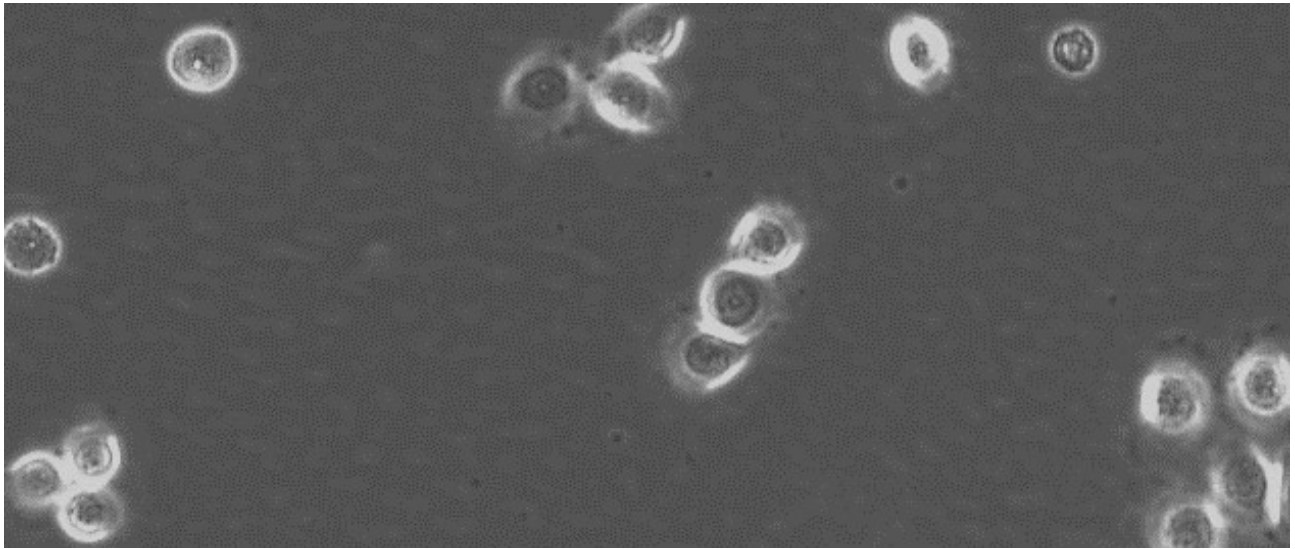


■細胞活性分析について



ケラチノサイト（位相差顕微鏡写真）

はじめに

細胞は生物の基本的構造体で、その中に生物が生存し繁殖していくための機能や情報が詰まっています。細胞はタンパクや糖、脂質、遺伝子を含み、それらを作り出し動かすための細胞内小器官（オルガネラ、organelle）が連携して働いています。細胞外からの刺激応答に対して細胞内伝達物質を利用して機能する仕組みがあり、必要な物質を必要な量、必要なタイミングで生産し、不要な物質を除去し再利用する機能、加えて本来の機能が失われた際にバックアップする機能なども備わっています。数十 μm ほどの大きさの細胞の中に極めて精緻なシステムが柔軟に動いていることが分かります。そのような細胞の機能を利用した代謝活性分析について紹介します。

細胞増殖アッセイについて

細胞は分裂を繰り返しながら組織を成長維持しています。その際に、グルコースや酸素を消費し NADH（ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド還元型）や ATP（アデニン三リン酸）をエネルギーとして生産します。NAD（ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド）は脱水素酵素の補酵素で、細胞質やミトコンドリアにおいて NAD が電子を受け取ることで NADH となり、ミトコンドリアで ADP（アデニン二リン酸）がリン酸化されることで ATP が産生されます。このような細胞のエネルギー代謝を観察することで、細胞の代謝活性を指標とした細胞増殖アッセイを行うことができます。生細胞と死細胞を分別する方法としてトリパンプルーが使用されますが、細胞の活性についての情報を得ることは難しく、代謝活性により評価する方法が用いられます。

現在、細胞増殖アッセイとしては細胞が消費するものを指標とする方法と、細胞が生産するものを指標とするものがあり、前者は酸素消費量を、後者はATP生産量やNADH生産量を測定する方法です。また、細胞に対する毒性評価も行われており、これは薬剤などが細胞に与える障害について濃度を変えて分析するものです。医薬品として新たに開発される化合物の毒性については、細胞を使った一次スクリーニングで評価するのが一般的です。もちろん細胞毒性の評価がそのまま生体に対する毒性という訳ではありませんので、生体毒性を評価するには実験動物が必要になります。細胞を用いるアッセイにおいては、iPS細胞から分化させた細胞や多細胞モデルのスフェロイドなどにより細かな評価を行うことができるようになりつつあります。

