

## 新しい細胞毒性試験試薬のご紹介

### CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay

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

#### アブストラクト

細胞生存性を測定するための試薬 CytoTox-ONE™ を発売しました。本稿ではこのアッセイ法について言及し、細胞毒性スクリーニングにおける利点について説明します。

**CytoTox-ONE™ Assay**のホモジニアスフォーマットは、**in vitro** 細胞毒性スクリーニングの自動化に理想的です。

#### はじめに

In Vitro 毒性試験は、培養細胞集団の生存性を測定することにより、ある処理が細胞にあたる毒性の程度を検出します。細胞の生存度は、様々な異なるパラメーターによって反映されますが、細胞外膜の完全性が最もよく実験的に定義されています。もしも、細胞膜に多くの“穴”が開いていれば、内容物が細胞膜を通過して細胞外に漏出します。トリパンブルーやプロピジウムイオダイドなどのバイタルダイは、通常生存細胞からは排出されますが、細胞膜がダメージを受けた場合、“穴”から内部に入りこみ、細胞質を染色するため、非生存性細胞のインジケーターとして使用することができます。また、ダメージを受けた細胞膜の穴から漏出する細胞質成分を測定する場合も、in vivoまたはin vitroでの実験条件で細胞膜の完全性低下を観察していることになり

ます。新しく発売されたCytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay は、非生存性細胞の数を推定するための蛍光法による定量システムです。本製品は、ダメージを受けた細胞膜から漏出した乳酸脱水素酵素 (LDH) を測定します。培地に放出されたLDHは、レサズリンから蛍光物質であるレゾルフィンに変換される10分間の酵素反応により測定します (図1参照)。CytoTox-ONE™ Reagentは、in vitroにおいて健康な細胞にダメージを与えないため、生存細胞とダメージを受けた細胞が混在する培養ウェルで直接LDHを測定できるようにデザインされています。CytoTox-ONE™ Assayのホモジニアスフォーマットは、自動化された96または384ウェルプレートでのin vitro細胞毒性スクリーニングに理想的です (1)。

