

## 細胞毒性測定のための乳酸脱水素酵素アッセイ法

本間 啓子 神 弥生\* 本田 亜貴\* 馬渡 一浩

## KEY WORDS

lactate dehydrogenase, microplate, C6 cell, cell death, gliotoxin

## はじめに

現在、培養細胞の傷害の程度や細胞死を評価する方法には、クリスタルバイオレット法やMTT法のように生きている細胞の機能を利用する場合と、乳酸脱水素酵素(LDH)法やトリパンブルー法のように傷害された機能を利用するものがある<sup>1-3)</sup>。LDH法は細胞が破壊される時、LDHのような逸脱酵素が細胞外に流出することを利用したもので、培養液中のLDH活性の上昇は傷害された細胞に由来する<sup>4)</sup>。

これまでの方法では、マイクロプレートの各ウェル中の全細胞を測定に用いる。したがって、細胞傷害性を測定した同一サンプルを使って、酵素活性や代謝中間体レベルなどの測定を行うことができなかった<sup>4,5)</sup>。

今回、我々は培養上清の一部あるいは細胞浮遊液の一部を96ウェルマイクロプレートに採り、LDH活性を測定し、細胞傷害の程度を評価する方法について検討した。この方法では、同一試料で他の細胞内成分も測定することができるため、細胞障害性と細胞内成分の変化との相関が評価がしやすいという利点がある。

さらに、グリア毒の一種として知られているDL- $\alpha$ -アミノアジピン酸( $\alpha$ -AAA)のラット由来C6グリオーマ細胞に対する細胞毒性評価に、この方法が使用できるかどうかについても検討した。

## 実験方法

## 1. 試 薬

ダルベッコ変法イーグル培地(Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM)はGIBCO社、牛胎仔血清はSEBAK社、DL- $\alpha$ -アミノアジピン酸

( $\alpha$ -AAA)はSigma社のものを使用した。LDHの活性は和光純薬のラクテートデヒドロゲナーゼCIIテストワコーを用いた(LDH-ジアホラーゼ法)。トリパンブルー、トリトンX-100は和光純薬製を用いた。

## 2. 方 法

LDHの活性測定はLDH-ジアホラーゼ法で行った。まず、試料20 $\mu$ Lを96ウェルマイクロプレートに採り、氷中の発色試薬200 $\mu$ Lを加えた。マイクロプレートリーダー(コロナ, MTP-32)内で37°Cに保ち、550nmの吸光度を1分間隔で30分間測定した。標準血清(LDH活性値が既知)は、キット添付のものを水で希釈して用いた。

ラット由来C6グリオーマ細胞は、10%牛胎仔血清加DMEMにて、10%CO<sub>2</sub>存在下で35mm培養皿に2 $\times$ 10<sup>5</sup>個/mL密度で培養した。 $\alpha$ -AAAは培養開始と同時に最終濃度が10mMになるように添加した。

細胞数の計測はトリパンブルー法を用い、血球計算盤で行った。また、C6細胞からのLDH遊離にはトリトンX-100を用い、最終濃度が0.5%になるようにした。

## 結果および考察

## 1. マイクロプレートを用いるLDH活性測定法

種々のLDH活性値になるように水で希釈した標準血清を使用し、LDH反応の進行に伴う550nmの吸光度変化を測定した(図1-A)。どの試料においても、550nmの吸光度は、測定開始後10分から20分の間で直線的に増加した。また、LDH活性値が高くなるにつれて、直線の傾きが急になることがわかった。

