

## トピック

## MTT を用いた生細胞数計測法に影響を与える因子について

小林 淳

日本獣医生命科学大学・獣医学部・獣医保健看護学科・応用部門

**要 約** 細胞増殖/毒性測定用試薬 MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) の生細胞数計測に影響を与える因子について調べた。その結果、以下の事が新たに確認された：1) 牛胎児血清(FBS)濃度や培地の組成が、反応に影響を与える。2) MTT 自身は保存中に培地成分と共存すると分解され易く、特に室温でFBSと混合されると一日で著明な分解が起きる。3) 接着性細胞は接着の有無により反応性が変化する。4) 金属の共存はキレート効果によって干渉される。5) 反応容器によって誤差を生じることがある。

**キーワード** : MTT, 生細胞数計数, 妨害, 酸化還元, WST-1

日獣生大研報 60, 39-49, 2011.

## は じ め に

MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) は、昔から汎用されている市販の細胞増殖/細胞毒性測定用試薬である<sup>1,2)</sup>。その測定原理は試薬が細胞内に取り込まれた時、ミトコンドリア還元酵素によって代謝され、色調・物性変化を伴うことを基にしている。細胞を生育している培地に黄色の MTT 水溶液を加えると、細胞内に取り込まれた MTT は還元酵素による反応を受けて紫色の水に不溶なホルマザンに代謝され、これが沈さとなる。この量（あるいは生成速度）は直接的には還元酵素の活性を示すことになるが、生細胞数をおおよそ反映することからそのホルマザンの生成量（速度）を重量法あるいは比色法で調べることで、生細胞数を計測することが可能となる。比色法の場合、水に不溶のホルマザンは DMSO などの有機溶媒には溶けやすい為、溶液とし分光光度計で吸光度測定することで相対的な測定が可能になる。近年、さらに MTT 代謝物の水への不溶性、また長期保存や光による不安定性を補う形で、WST-1 (2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt) / 1-Methoxy PMS (1-Methoxy-5-methylphenazinium methyl sulfate) を併用した方法も開発され、すでにキット化も行なわれている<sup>2-4)</sup>。

著者は、金属等の環境汚染物質の細胞毒性を調べる目的で MTT を用いているが、その際にこの試薬の特性に起因すると思われる主反応の不安定性や副反応に遭遇し、時に再現性の悪いあるいは予想に反した結果が得られることを体験した。そこで今回、MTT 試薬を用いる際に影響を与える要因について検討を行ない、またその改善方法について考察した。さらに WST-1 などの類似試薬と諸条件につ

いて比較を行なったので報告する。

## 実 験

## 試 薬

MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) は Dojindo のものを使用した。DMSO は和光純薬製特級を使用した。細胞として、甲状腺癌付着細胞 8505C<sup>5,6)</sup> と胃癌浮遊細胞 KATO-III<sup>7,8)</sup> を使用した。牛胎児血清 (FBS) は Gibco のものを使用した。培養液は Sigma の RPMI-1640 及び DMEM と日水の Ham F-12 を使用し、いずれも抗生物質 (100 µg/ml ストレプトマイシン, 100 U/ml ペニシリン ; 和光純薬製生化学用) を添加して用いた。その他の試薬は市販特級品を使用した。

## 方 法

10cm シャーレにサブコンフルエントな状態まで炭酸ガスインキュベーター内で増殖させた各細胞を、接着性の 8505C の場合には 0.25% トリプシン/1mM EDTA (Difco) を作用させて剥がし、それらの細胞懸濁液を多量の PBS で洗浄・希釈し、800 rpm, 5 分間遠心する。上澄みをパスツールピペットで吸引して除き、目的の培地に置換を行なうと共に細胞濃度をおおよそ  $10^5$  cells/ml に調節する。その細胞懸濁液を 0.5 ml ずつ、1.5 ml のエッペンドルフチューブに取り、適当な濃度の MTT 水溶液と適時 FBS を加えて MTT 反応を行なった。反応後、15,000 rpm, 15 分遠心し、上澄みを除いてから沈さを 250 µl の DMSO に溶解し、この溶液の吸光度をプレートリーダーで計測した。なお今回の測定では、吸光度のバックグラウンド補正は行なわず、1 波長測定した値を結果として示す。また一部の結果は反応容器や細胞数の異なる条件で計測したため、適時図の注釈や結果の項に記載した。