#### アッセイの利点

生存試験で広く受け入れられているパラメーターを使用  
アッセイの結果は、細胞膜の完全性を示しており、このパラメーターはしばしば細胞生存試験にも使用されます。

細胞培養プレートでそのままアッセイ  
このアッセイはホモジニアス法を採用しており、試薬は培養細胞に直接添加します。

迅速に結果が得られます  
培養上清の一部を、別の酵素アッセイプレートに移す必要のある比色LDHアッセイ法に比べ迅速です。

アッセイフォーマットの選択が可能  
プロトコルは96または384フォーマットに対応

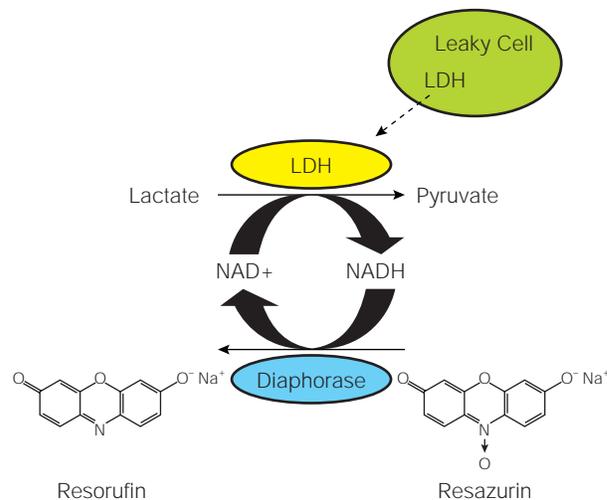


図1. CytoTox-ONE™ Assayを用いた細胞生存試験の原理

CytoTox-ONE™ Assayは、細胞から漏出したLDHをレサズリンから蛍光産物レゾルフィンに変換する2つの酵素反応により測定。

この製品は、凍結乾燥品として供給され、使用時にAssay Bufferで溶解し、CytoTox-ONE™ Reagentを調製します。アッセイプロトコルの簡略化フローチャートを図2に示します。アッセイプレートを周囲の温度に平衡化した後、CytoTox-ONE™ Reagentを各ウェルに添加し、10分間インキュベーションします。次に、Stop Solutionを加え、蛍光シグナルを測定します。蛍光データは、標準的な96または384ウェル蛍光測定機で測定します。560nm 励起フィルターおよび590nmの蛍光フィルターのセットが推奨されます。蛍光産物の量は、96または384フォーマットで、溶解した細胞数に比例しています (図3)。ジアホラーゼを組み合わせた放出LDHの検出法が、数年に渡り使用されてきました。この技術の変法が細胞毒性の測定法として次々に報告され、平行して行った<sup>51</sup>Cr放出アッセイの値と実験的なエラー内で一致することが示されました (2,3)。細胞質酵素の中で、LDHを選択した理由は、LDH活性が真核細胞に普遍的に存在し、グルコース-6-リン酸脱水素酵素などの候補物質よりも安定であるためです (図4)。長い半減期を持つ酵素を測定することは、細胞毒性試験プロトコルをデザインする場合、特に細胞を長時間テスト化合物に暴露する場合に利点となります。例えば、放出する化合物の半減期が2時間であった場合、0時間で完全に細胞が溶解する場合と4時間後に37%の細胞溶解が起こる場合を識別することは困難です。

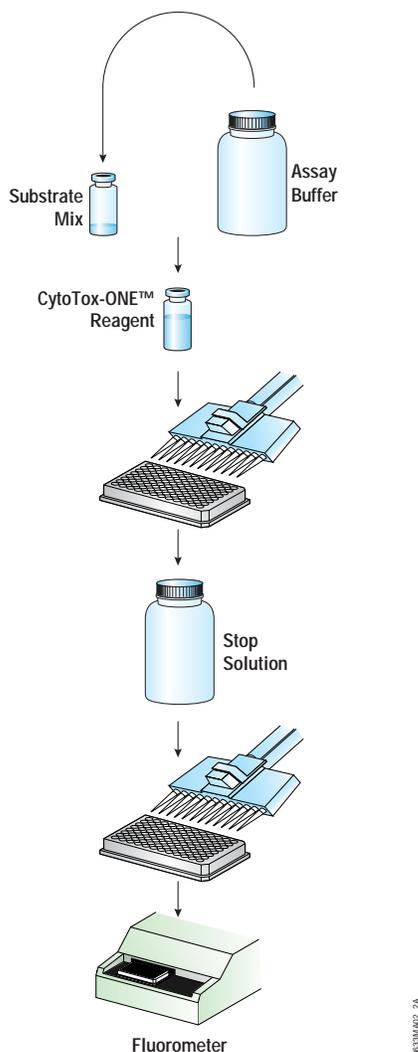
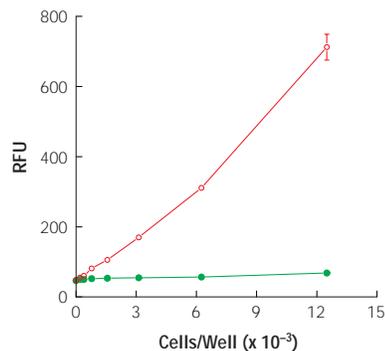


図2. CytoTox-ONE™ Assayのプロトコル

アッセイプレート周囲の温度に平衡化した後、CytoTox-ONE™ Reagentを各ウェルに添加し、10分間インキュベーション。Stop Solutionを添加し、蛍光信号を測定。