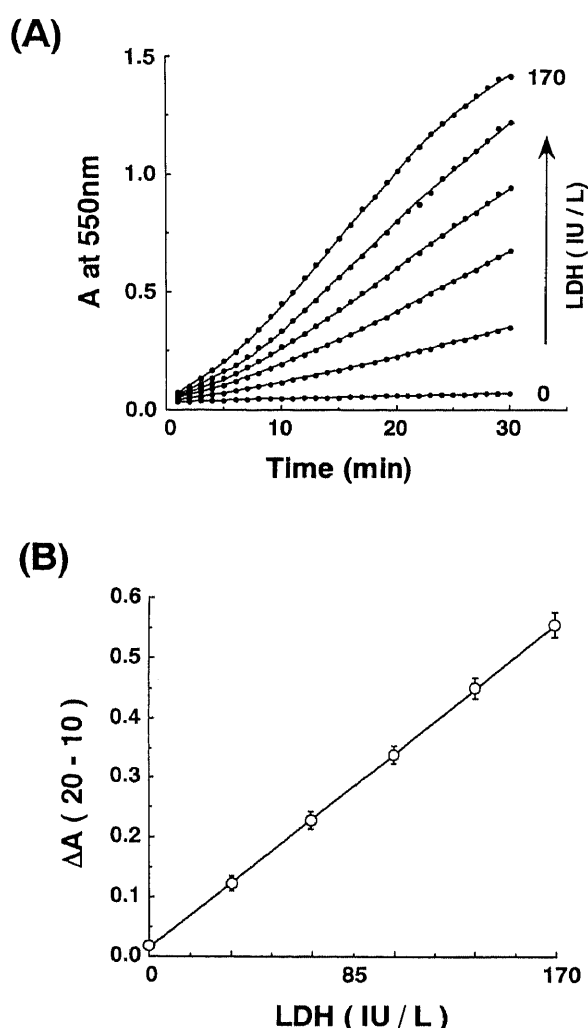


図1. 96ウェルマイクロプレートを用いるLDH活性測定  
 (A) 550 nmの吸光度の経時変化  
 キット添付標準血清(340 IU/L)を水で希釈し、LDH活性測定の標準とした。種々の希釈した標準血清20  $\mu$ Lに発色試薬200  $\mu$ Lを加え、37°Cで1分毎に550 nmの吸光度を測定した。  
 (B) 検量線  
 測定開始後20分と10分の吸光度差を $\Delta A$ とした。各データは平均値 $\pm$ 標準偏差(n=5)で表わした。

そこで、LDH活性値に対して、10分間の吸光度の変化量 $\Delta A$ (20分-10分)をプロットしたところ、両者の間には比例関係がみられた(図1-B)。このことより、96ウェルマイクロプレートを使用してLDH活性が測定できること、および $\Delta A$ (20分-10分)からLDH活性がもとめられることがわかった。また、20分目の吸光度が1を超えるときはLDH-ジアホラーゼ法の測定限界に達しているため、希釈して測定し直す必要があることもわかった。

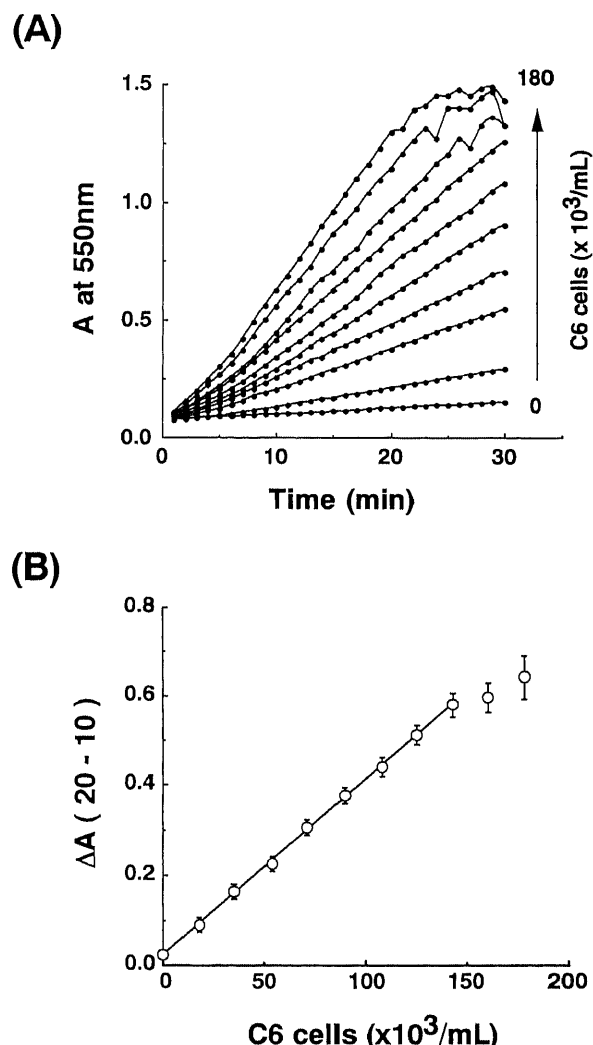


図2. C6細胞由来のLDH活性と細胞数との関係  
 (A) 550 nmの吸光度の時間変化  
 C6細胞浮遊液を培養液で希釈し、種々の細胞密度の試料を調整した。この試料に同量の1%トリトンX-100を加え、30分間氷中に放置した。遠心(10000 rpm, 10分)後、上清20  $\mu$ Lに発色試薬200  $\mu$ L加えて、LDH活性を測定した。  
 (B) 細胞数とLDH活性との関係  
 測定開始後20分と10分の吸光度差を $\Delta A$ とした。各データは平均値 $\pm$ 標準偏差(n=5)で表わした。

