



CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay

By Terry Riss, Ph.D.¹, Rich Moravec, B.S.¹, Michael Beck, M.S.¹, Rita Hannah, Ph.D.¹, Karen Wilson², and Robert Swanson, Ph.D.³
Promega Corporation¹, Trenton College of New Jersey², Pharmacopeia, Inc.³

製品概要

プロメガの CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay は、細胞増殖・毒性の高感度アッセイ法です。本アッセイは独自の安定型ルシフェラーゼを利用することにより、生存細胞の指標である ATP の定量を行います。培養細胞中の生存細胞数に比例して発光シグナルが生成されます。本アッセイはホモジニアスなフォーマットであるため、ハイスループットアプリケーションに最適で、ほとんど感度を損なうことなく 96 ウェルから 384 ウェル、さらには 1536 ウェルフォーマットまで自在にスケールを調整することができます。結果は迅速に得られ、しかもグロータイプの長時間発光という特長を備えているため、大量のプレートのバッチ処理にも柔軟に対応できます。

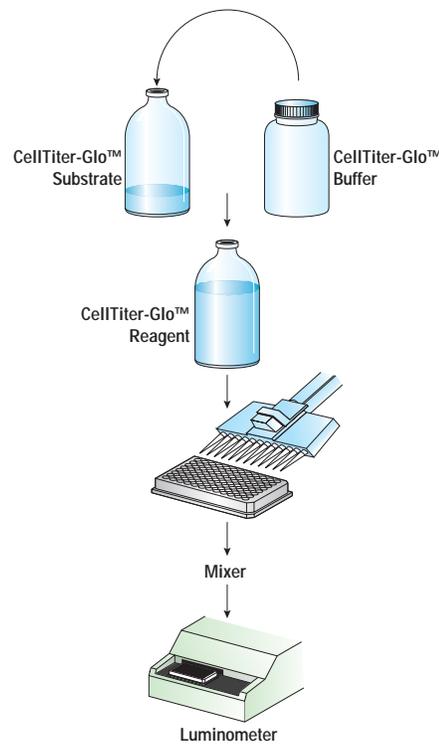


図1. CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay プロトコールを示したフローチャート

告された Multicenter Evaluation of in vitro Cytotoxicity (MEIC: in vitro 細胞毒性に関する多施設共同試験) によると、ATP 濃度測定法は一般的な毒性試験法の中でもっとも予測性が高い試験法の一つであることが判明しました (2)。細胞に生存能がなくなり、細胞膜の完全性が損なわれると、ATP レベルが急激に低下します。これは、細胞の ATP 産生能が失われるとともに、残存する ATP も ATPases によって分解されるためです。図3に、細胞膜を損傷させる処理を行った細胞集団における急激な ATP の低下を示しました。これらのデータは、生存細胞数のマーカーとして ATP を用いることの妥当性を裏付けるものです。

CellTiter-Glo™ Assay には、プロメガが独自開発した熱安定型のルシフェラーゼが用いられています。この特殊なルシフェラーゼにより、内因性の ATPase 活性を抑えつつ数時間でルシフェラーゼ反応を行うというアッセイ条件を実現することができます。この特殊なルシフェラーゼが持つ安定性のおかげで、ホモジニアスなフォーマットによりワンステップで試薬を添加するだけでアッセイを行うことができます。CellTiter-Glo™ Reagent は内因性の ATPases 活性を阻害し、数時間の持続的な発光に必要なだけの基質量と条件を備えています。図4は、CellTiter-Glo™ Buffer に含まれる阻害剤による、ATPases からの保護効果を示しています。CellTiter-Glo™ Assay によって生成されるシグナルは「グロー」タイプ (長時間発光型) の発光反応によるもので半減期が長く、使用した細胞種、培地、血清にもよりますが半減期は通常 5 時間以上です (図5)。半減期が長い為、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。

培地中の細胞に CellTiter-Glo™ Reagent をワンステップで直接添加するだけで測定でき、複数回のピペティングや細胞洗浄のステップは必要ありません。