LDH放出アッセイは、様々な実験化合物の細胞毒性テストで汎用されています。図5では、CytoTox-ONE™ Assayを用いたマウスL929細胞におけるTNFによる細胞毒性効果を表しています。TNFの濃度の増加は、L929細胞への毒性を示し、結果として細胞膜の完全性を低下させ、培地へLDHが放出し、蛍光信号が増加しています。図5では、ATP含量を測定し、生存細胞の数を推定するCellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assayを用いて得られた結果も示しました(4.5)。L929細胞に毒性を示すTNFの濃度は、ATPレベルを低下させる結果となり、発光信号を低下させました。両アッセイにより決定されたIC<sub>50</sub>値は同様でした。

A. 384-well plate



B. 96-well plate

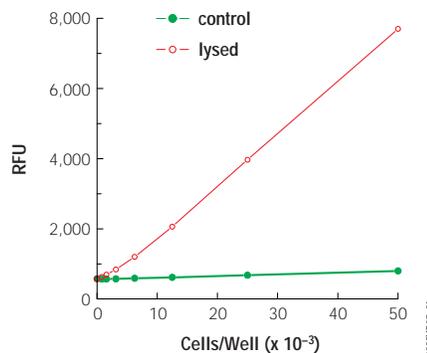
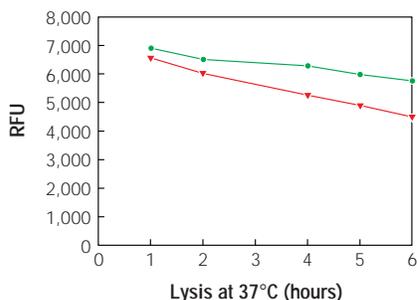


図3. 384または96ウェルフォーマットでCytoTox-ONE™ Assayを用いたアッセイにおける細胞数と蛍光値 (560Ex/590Em) の直線性

パネルA. 384ウェルプレートの血清含有培地25μlを含む各ウェルに2倍希釈系列でL929細胞を播種した。パネルB. 96ウェルプレートの培地100μlを含む各ウェルに2倍希釈系列でL929細胞を播種した。ウェルはTriton® X-100を添加し、細胞を溶解“lysed”した。PBSを添加したものをコントロールとした。次にCytoTox-ONE™ Reagentを添加した。値は、各細胞数に対する4連検体からの平均±S.D.で表した。各プレートフォーマットで最も低い値(384ウェルフォーマットでは195個、96ウェルフォーマットでは781個)は、細胞0個でのバックグラウンド蛍光値と有意に異なる値を示した。

CytoTox-ONE™ Assayは、2つ以上のパラメーターからデータを得たい場合に、同じ実験サンプルを用いて他のアッセイ方法を組み合わせることができます。まず、CytoTox-ONE™を用いたLDH放出を測定するために、各ウェルから培地の一部を別の蛍光測定用マルチウェルプレートに移し、サンプルの残るもとのウェルで異なるアッセイを行います。このアプローチの利点の1つは、どのようなタイプのマルチウェルプレートでも細胞培養に使用することができる点で、これにより特定の2つめのアッセイフォーマットに自由度を与えます。このアプリケーションの例として、レポーター遺伝子発現の測定、CellTiter-Glo™ Assayを用いたATP含量の測定による生存細胞数の確認、CellTiter 96® Aqueous One Solution Assayを用いたテトラゾリウムの還元測定などがあります。また、Apo-ONE™ Homogeneous Caspase-3/7 Assayを用いたカスパーゼ活性測定によるアポトーシスレベルの計測なども行えます。