### MTT 試薬の物性<sup>9)</sup>

MTT は黄～黄橙色粉末で、融点 190～205℃、モル吸光係数は  $8.25 \times 10^3$  程度 (375 nm 付近) である。メタノールにはやや溶けるが (熱メチルアルコールに 10 mg/ml 程度)、水、エタノールにはわずかししか溶けない物質で、脱水素酵素によって赤紫色のホルマザン (水に溶けた時の  $\lambda_{\max} = 565 \text{ nm}$ ,  $\epsilon = 2 \times 10^4$ ) を生じるとされている。

### 結果及び考察

#### 測定波長

MTT 代謝物であるホルマザンを溶解した DMSO の測定波長はおおよそ 550 nm で吸収極大を取り、物性<sup>9)</sup> とほぼ一致していた。市販のプレートリーダーの多くは 550 nm の干渉フィルターを備えており、この最適波長での測定がプレート法でも実現可能である。ところで細胞を用いた実験では、検出系に例えば MTT 試薬 1 つのみを用いる限り、その感度に合わせた実験系を組まなければならないという制限も受けてしまう。Fig. 1, 2 に示すように、一定の細胞、培地を用いて 550 nm で計測を行なうと、吸光度のバラツキの問題もあるが、 $10^4$ – $10^5$  cells/ml のおおよそ 1 桁の範囲でしか細胞数 (濃度) とホルマザン濃度との間の直線関係は認められない。ただし培地中のフェノールレッドの様な有色性の共存物質を含まない、あるいは取り除ける場合には他の波長でもホルマザン単独の吸光度が計測でき、仮により高濃度の細胞が存在する場合でも別な波長を用いた検量線を作成することが可能で、検出上限の改善は

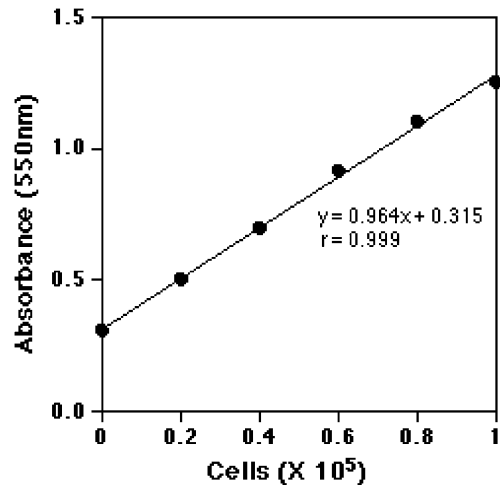


Fig. 1. A Calibration Curve of 8505C Cells  
Eppendorf tubes were used.  
Each 500  $\mu\text{l}$  sample contained  $0$ – $1 \times 10^5$  8505C cells/ml and 10% FBS.  
After adding 50  $\mu\text{l}$  of MTT (0.4 mg/ml), the samples were left at 37°C for 2 hours.  
Centrifugation of the MTT reactant was then carried out at 15,000 rpm and the residue was dissolved in 250  $\mu\text{l}$  of DMSO.  
Absorbance was measured using 200  $\mu\text{l}$  of the solution and a plate reader.

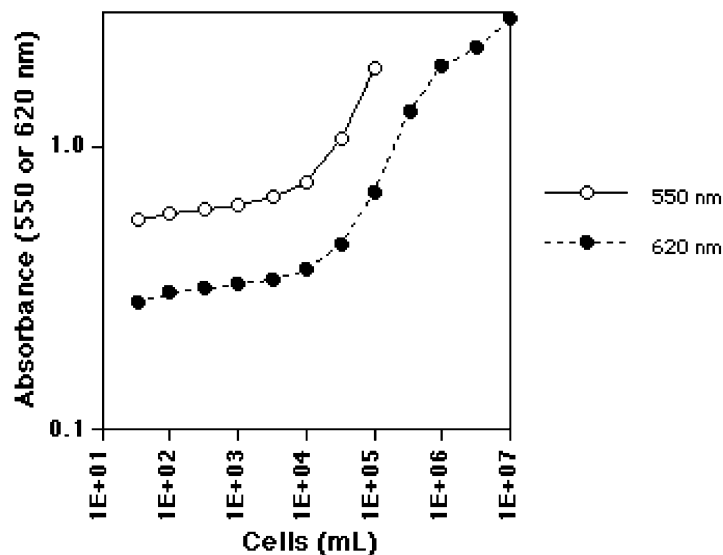


Fig. 2. Effect of Cell Number and Measuring Wavelength  
Absorbance was measured using 200  $\mu\text{l}$  of the solution and a plate reader (550 nm and 620 nm).  
The other procedures were conducted as indicated in the legend of Fig. 1.