アッセイの原理

CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay は、代謝活性を有する“生存”細胞の指標である ATP を、ルシフェラーゼを利用することにより測定します (1-3)。本アッセイは、標準的な研究アプリケーションでもハイスループットのアプリケーションでも生存細胞数を測定できるように設計されており、細胞増殖・毒性試験や ADME/Tox スクリーニング (吸収、分布、代謝、排泄、および毒性: 1) によく用いられるようになってきたアプリケーションなどに利用できます。

CellTiter-Glo™ Reagent は、凍結乾燥されている CellTiter-Glo™ Substrate を CellTiter-Glo™ Buffer に溶解することによって調製します。使用する CellTiter-Glo™ Reagent の最終容量は、細胞および被験化合物の最終容量に依存します。細胞を培養したウェルに培地と同量の CellTiter-Glo™ Reagent を添加し、プレートを短時間振とうした後、プレート読み込みルミノメーターまたは CCD カメラで発光を測定します。図1に CellTiter-Glo™ Assay のプロトコールをフローチャートで示します。CellTiter-Glo™ Assay は培地中の細胞に CellTiter-Glo™ Reagent をワンステップで直接添加するだけで測定でき、複数回のピペティングや細胞洗浄のステップは必要ありません。

CellTiter-Glo™ Reagent の添加と混合後、わずか 10 分で結果が得られます。これは、シグナル発生用として、基質 (カルセイン-AM やテトラゾリウム試薬など) の代謝を必要とする他の細胞生存性測定法に比べ有利な点といえます。CellTiter-Glo™ Assay は長時間のインキュベーションが必要なく、特に細胞を短時間処理する場合、薬剤処理後の細胞生存性のより良い指標となります。

CellTiter-Glo™ Reagent が含有するルシフェラーゼは、ルシフェリン、酸素、ATP を基質としてオキシルシフェリンを生成し、エネルギーを光の形で放出します。ルシフェラーゼ反応には ATP が必要であるため、生じる光量は生存細胞数の指標である ATP の存在量に比例します。図2に示すとおり、発光量は細胞数と直接的な相関関係にあります。データから、CellTiter-Glo™ Assay を 384 ウェルフォーマットで使用した場合には 1 ウェル当たりわずか 4 個の Jurkat 細胞でも検出することができ ($p < 0.001$)、最高 4,000 cells/well までは r^2 値が 0.99 であることが示されています。96 ウェル形式の場合には、50,000 cells/well までの直線性が認められています (データ未掲載)。感度や直線範囲の限界値は細胞種によって異なります。

ATP の測定は、生存細胞数の指標として広く認められつつあります。最近報

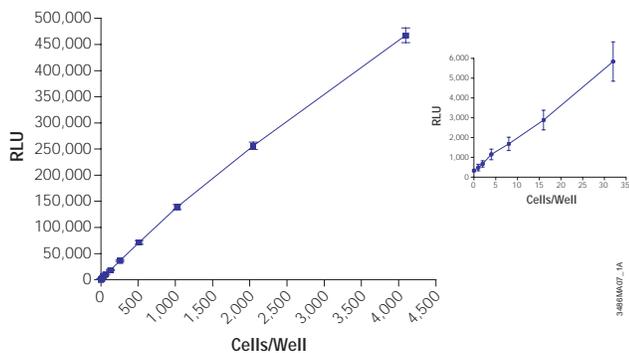


図2. 細胞数と発光量の相関関係

CellTiter-Glo™ Assay で測定した場合、発光量と細胞数には直接的な相関関係が認められる。384 ウェルプレート (オペクホホワイト) 上で、10% FBS 含有 RPMI 培地に懸濁した Jurkat 細胞の 2 倍希釈系列 (25µl/well) を作製した。等量の CellTiter-Glo™ Reagent を添加して混和し、10 分後に Wallac Victor™ 1420 マルチラベルカウンターを使って発光を測定した。値は、各細胞数につき 8 連検体の平均値および S.D. で示す (0 ~ 4,000 cells/well の範囲で $r^2 = 0.99$)。Student の t 検定から、4 個の細胞でバックグラウンドを有意に上回る発光が得られることが示された ($p \leq 0.001$)。RLU = 相対的光ユニット (Relative Light Units)。

