



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	細胞増殖能測定のためのMTTアッセイの基礎的研究
Author(s)	森本, 美恵; 田中, 英二
Citation	北海道大学医療技術短期大学部紀要, 3, 15-20
Issue Date	1990-10
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/37510
Type	departmental bulletin paper
File Information	3_15-20.pdf



細胞増殖能測定のための MTT アッセイ の基礎的研究

森本 美恵・田中 英二

Evaluation of MTT assay for the proliferation of mitogen stimulated cells in Vitro

Mie Morimoto and Eiji Tanaka

Summary

An investigation has been made of a point of the optimal use of a tetrazolium (MTT)-based automated colorimetric assay for cell growth. (MTT direct method) MTT(3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H tetrazolium bromide) is converted to a colored formazan by the enzymes of mitochondria only in living cells. As we anticipated that MTT would be cleaved by cells in interphase too, we also have studied CTLL-2, cultured cell line, which growth is depend on the presence of IL-2 molecule. (MTT indirect method)

Results from this assay were compaired with data using ^3H -thymidine uptake assay and MTT direct method.

Good corrlation was observed with MTT direct, MTT indirect and ^3H -thymidine uptake assays. MTT assay offers a valid, rapid and simple method of assessing proliferation in mitogen-stimulated lymphocytes. Examples of its use in IL-2 assays are also given.

要 旨

MTT アッセイを用いて細胞増殖能を測定するための基礎的な検討を行った。MTT アッセイは細胞のミトコンドリア活性を測定する方法で、反応に関与するのは生細胞のみである。この方法では、細胞周期に入っていない Go 期の生細胞によっても MTT が開裂され、バックグラウンドが高くなる傾向が認められたため、インターロイキン 2 (以下 IL-2) 依存性の細胞株である CTLL-2 を用いて細胞増殖能を間接的

に MTT 法で測定する方法も検討した。

MTT アッセイによる細胞増殖能を測定した結果を、 ^3H -サイミジン法によるものと比較検討したところ、両者間に高い平行関係がみられた。また、CTLL-2 を用いて間接的に測定した結果も、MTT アッセイで直接測定したものと類似のパターンを示した。

はじめに

非特異的マイトジェンで刺激したヒト末梢血リンパ球 (Peripheral Blood Lymphocyte

PBL) の増殖能測定は、個体の免疫機能の一端である細胞性免疫能を把握する上で有用と考えられ広く臨床応用されている¹⁾。現在、リンパ球増殖能の測定法としては³Hで標識したサイミジンのDNAへの取り込み能をみる方法が一般的に用いられているが、この方法ではアイソトープを使用できる施設に限られること、汚染物質の処理などに問題があることなどから、我々は取り扱いが煩雑な³H-サイミジン法の代わりに安全かつ簡便で迅速なMTT法に着目し、本法が末梢リンパ球増殖能測定にどの程度応用可能かの基礎的検討を行った。

方 法

ヒト末梢血よりFicoll-Conray法によりリンパ球を分離採取し、リンパ球の希釈系列を作り、Phytohemagglutinin(以下PHA)を0.2%、又はConcanavalin A(以下Con A)を5 µg/ml添加し、96 well culture plate (Falcon社製)で5%CO₂存在下で37℃、72時間培養した。産生されたIL-2をCTLL-2を用いてMTT法で間接的に測定するか、又は増殖したリンパ球をMTTアッセイで直接測定した。

CTLL-2を用いる間接法は、CTLL-2の2倍希釈系列を作り、これにリンパ球のPHA又はCon A刺激培養上清を添加し、96 well culture plate中で5%CO₂存在下で37℃、24時間培養した。これをMTT法と³H-サイミジンのDNAへの取り込み率による方法で検討した。

MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H tetrazolium bromide) は帯黄色の化合物で、呼吸鎖に関係する酵素により開裂され、暗青色のフォルマザンに変化する。脱水素酵素系は生細胞においてのみ酸化還元が行われるため、死細胞はMTTを開裂できない。つまりMTT法は細胞のミトコンドリア活性を測定する方法である。96 well 平底 culture plate の各well 100 µlの培養細胞に、PBS (pH 7.4) で5 mg/mlに溶解したMTTを10 µlずつ添

加し、5%CO₂存在下で37℃、4時間培養しフォルマザンを生成させた。

これに酸性イソプロパノール (Isopropanol/0.04 N HCl) を100 µl/well加え、MTTフォルマザンを完全に溶解し、発色させた。1時間以内にマイクロプレート吸光度測定装置MR 580 (Dynatech Laboratories Inc., USA) で test wave length 550nm, reference wave length 610nm で測定した。