細胞増殖アッセイの原理

ここでは、エネルギー産生に着目した細胞増殖アッセイに焦点を当ててご紹介します。一つはATPを指標とするアッセイ方法です。ATPはミトコンドリアで生産されるため、ミトコンドリアを障害する物質に対してはATP生産量の抑制として現れてきます。また、ミトコンドリアに関わる細胞機能を障害する物質に対しても同様です。これらは細胞内のATP量を測定するATPアッセイ、ミトコンドリアのデヒドロゲナーゼ活性を測定するMTTアッセイが代表的です。それぞれのアッセイの原理を図1に示します。

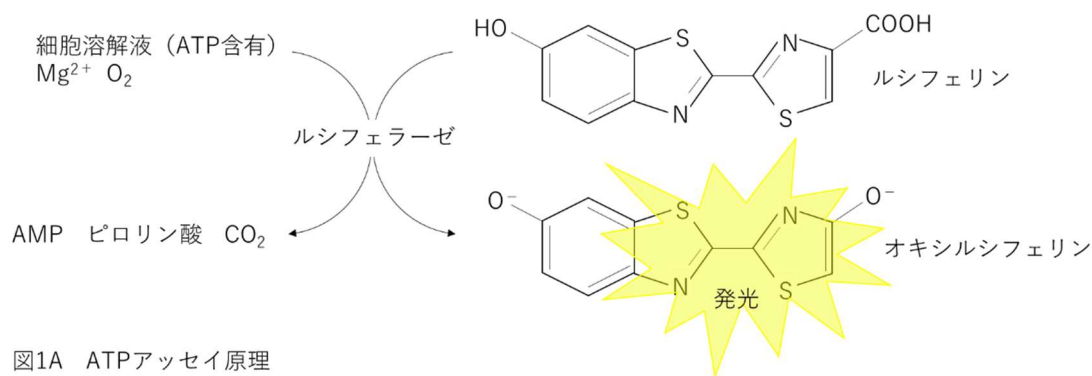


図1A ATPアッセイ原理

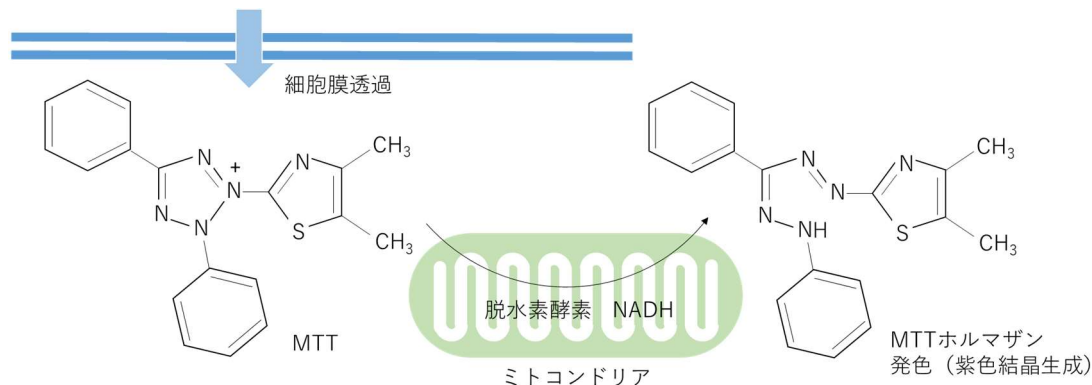


図1B MTTアッセイ原理

ATP アッセイはルシフェリン、ルシフェラーゼを用いて細胞溶解液に含まれる ATP 量を発光量として測定するもので、MTT アッセイはミトコンドリアにおいて脱水素酵素活性により還元されて MTT ホルマザンを生じます。MTT ホルマザンは水に不溶なので細胞からスパイク状に紫色の結晶が形成されます。測定に際してはこの結晶を有機溶媒で溶解する必要があります。

ミトコンドリアだけではなく細胞全体の活性を指標とする方法として WST を用いた方法があります。WST は MTT の類似化合物で水溶性ホルマザンを生じるため、MTT アッセイの際に必要な有機溶媒による MTT ホルマザン結晶の溶解操作が必要ありません。原理を図 2 に示します。