他の一般的な生存性測定法との比較

ATP 測定法と他の一般的な生存性測定法の間にはすぐれた相関性が認められます。図6は TNF 細胞毒性試験の結果で、CellTiter-Glo™ Assay と CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS テトラゾリウム還元を測定する比色定量法) 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 ED₅₀ 値 (~8pg/ml) が得られました。プロメガでは Jurkat、HepG2、BHK-21、CHO-K1、SH-SY5Y など多様な細胞種で CellTiter-Glo™ Assay を試験しました。細胞種によって ATP の絶対量は異なりますが、これまで試験したすべての細胞種で本アッセイはすぐれた結果を残しています。

図6は CellTiter-Glo™ Assay の自由度の高さを示したものです。パネル A は TNF 細胞毒性試験プレートの CCD カメラ画像で、パネル B はパネル C と同一のプレートのルミノメーター読み込みをプロットしたものです。蛍光光度計を使用した場合にも、ごく一部変更するだけで CellTiter-Glo™ Assay の発光データを収集できます。励起光源からの光を不透明フィルター (solid opaque filter) で遮断し、蛍光フィルターを取り除いて光が最大限に光電子増倍管を通過するようにします。

手動操作から HTS フォーマットまで自在なスケール調整が可能

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。CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay はこれらの基準をすべて満たします。

CellTiter-Glo™ Assay は、96 や 384 ウェル形式から 1536 ウェル形式に至るまでスケールを自在に調整できるため、スケールダウンやハイスループットスクリーニングに便利です。培養液量はアッセイ結果にほとんど影響しません。1536 ウェルプレートで行ったアッセイデータを統計解析したところ、Z' 因子は 0.84 でした。このことは、CellTiter-Glo™ Assay が陰性対照サンプルと陽性対照サンプルを識別する検出力を備えていることを示しています (図7)。

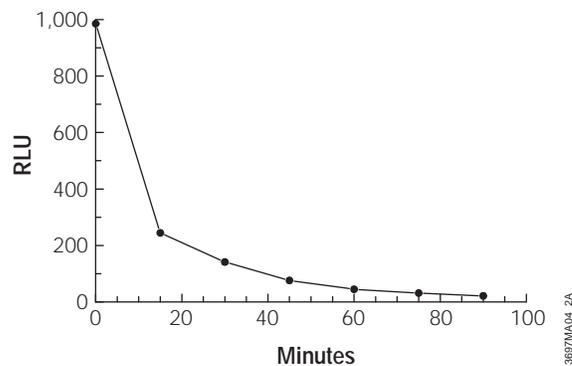


図3. 通常の培養条件下では ATP レベルは細胞溶解によって急激に低下する

CHO-K1 細胞を 10% FBS 含有 DME/F-12 培地に懸濁して 96 ウェルプレートに播き (15,000/well)、37 °C、5% CO₂ で一晩インキュベーションして附着させた。ウェル (n = 4) に 0.2% サボニンを経時的に添加して細胞を溶解し、37 °C で所定の時間インキュベーションして ATPase 活性を発現させた。次に CellTiter-Glo™ Reagent を添加し、全サンプルの ATP 量を同時に測定した。RLU = 相対的光ユニット (Relative Light Units)。

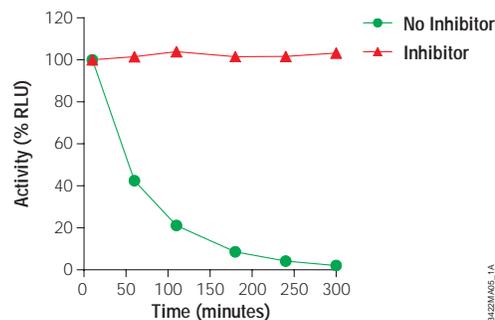


図4. CellTiter-Glo™ Reagent による ATPase 活性の阻害

10% ウマ血清含有 DME/F-12 (1:1) 培地中の L929 細胞 1.5×10^5 cells/ml を、凍結融解を 3 ~ 4 回繰り返して細胞溶解液を調製した。細胞溶解液を 2 つのプールに分割し、22 °C でインキュベーションした。一方のプールには等量の 50mM HEPES (pH 7.5; 阻害剤なし) を添加し、もう一方には等量の CellTiter-Glo™ Buffer (阻害剤) を添加した。60 分ごとに 100µl の分画を計 10 回分取し、20µl の 5 × CellTiter-Glo™ Substrate を添加して混和した。発光量は、各時点につき 4 連検体で測定した。