結 果

1) CTLL-2のDNA取り込みとMTTの開裂

ラット脾細胞のCon A 培養上清中のIL-2をCTLL-2の増殖活性を指標として検討した。CTLL-2に、希釈したIL-2を加え、1日後にMTTアッセイと³H-サイミジン法を同時に行った(図1)。IL-2の濃度の減少にともなう、各濃度における両者の値は平行して減少した。

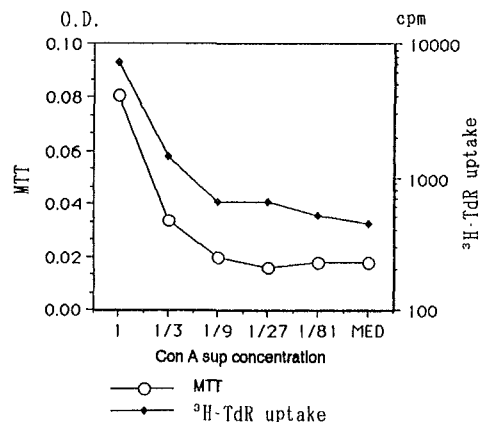


図1 CTLL-2のDNA取り込みとMTTの開裂

2) ヒト末梢血リンパ球のCon A反応上清中IL-2の測定

ヒト末梢血リンパ球のCon A反応上清中のIL-2をCTLL-2を用いて測定した。ヒトPBLに5 µg/mlのCon Aを加えて、37℃、5%CO₂存在下で72時間培養し、上清中のIL-2を測定

した(図2)。MTT アッセイと ^3H -サイミジン法で行ったが、両者の値は正の相関を示した。

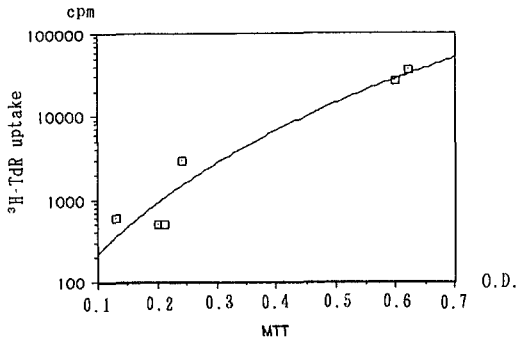


図2 ヒト末梢血リンパ球のCon A反応上清中IL-2の測定

($r=0.915$) T細胞マイトジェンに対するヒトPBL増殖能はIL-2産生能と相関することが知られている²⁾。従ってこれらの結果より、CTLL-2増殖活性をMTTアッセイでモニターすることにより、間接的に培養リンパ球の増殖能を測定できることが示された。

3) MTTアッセイに用いるCTLL-2の至適細胞数の検討

CTLL-2を $15 \times 10^4/\text{well}$ 、 $1.6 \times 10^4/\text{well}$ に調整し、16倍までのIL-2の希釈系列と共に培養した。CTLL-2の濃度が $15 \times 10^4/\text{well}$ の場合は、MTT値がIL-2濃度に依存せず、 $1.6 \times 10^4/\text{well}$ ではIL-2濃度に依存してMTT値は減少した。(図3)

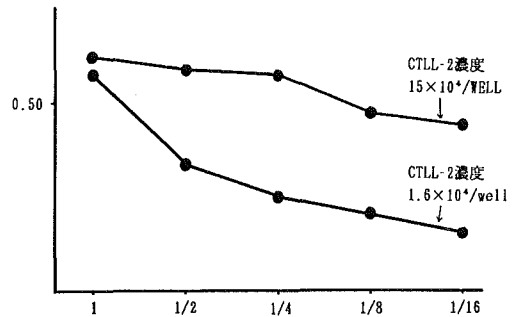


図3 MTTアッセイに用いるCTLL-2の至適細胞数

表1 ヒトPBLの至適濃度

検体No.	$17.5 \times 10^4/\text{well}$		$8.5 \times 10^4/\text{well}$		$4.3 \times 10^4/\text{well}$		$2.2 \times 10^4/\text{well}$	
	PHA	Cont	PHA	Cont	PHA	Cont	PHA	Cont
1	0.435	0.167	0.380	0.065	0.235	0.056	0.045	0.027
2	0.388	0.140	0.299	0.040	0.189	0.030	0.045	0.016
3	0.471	0.150	0.410	0.049	0.258	0.047	0.058	0.018
4	0.400	0.138	0.375	0.081	0.208	0.055	0.068	0.029
5	0.391	0.134	0.366	0.039	0.145	0.028	0.070	0.029
6	0.415	0.150	0.368	0.062	0.184	0.039	0.044	0.026
7	0.299	0.133	0.289	0.035	0.138	0.031	0.047	0.020
8	0.463	0.154	0.350	0.064	0.195	0.041	0.053	0.021
9	0.481	0.148	0.415	0.088	0.246	0.035	0.059	0.024
10	0.387	0.132	0.290	0.049	0.211	0.030	0.071	0.024
mean	0.413	0.144	0.354	0.057	0.201	0.039	0.056	0.023
S. D.	0.05	0.01	0.05	0.02	0.04	0.01	0.01	0.00
r	0.6653		0.6430		0.5630		0.4400	