可能である。一方、MTT は生成するホルマザンが水に不溶である。このことは溶液化に煩雑な操作を必要とすることを意味するが、他方上澄みの培地を反応後に除き、少量の有機溶媒に再溶解することで感度上昇させ、検出下限を改善することが可能であることにもなる。Fig. 2 では 620 nm を用いた場合を示すが、感度的に約 1 桁低くシフトした標準曲線を描くことが可能であった。ただし単純にスペクトルの特性について考慮すると 550 nm 付近以外はスペクトルの極大波長ではないので、波長の微少なずれにより吸光度変化が起こってしまい、再現性はやや劣ると考えられる。

### 反応時間

Fig. 3 には細胞の濃度を変えて MTT 反応を行なった時、用いた 8505C 細胞数と吸光度との関係を示した。吸光度そのものに着目すると、時間が長くなる程、同じ細胞数でも吸光度が高くなる、すなわち還元酵素による反応が多く進んでいることがわかる。ただし回帰式に着目すると、いずれの反応時間でも相関係数は良好であるが、切片が 0.3 (吸光度) 以上と大きい。これはおそらく試薬の安定性 (保存中の分解、反応中の副反応) が悪いこと、また後で述べるが未反応の試薬が残存することによって考えられる。傾きは時間が長くなる程高くなっているが、その上がり方は 0.5→1 時間では 2.5 倍と 2 倍以上であり、短い時間では反応が条件に依存して均一に起きていないことがうかがえる。1→2 時間では 1.9 倍でほぼ時間に依存して吸光度は増えており、逆にそれ以上 (2→3, 3→4 時間) では 1.2 倍程度しか増えておらず、静置状態で細胞と MTT が接触反応することに制限を生じているためと思われる。すなわち溶解されている MTT 濃度が低くなったか、あるいは残った MTT が不均一であるため、反応性が一定していないと考えられる。

### MTT 濃度

Fig. 4 には反応時間を変えて MTT 反応を行なった時、用いた MTT 濃度と吸光度との関係を示した。MTT 試薬そのものは水に溶解した物を 1/10 容積 (すなわち 10 倍濃度) 添加しているが、その溶解度はほぼグラフの右端の値で上限である。反応時間が長い程、また試薬濃度が 0.4 mg/ml までは高い程吸光度が上昇していることがわかる。しかし試薬濃度が 0.5 mg/ml (最大溶解量) になると上昇は見られず、むしろ吸光度は下がる結果となっている。この理由については不明であるが、8505C 細胞だけでなく KATO-III 細胞を用いた時も同様の結果が得られており、時間が 1 時間と短い時のみ一方的に上昇することから、MTT 自身が細胞毒性を示すためかも知れないと考えられた。Fig. 3 の結果と合わせて考えると、反応時間が短いと再現性が低下する傾向があり、精度の良い定量的な結果を得るには、2 時間程度の反応時間が適当と思われる。反応における試薬濃度は過剰に添加し、反応後も残存していることが望ましく、Fig. 4 の結果からすると 0.4 mg/ml を用いた場合が良好と考えられた。

### 培地の種類

Fig. 5 には培地の種類を変えて MTT 反応を行なった時の用いた細胞数と吸光度との関係を示す。いずれの培地の場合にも吸光度と細胞数との間に直線関係は成り立つが、培地そのものの種類及び FBS の添加の有無がその吸光度に大きく影響を与えた。特に本来、細胞生育培地でない PBS を溶媒として用い、MTT 反応を行なうと検量線の傾きは最も小さく、通常の培地中の成分が反応に正の影響を与えていることが確かめられた。他方、FBS の添加の有無に寄っても検量線の傾きや切片が変わることが明らかとなり、MTT 反応に試薬や反応時間等ばかりでなく、培地の種類も大きく影響を与えることが明らかとなった。