試薬の安定性および妨害物質

CellTiter-Glo™ Assay の試薬類は、適切に使用・保存した場合、6 ヶ月間安定です。再溶解後の CellTiter-Glo™ Reagent を -20 °C で保存した場合は数ヶ月安定で、凍結融解を繰り返しても品質に影響はありません (3)。再溶解後の試薬を 4 °C で 48 時間保存した場合には、活性の低下はほとんど見られません (~5%)。再溶解後の試薬を 22 °C で最大 48 時間保存した場合にも、活性の低下は 20% 程度です。

CellTiter-Glo™ Assay は非常に強力な、化合物の溶解やアッセイプレートへの分注に用いる一般的な溶媒やフェノールレッドは、アッセイの性能にほとんどまたはまったく影響を及ぼしません。薬剤の溶解に用いられることの多い DMSO、アセトニトリル、エタノールなどの溶剤は、アッセイの性能にほとんど影響しないことが示されています。

培地に添加する血清は、ルシフェラーゼアッセイに影響する可能性があります。さまざまな種類の培地や血清を使って評価したところ、CellTiter-Glo™ Assay による発光強度にはわずかながら差が認められました。しかし、同じ培地組成と血清を使用している限りはアッセイ内の一貫性が保たれると考えられます。

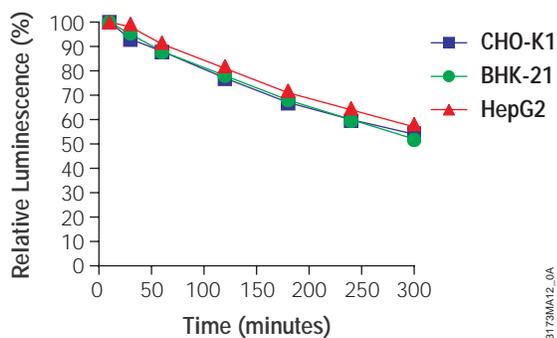


図5. 表示の細胞株で CellTiter-Glo™ Reagent によって得られる半減期は 5 時間以上である
発光シグナルの半減期が長い場合、ハイスループットスクリーニング (HTS) の “連続モード” や “バッチモード” でのアッセイプレート処理にフレキシブルに対応可能である。

発光シグナルに対する温度の影響

CellTiter-Glo™ Assay によって得られる発光シグナルの強度は、ルシフェラーゼの反応速度に依存します。温度はこの酵素測定法の反応速度に影響する要因の 1 つであるため、発光量にも影響します。一貫した結果を得るため、発光シグナルの測定前にはアッセイプレートを一定温度 (22 °C) で平衡化しておくことをお勧めします。真核生物細胞を 37 °C から室温に移しても、ATP 量にはほとんど影響ありません。プロメガでは、培養細胞を 37 °C のインキュベーターから取り出して 22 °C で最大 1 時間平衡化してから CellTiter-Glo™ Reagent を添加した場合でも、ATP 量にほとんど影響が見られないことを確認しています。

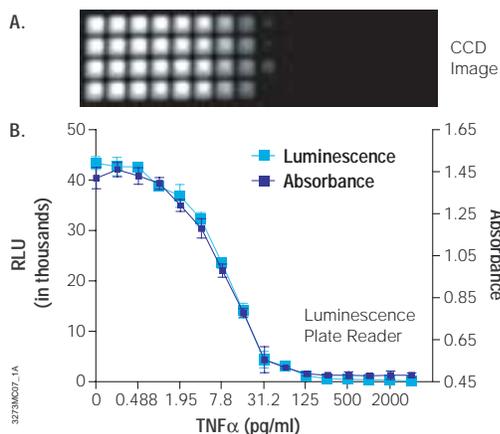


図6. CellTiter-Glo™ Assay と CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay を用いて L929 細胞に対する TNF の細胞毒性を 384 ウェルプレートで測定したところ、両測定法で同等の結果が得られた

