

# CellTiter-Glo™ を用いたハイスループットスクリーニング

## CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay

By Rich Moravec, B.S., Michael Beck, B.S., Rita Hannah, Ph.D. Promega Corporation

### はじめに

CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay は、細胞生存性と細胞毒性をハイスループットのアプリケーションにおいて測定するように設計されています。384ウェルプレートに対応する機器類の入手や利用が容易になるにつれ、多くのラボでスクリーニング法をこの形式にスケールダウンしました。この結果、細胞生存性試験はより高い感度、迅速さ、適用性が要求されます。プロメガが発売した CellTiter-Glo™ Assay はこの基準を満たします。

このアッセイでは生細胞数をルシフェラーゼを用いた ATP の測定に基づき定量します。試薬を培養細胞に添加するだけで定量できるので、複数の添加、抽出、洗浄のステップを必要としません。生成される発光シグナルは存在する生細胞数に比例し、半減期が5時間以上の長時間発光型のシグナルを与えます。半減期が長いので、インジェクター付きルミノメーターを必要とせず、プレート処理の自由度が高くなっています。CellTiter-Glo™ Reagent の添加と混合後、10 分で結果が得られます。これは、他の生理活性に基づいた細胞生存性試験(カルセイン-AM やテトラゾリウムなど)に比べて有利な点といえます。CellTiter-Glo™ Assay は、長いインキュベーション時間を必要とせず、特に細胞を短時間処理する場合、薬剤処理に続く細胞生存性のより良い指標を与えることができます。

### スケール調整の自在さと高感度

CellTiter-Glo™ Assay では、有効な“濃度”ではなく、サンプルあたりの細胞数に比例して発光シグナルが生成されます。そのため、培養液量はアッセイ結果にほとんど影響しません。同様に、サンプル中の細胞の分布にも最低限の影響しか受けません。CellTiter-Glo™ Reagent をサンプル液量に対して 1 : 1 の割合で加える限り、再現性のある発光強度が得られます。そのため、細胞培養条件や実験計画に融通がきき、384 ウェルや 1536 ウェルフォーマットにスケールダウンすることができます。図 1 に同数の細胞を異なるサンプル量で用い (10 ~ 25µl)、発光量を求めた結果を示します。

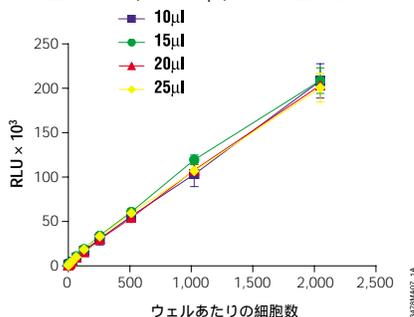


図1. サンプルの容量に関係無く発光は細胞数と比例する

Wallac® Victor 1420 MultiLabel カウンターを用いて発光を測定した。それぞれの値は4サンプルの平均と標準偏差(SD)を表す。試験した細胞数で、発光量はサンプル量に関係無く同等の値が得られた。

高感度のアッセイはスクリーニングにおいてより少数の細胞を使用することを可能にします。CellTiter-Glo™ を用いて定量した細胞毒性試験の実験例を図 2 と 3 に示します。図 2 は TNF 細胞毒性試験の結果で、CellTiter-Glo™ Assay と CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (テトラゾリウム MTSを用いる比色定量法) を比較しています。各々のアッセイは生理活性の別の面を測定していますが、両方

の細胞生存性の測定結果から類似の ED<sub>50</sub> 値 (~8pg/ml) が得られました。

また、図 3 では 2 つの異なる細胞数を用いて 384 ウェル形式で HepG2 細胞に対してタモキシフェンの毒性試験を行った結果を示します。生存性は、CellTiter-Glo™ Assay を用いて定量され、試験した両方の細胞数で同様な ED<sub>50</sub> 値を示しました。

### 結論

CellTiter-Glo™ Assay は、様々なスクリーニングに理想的な多くのすぐれた特長を持ちます。このアッセイは、Jurkat、HepG2、BHK-21、CHO-K1、SH-SY5Yを含む多様な細胞種に使用でき、フェノールレッドや薬剤キャリアにほとんど影響を受けません。本稿では、この試薬が薬剤スクリーニングや384ウェル形式の定量に有用であることを示しました。(この記事の全文はCell Notes No. 2 をご覧ください。)

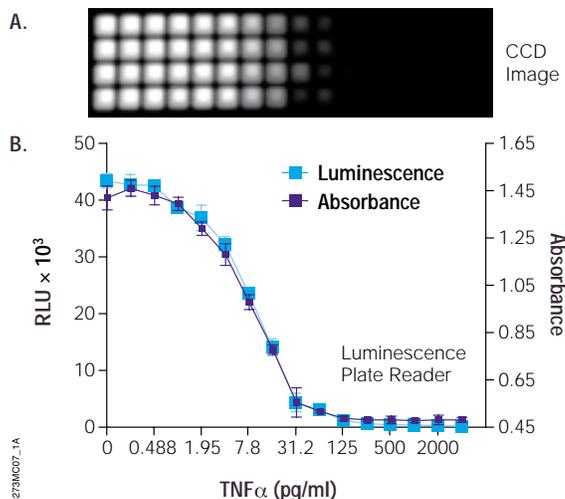


図2. CellTiter-Glo™ Assay と CellTiter 96® Aqueous One Solution Assay を用いてL929細胞に対するTNF の細胞毒性を384ウェルプレートで測定した

パネルA : Alpha Innotech Multi-image Light Cabinet CCD カメラで発光を視覚化した。各列のサンプルは、ルミノメーターで測定したグラフの平均値に対応する。パネルB : それぞれのアッセイで求めたED<sub>50</sub> 値はほぼ同じであった(8pg/ml)。

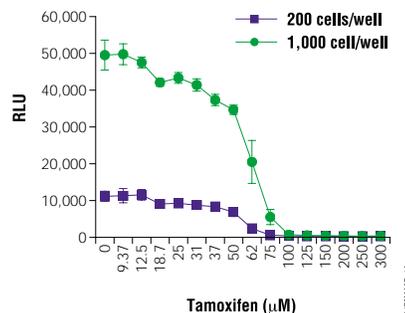


図3. 細胞に対するタモキシフェンの細胞毒性をCellTiter-Glo™ Assay を用いて384ウェルフォーマットで調べた

Wallac® Victor 1420 MultiLabel カウンターを用いて発光を測定し、細胞毒性を定量した。(実験の詳細は Cell Notes No.2 を参照。)