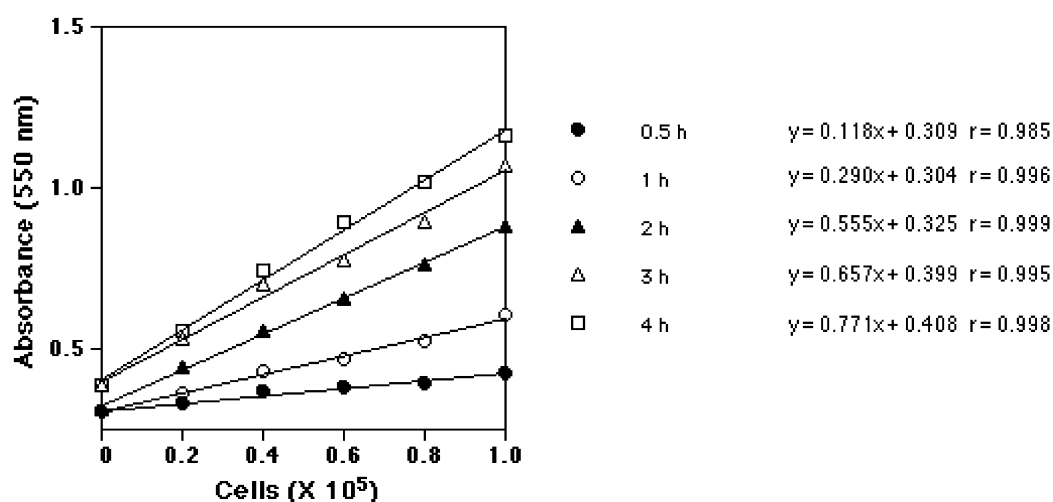


Fig. 3. Effect of Reaction Time

Regression curve of each reaction time (0.5, 1, 2, 3 or 4 hours) and relation coefficient of these curves were shown on the right side.

The other procedures were conducted as indicated in the legend of Fig. 1.

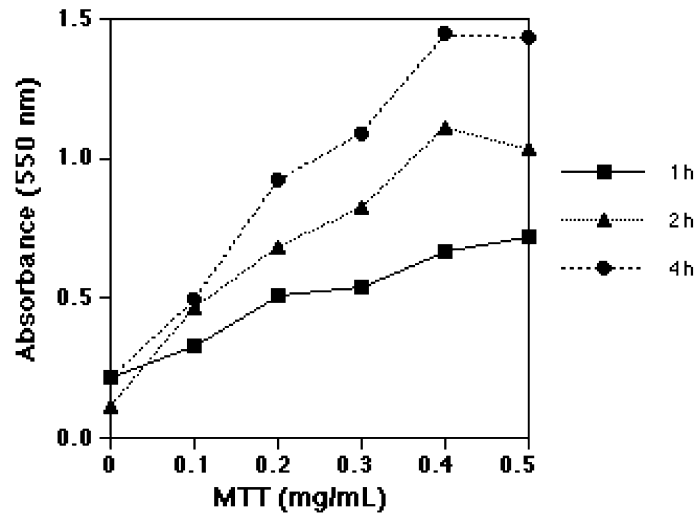


Fig. 4. Effect of MTT Concentration

After adding 50  $\mu$ l of MTT (0–0.5 mg/ml), the samples were left at 37°C for several times (1, 2 or 4 hours). The other procedures were conducted as indicated in the legend of Fig. 1.