L929 細胞 (1,000 cells/well) を白色のクリアボトム 384 ウェルプレートに播き、24 時間静置して付着・増殖させた。アクチノマイシン D (終濃度 1µg/ml) 存在下にさまざまな濃度の TNF (n = 4) を添加して 20 時間インキュベーションした。プレートに等量 (30µl/well) の CellTiter-Glo™ Reagent を添加して振とうし、10 分後に Berthold® Orion® プレートルミノメーターで発光を読み取ることで細胞毒性を測定した。CellTiter 96® Aqueous One Solution Reagent の場合は、クリアボトムプレートに各ウェル 6µl ずつ添加した。このプレートを 37 °C で 2 時間インキュベーションした後、Wallac Victor™ 1420 マルチラベルカウンターを使って 490nm の吸光度を測定した。
パネル A: Alpha Innotech Multi-Image Light Cabinet CCD カメラで発光を視覚化した (中間感度で 30 秒露出)。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 ED₅₀ 値はほぼ同じであった (~8pg/ml)。

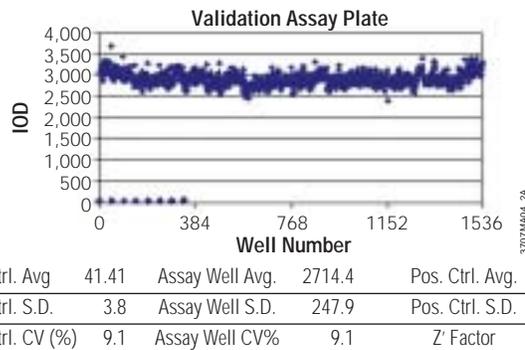


図7. CellTiter-Glo™ Assay を用いた 1536 ウェルバリデーションアッセイプレートの散佈図
BlueBIRD 自動化試薬分注装置を用いて 293-EBNA 細胞懸濁液 1µl/well (1000 cell/µl) を Corning 1536 ウェル試験プレートに分注した。24 時間インキュベーションしたのち、1µl の CellTiter-Glo™ Reagent を添加して、ViewLux™ CCD カメラを使って発光を測定した。積分光学密度単位 (IOD) を縦軸方向にプロットした。プレートの全領域を通じてシグナルは一定していた。CV、Z' 因子、バックグラウンドに対するシグナルは、いずれもスクリーニング用としての許容範囲内にあった。データ提供: Karen Wilson and Robert Swanson, Pharmacoepia, Inc.

プレートの種類

プロメガでは、CellTiter-Glo™ Assay での発光測定に最適な、ウェル側面が不透明の標準的 96 ウェルプレートまたは 384 ウェルプレートの使用をお勧めしています。細胞を顕微鏡で観察できるウェル側面が不透明で底部が透明のプレートも使用できますが、シグナル強度がわずかに低下することがあり、ウェル間の “クロストーク” 増大も認められています。

要約

CellTiter-Glo™ Assay は、フレキシブルかつ強力なアッセイを実現することが可能な特長を数多く備えており、ラボでの研究から創薬現場での HTS に至るまで、多様な状況に理想的に対応します。本アッセイには、他の細胞生存性アッセイにはないすぐれた長所がいくつかあります。まず、本アッセイはワンステップで試薬を添加するだけのホモジニアスな方法です。また、1 ~ 4 時間のインキュベーションが必要な他のアッセイに比べて迅速で、384 ウェルフォーマットでウェル当たり 4 個というわずかな哺乳動物細胞でも十分な感度が得られます。半減期の長いグロータイプのシグナルであるため、複数プレートのバッチ処理や連続処理でもプレート間に光強度差をほとんど生じることなく実施でき、広く認められている細胞生存性測定法と関連する結果が得られます。

参考文献

1. Sussman, N. et al. (2002) *Drug Disc. Dev.* 5, 71 - 72.
2. Ekwall, B. et al. (2000) *ATLA* 28, Suppl. 1, 201 - 34.
3. Moravec, R. et al. (2001) *Cell Notes* 2, 13 - 16.

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay	100 回分	G7570	12,000
	10 × 100 回分	G7571	50,000
	1000 回分	G7572	45,000
	10 × 1000 回分	G7573	330,000
CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay	200 回分	G3582	10,000
	1000 回分	G3580	32,000
	5000 回分	G3581	99,000