## 2. LDH活性と細胞数との関係

LDH活性と細胞数との関係を調べるため、細胞数が異なるC6細胞浮遊液を界面活性剤(トリトンX-100)で処理し、細胞中のLDHを遊離させた。遠心した後、上清のLDH活性を測定したところ、細胞数が多くなるほど、グラフの傾きが急になった(図2-A)。細胞数15万個/mLまでは、細胞数と吸光度の変化量 $\Delta A$ (20分-10分)との間には直線関係がみられた(図2-B)。このことより、細胞数とLDH活性の間には比例関係があることがわかった。

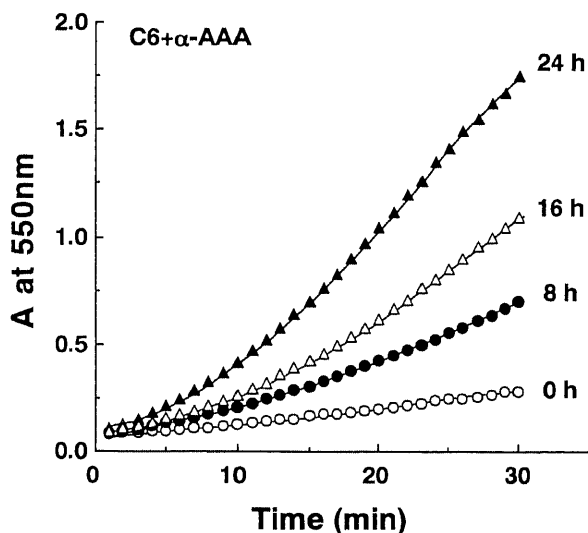


図3. DL- $\alpha$ -アジピン酸によるC6細胞の障害

培養開始時に最終濃度が10 mMになるようにDL- $\alpha$ -AAAを添加した。培養開始0, 8, 16, 24時間後に培養上清を50  $\mu$ L採取した。遠心(10000 rpm, 10分)後, 上清5  $\mu$ Lに発色試薬200  $\mu$ L加えて, LDH活性を測定した。

### 3. $\alpha$ -AAAのグリア毒性評価への応用

C6細胞に $\alpha$ -AAAを添加後, 0, 8, 16, 24時間培養し, 培養上清中のLDH活性を測定した。培養時間の経過とともに培養上清のLDH活性が増加していくことがわかった(図3)。このとき, C6の総細胞数はほとんど変化しないため, LDH活性の増加は $\alpha$ -AAAによるC6細胞の傷害度が, 時間経過に伴って大きくなっていくことを示している。

したがって, この方法が $\alpha$ -AAAによるC6細胞傷害性の評価に有効であることがわかった。これまで, 細胞増殖や細胞死の評価には,  $^{51}\text{Cr}$ 遊離法, MTT

法, LDH-UV法などが用いられてきた。 $^{51}\text{Cr}$ 遊離法<sup>6)</sup>は, 感度が良いが, ラジオアイソトープ(RI)を使用しなければならない。また, MTT法も反応を停止させた後, 細胞内で生成した色素をイソプロパノール・塩酸混合液で抽出しなければならない。これらの方法に比べて, 今回用いたLDH-ジアホラーゼ法は, RIを用いる必要がなく, 反応停止, 抽出操作が不要なため操作が簡便である。また, 他のLDH活性測定法であるLDH-UV法でも検討した。しかし, マイクロプレートリーダーによる340 nmの吸光度の減少測定では, ノイズが大きく実用的ではなかった。したがって, 今回, 我々が検討したLDH-ジアホラーゼ法は操作の簡便さ, さらに測定精度の良さからも有用な方法であると考えられる。

### 文 献

- 1) 西村一成: 細胞死の判定法, 田沼靖一編集, アポトーシス実験プロトコール, 細胞工学別冊, 154-157, 秀潤社, 東京, 1994.
- 2) 西 望: 培養細胞を用いた実験法, 堀尾武一監修, 分子細胞生物学基礎実験法, 117-127, 南江堂, 東京, 1995.
- 3) 小池 学: 細胞増殖の測定, 黒木登志夫 許 南浩 千田和広編, バイオマニュアルUPシリーズ分子生物学研究のための培養細胞実験法, 実験医学別冊, 87-92, 羊土社, 東京, 1995.
- 4) Korzeniewski, C., Callewaert, D.M.: An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. J. Immunol. Methods., 64 : 313-320, 1983.
- 5) Decker, T., Lohmann-Matthes, M.-L.: 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. Methods., 115 : 61-69, 1988.
- 6) Blakely, A. et. al.: Resistance of cloned cytotoxic T lymphocytes to cell-mediated cytotoxicity. J. Exp. Med., 166 : 1070-1083, 1987.

## A microplate assay of lactate dehydrogenase for cytotoxicity measurements

Keiko Homma, Yayoi Jin\*, Aki Honda \*, Kazuhiro Mawatari