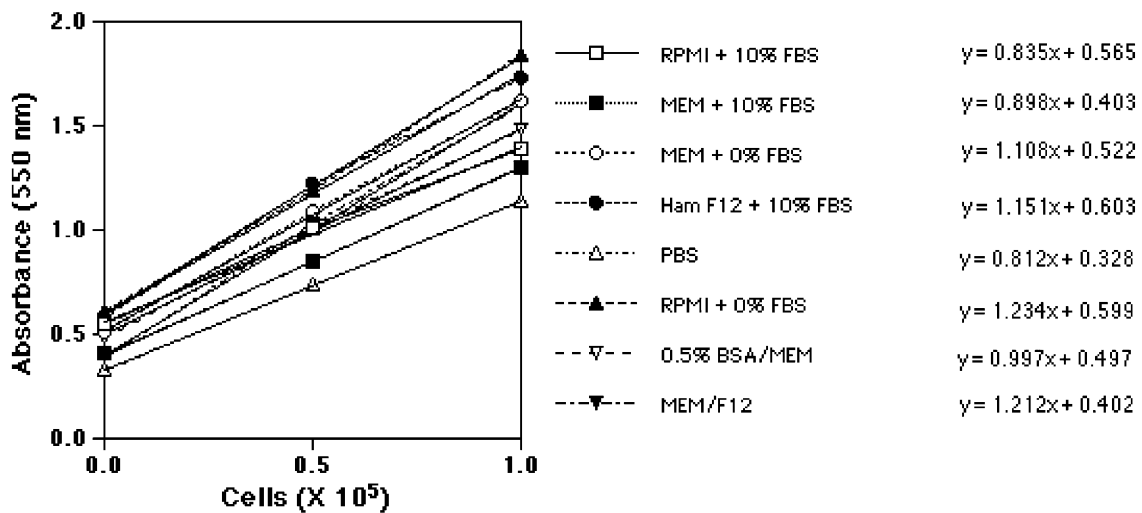


Fig. 5. Effect of Medium

Each 500  $\mu$ l sample contained 0–1  $\times 10^5$  8505C cells/ml of various media.

Regression curve of each medium was shown at the right side.

The other procedures were conducted as indicated in the legend of Fig. 1.

#### FBS 濃度

前の項で、MTT 反応を行なう培地の組成について検討したが、そのうち FBS 濃度について詳細に検討した。結果を Fig. 6 に示す。FBS の濃度、培地の組成が異なると検量線の傾きが変わるのは前の結果と同様である。通常、細胞培養に用いられる培地を用いると、FBS が入っていないか (0%) 入っているかは検量線に大きく影響を与え、それは傾きに表れるが、FBS 濃度にはほとんど影響されない。他方 PBS を培地として利用すると濃度依存的に FBS の濃度

が高い程吸光度も高くなっている。Fig. 5 で様々な培地について示したように、同じ FBS 濃度でもその吸光度は培地の種類によって異なる。このことは FBS と培地成分の両方に MTT 反応に影響を与える物質 (例えば、金属やアミノ酸) が存在していることを示している。通常 MTT 反応を行なう場合、培地は細胞ごとに増殖条件の良いものが選択されるため、逆に MTT 反応の為にこれを最適化することは極めて難しいが、それを補う形で FBS 濃度を変更することで感度の調節ができる可能性が示唆されていると

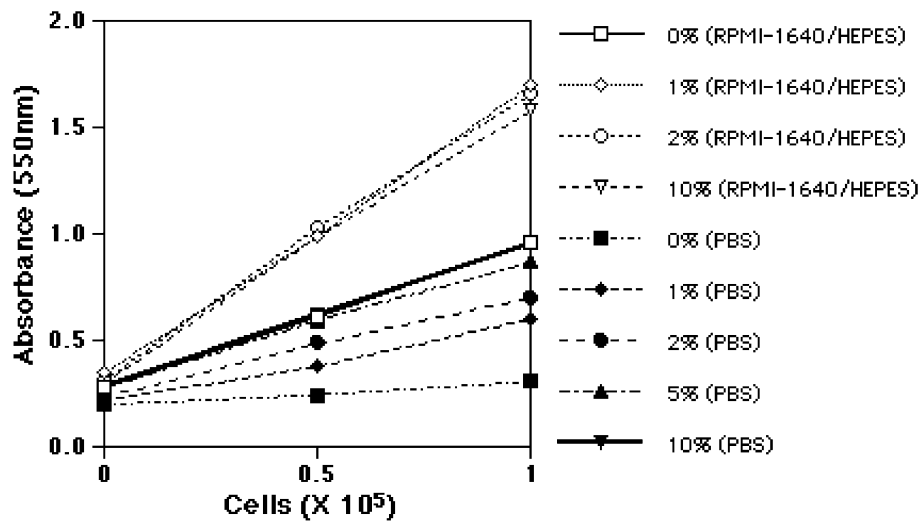


Fig. 6. Effect of FBS Concentration

Two media (RPMI/HEPES and PBS) with various FBS concentrations were tested.

The other procedures were conducted as indicated in the legend of Fig. 1.