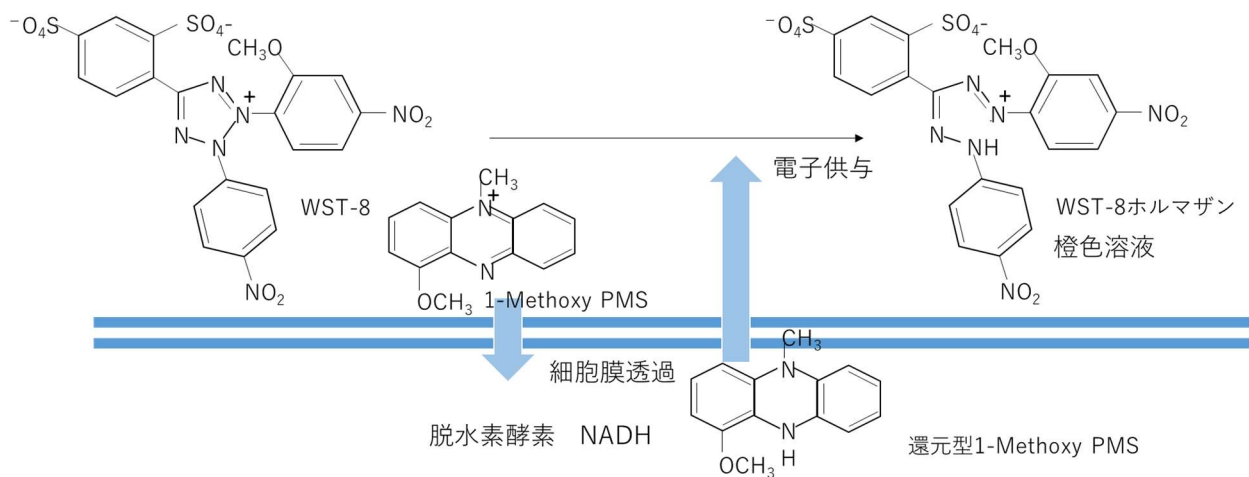


図2 WST-8アッセイ原理

WST-8 は水溶性のため細胞膜は透過せず、1-Methoxy PMS（電子メディエータ）が細胞膜を透過し NADH から電子を受け取り還元型となり WST-8 に電子を供与し WST-8 ホルマザンを生じます。水溶性ホルマザンを生じる化合物として WST-1 や XTT、MTS も同じ目的で使用されます。これらの方法は、細胞内で生成する NADH の一部を使用して生じた水溶性ホルマザン色素を吸光度で測定するもので、MTT アッセイのように有機溶媒による溶解の工程は不要です。

その他の細胞活性分析

細胞の代謝活性を指標にした分析法を紹介しましたが、細胞が被検物によってどの程度の細胞が死滅するのかを評価する方法として細胞の代謝活性に加えて、死滅した細胞から漏れ出てくる細胞内成分を測定する方法があります。細胞内成分として最もよく用いられるのが乳酸脱水素酵素 (LDH) です。どの細胞種にも含まれ、酵素が安定で長時間分析が可能であることが理由です。WST 法と同様に乳酸存在下で LDH 活性を発色により測定します。その際に、細胞透過性のない電子メディエータを使用することで、生細胞が存在していても測定が可能です。ただ、培地に含まれる血清由来の LDH によってブランク値が高くなることが課題です。

そのほか、細胞のエステラーゼ活性を利用した細胞活性分析も使用されています（図3）。エステラーゼ活性を評価するには、カルセイン AM が用いられます。カルセイン AM はエステル化合物でそのものは無蛍光ですが、エステラーゼによりエステル部分が加水分解されると強い蛍光を発します。その蛍光量を測定することで生細胞由来のエステラーゼ量を知ることができ、生細胞数を知る指標となります。

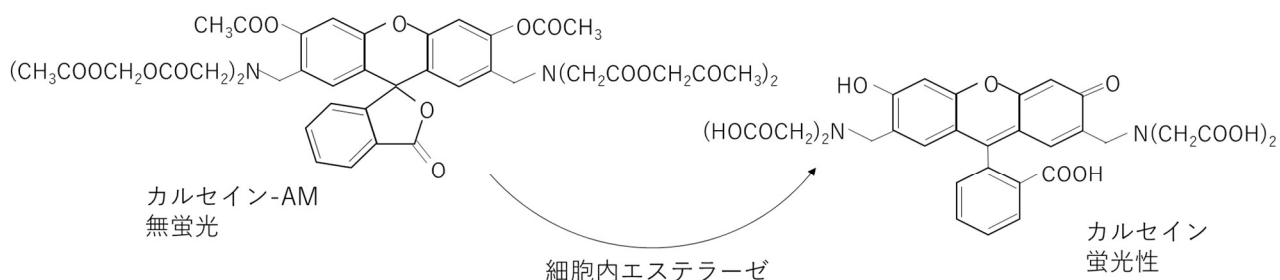


図3 カルセイン-AM法原理

おわりに

培養している細胞を顕微鏡で覗くと彼らの状態が良く分かります。それぞれの細胞は特徴的な表情をしていて、継代の折、その表情を眺めることが楽しみの一つです。小さな細胞に包み込まれた膨大な機能を考えると私たちが知っていることはほんの少しで、原始生物の誕生から数十億年の進化のプロセスがあったとしてもよくこのようなものができたものだと思います。

弊社では細胞を使った各種分析を行っていますので、お問合せください。

ホームページ：www.dojin-glocal.com

各種受託分析→細胞アッセイ