4) ヒトPBLの至適細胞数の検討

MTTアッセイに用いるヒトPBLの至適細胞数の検討を行った(表1, 図4)。10人の健康人より得たPBLを $17.5 \times 10^4/\text{well}$ より2倍希

釈系列を作り、PHAによるマイトジェン反応を行った。各々PHAを0.2%添加した群と、メディウムのみコントロール群とをMTTアッセイで直接測定し、比色値を比較した。ヒ

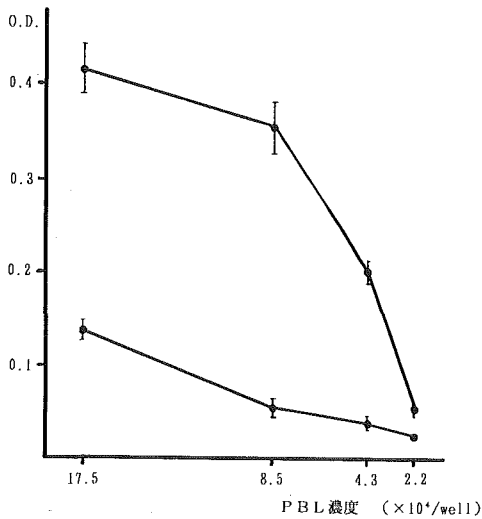


図4 ヒトPBLの至適細胞数

ト PBL の細胞数が $8.5 \times 10^4/\text{well}$ 以上であれば、PHA 群とコントロール群間に有意水準 5% で正の相関 ($r=0.6653$) が認められ、 $4.3 \times 10^4/\text{well}$ でも危険率 10% ($r=0.5630$) ではあるが両者間に平行する傾向が認められたため、直接法でもリンパ球増殖能が測定できることが分かった。なお、MTT を加えてから MTT フォルマザンを生成させるのに必要かつ十分な時間は 4 時間であった。

5) 間接法によるヒト PBL 増殖能の測定

ヒト PBL の至適細胞数を検討するため培養した PBL を、CTLL-2 を用いて MTT 法により間接的に解析した。吸光度と培養に用いた PBL 濃度の関係を図 5 に示した。アッセイに用いた CTLL-2 濃度は、丸は $5 \times 10^4/\text{well}$ 、三角は $2.5 \times 10^4/\text{well}$ 、四角は $1.25 \times 10^4/\text{well}$ である。CTLL-2 の濃度が高い程コントロールとの差は著明であった。またこの結果は培養リンパ球中に直接 MTT を加えた直接法との結果とよく平行しており、リンパ球増殖能を間接的に測定できることが確認された。

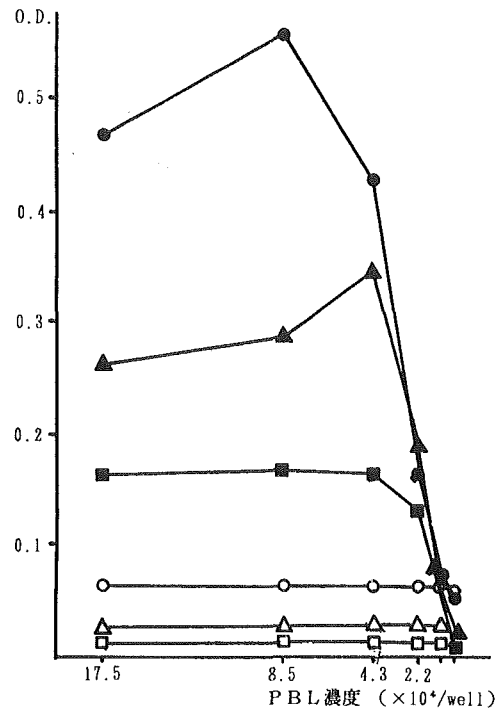


図5 CTLL-2 とPBLの至適濃度 (MTT法)

6) ^3H -サイミジン法によるヒト PBL 増殖能の測定

更に同じ培養上清を CTLL-2 に加え、 ^3H -サイミジン法でも測定した (図 6)。結果は MTT 法とほぼ同様であったが、 ^3H -サイミジン法の場合はいずれの CTLL-2 の濃度でも同様の反応が認められた。

