotoxicity Assay	10 ml	G9260	15,000

・上記以外のサイズおよびバルク注文についてはお問い合わせ下さい。