A. LDH-L929 (green line with circles) LDH-Jurkat (red line with triangles)



B. G6PDH-L929 (green line with circles) G6PDH-Jurkat (red line with triangles)

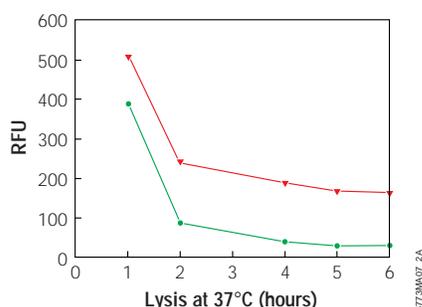


図4. 2つの細胞質酵素の安定性比較

L929細胞およびJurkat細胞は、界面活性剤添加による細胞溶解の前に96ウェルプレートで培養した。細胞は37℃、5% CO<sub>2</sub>で維持した。乳酸脱水素酵素の相対的な安定性をモニターするために、CytoTox-ONE™ Reagentを一連の溶解細胞に添加した。平行してグルコース-6-リン酸脱水素酵素を測定するために、ジアホラーゼ、レゾルフィンおよびグルコース-6-リン酸、NADP<sup>+</sup>を含む改変試薬を調製した。0個細胞におけるバックグラウンド蛍光値を差し引くと、両細胞での各酵素の安定性が顕著に現れた。

CytoTox-ONE™ Assayは、生存試験の終わりに、各ウェルに存在する総細胞数の決定に使用することもできます。操作には、総LDHを放出させるために、全ての細胞を溶解するCytoTox-ONE™ Reagent 添加のステップがあります。存在する全ての細胞数は、存在するLDH活性の蛍光値からバックグラウンド値を引いた値と直接比例します(6)。このアプリケーションを示す例は、図3の“lysed”のデータで見られます。CytoTox-ONE™ Assayの詳細な実験プロトコルや一般的な考察のさらなる議論は、Technical Bulletin #TB306に記述されています。この考察には、バックグラウンドとなる蛍光、血清中のLDH、温度、アクセスコントロール、最大放出LDH測定、レサズリンの光感受性、Stop Solution使用による蛍光シグナルの停止、細胞培養培地などが含まれます。

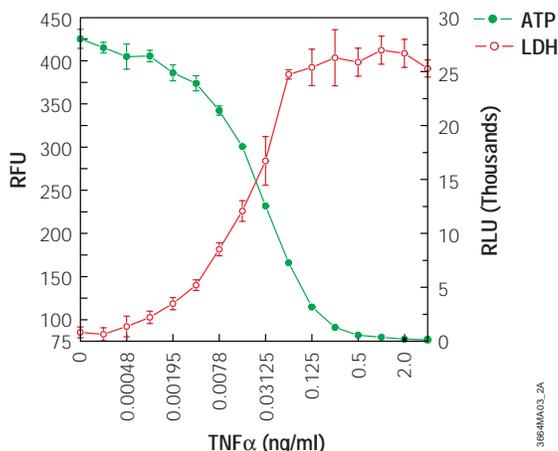


図5. 384ウェルプレートの血清含有培地を含む各ウェルに、マウス L929細胞 2000個を播種し、24時間培養した後、各濃度のTNF $\alpha$ を加えて一晩インキュベートした

CytoTox-ONE™ ReagentおよびCellTiter-Glo™ Reagentの両試薬を、平行にセットしたウェルに添加し、それぞれ蛍光値(560Ex/590Em)または発光値を測定した(CellTiter-Glo™ Assayは、生存細胞数を測定するために存在するATPを利用)。値は4回反復サンプルを用いて平均±S.D.で表した。50%最大反応値は細胞毒性試験および生存試験で一致した。

#### 参考文献

1. CellTiter 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay Technical Bulletin #TB163, Promega Corporation.
2. Korzeniewski, C. and Callewaert, D.M. (1983) An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. *J. Immunol. Meth.* **64**, 313-20.
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**, 61-9.
4. CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay Technical Bulletin #TB288, Promega Corporation.
5. Crouch, S.P. *et al.* (1993) The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J. Immunol. Meth.* **160**, 81-88.
6. Moravec, R. (1994) Total cell quantitation using the CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay. *Promega Notes* **45**, 11-12.

#### 製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
CytoTox-ONE™ Homogeneous	200 回分	G7890	16,000
Membrane Integrity Assay	1000 回分	G7891	49,000