考 按

MTT アッセイの基礎的な検討により、培養リンパ球の増殖能を少量の細胞で迅速かつ簡便に測定できることが確認された。MTT アッセイは 1983 年に Mosmann³⁾ がリンパ球幼若化試験として報告したのが最初で、手技の簡便さの故に広く応用されるに至った。また、Cole⁴⁾、Carmichael⁵⁾、Twentyman⁶⁾ らは制癌剤感受性試験としてこの MTT 法を応用し、汎用されている。

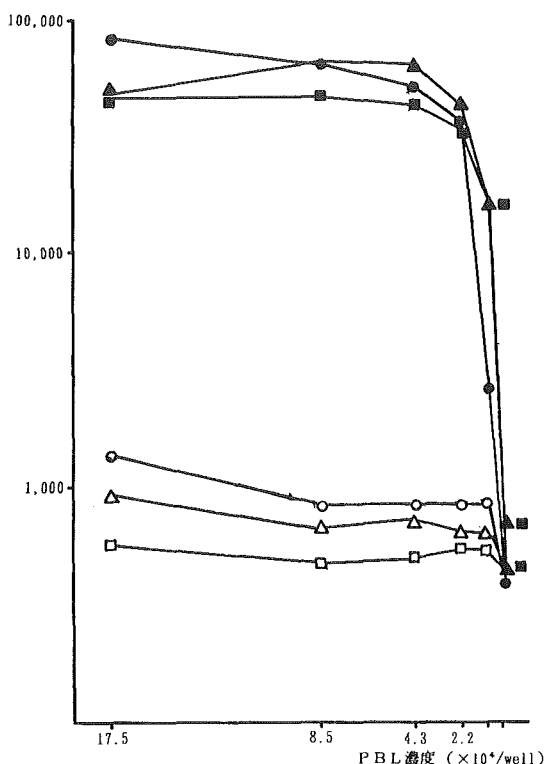


図6 CTLL-2 と PBL の至適濃度 (^3H -サイミジン法)

MTT は生細胞のみにより開裂され、死細胞および赤血球では開裂されないことが知られているが、細胞周期 (Cell cycle) に入っていない生細胞によっても開裂されるために、バックグラウンドが高くなる傾向が認められたため、この点を改良するために我々は、増殖したリンパ球を直接 MTT アッセイで測定する直接法の他に、CTLL-2 を用い MTT 法で間接的に測定する間接法を採用した。直接法ではバックグラウンドが高くなる傾向が認められたが、PBL の至適細胞数で測定することによりこの点は解決された。また、CTLL-2 を用いることにより、MTT アッセイでマイトジェン刺激リンパ球の IL-2 産生能の測定が可能であることも確認された。今後、IL-2 の測定にも MTT 法が広く用いられることが期待される。

MTT 法の利点はその安全性と簡便さにあ

り、設備としてマイクロプレート吸光度自動測定装置があれば、一般の検査室でも測定が可能であるため、アイソトープを使用できない施設においては特に有益な方法であると思われる。

結 語

- 1 MTT アッセイ (直接法) においては細胞数と吸光度 (O.D. 値) との間に正の相関を認めた。この場合、リンパ球数の至適濃度は $8.5 \times 10^4/\text{well}$ であった。
- 2 CTLL-2 を用いることにより間接的にリンパ球増殖能を測定できた。
- 3 培養リンパ球に直接 MTT を加える直接法と間接法は類似のパターンを示した。
- 4 IL-2 依存性の細胞株である CTLL-2 を用いることによりマイトジェン刺激リンパ球の IL-2 産生能の測定も可能であると考えられた。

文 献

- 1) Hersh, E. M., Oppenheim, J. J.: Impaired in vitro lymphocyte transformation in Hodgkins Disease, New Engl. J. Med, 4 ; 1006 ~ 1011, 1965.
- 2) Moretta A : IL-2-Mediated T cell proliferation in humans is blocked by a monoclonal antibody directed against monomorphic determinants of HLA-DR antigens. J. Exp. Med, 155 : 599 ~ 604, 1982.
- 3) Mosmann T : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : Application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunolo. Methods, 65 : 55 ~ 63, 1983.
- 4) Cole SPF : Rapid chemosensitivity testing of human lung tumor cells using the MTT assay. Cancer Chemother. Pharmacol, 17 : 259 ~ 263, 1986.
- 5) Carmichael J, et al : Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay : Assessment of chemosensitivity testing. Cancer Chemother. Pharmacol, 47 : 5875 ~ 5879, 1987.

- 6) Twentyman PR and Luscombe M : A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chmosensitivity. Br. J. Cancer, 56 : 279~285, 1987.