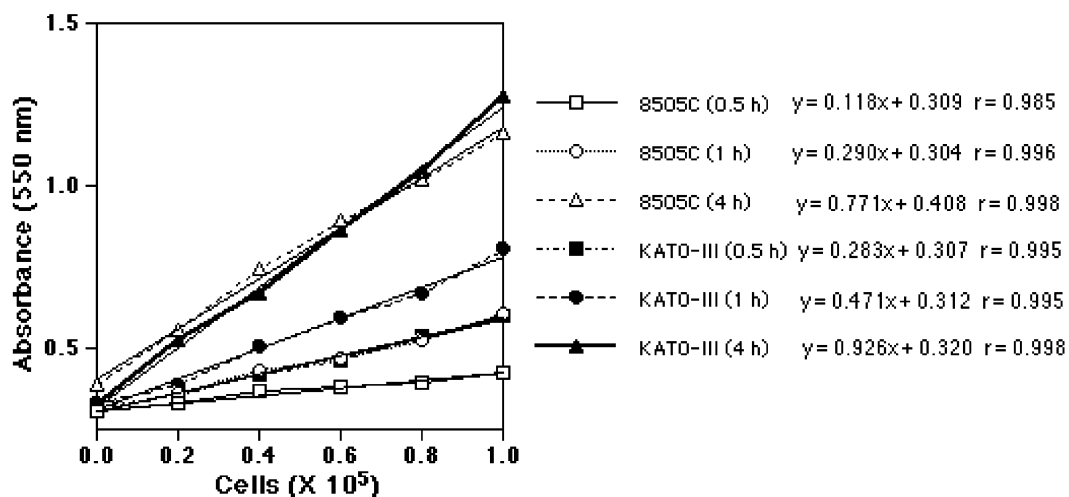


Fig. 7. Effect of Cell Kinds

Experiments were performed by various reaction times and using two cells.

Regression curve of each medium and relation coefficient of these curves were shown at the right side.

The other procedures were conducted as indicated in the legend of Fig. 1.

思われる。

#### 細胞の種類

細胞の種類によっても当然、MTT 反応の進行度合いは異なる。Fig. 7 に示すように条件が全く同じでも 8505C 細胞と KATO-III 細胞では得られる吸光度は異なる。すなわち細胞の種類によって最適となる培地の種類が異なるように、直接的には細胞内ミトコンドリアの還元酵素の活性や細胞内への MTT の取込み量が細胞の種類により異なると考えられる。従って仮に同じ反応条件で MTT 反応が行え

るとしても、検量線は細胞の種類ごとに作成する必要があることになる。

#### 安定性 (光, 温度)

MTT 試薬は光や熱に対して不安定で、また酸化還元電位が細胞内の還元酵素に適切であると言っても、特異的にそれとのみ反応するわけではない。また細胞を用いた実験の種類にもよるが、初めから培地中に FBS が添加されていない場合には、前の結果からすると MTT 反応直前に面倒でも FBS を添加する必要がある、その方が感度を上げ



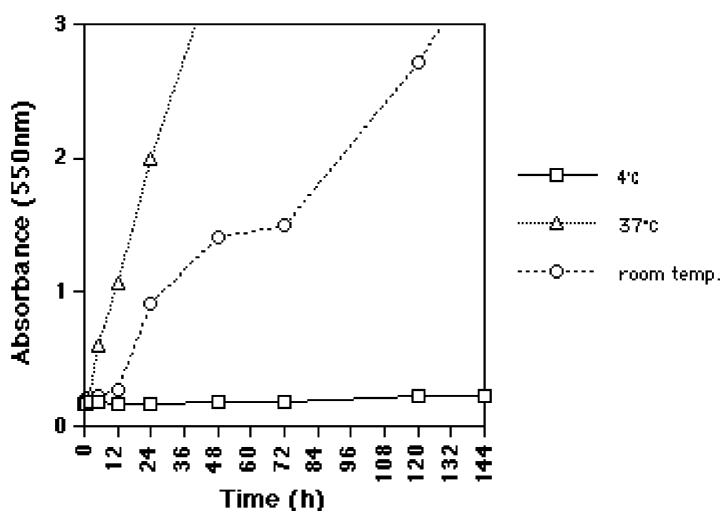


Fig. 8. Effect of Storage on Mixture of FBS and MTT Reagent

Each sample contained 50 $\mu$ l of MTT (0.4 mg/ml) and 25 $\mu$ l of FBS.

They were left in a refrigerator (4°C), incubator (37°C) or at room temperature in the laboratory.

After adding 500 $\mu$ l of  $1 \times 10^5$  8505C cells/ml, the reactant was left at 37°C for 2 hours.

The other procedures were conducted as indicated in the legend of Fig. 1.

ることができる。Fig. 8 には、細胞に後から MTT 試薬と FBS を加えると想定した場合に、FBS と MTT の混合溶液の安定性について示したものである。折線間の違いは細胞に添加する前の試薬の保存状態のみである。図を見て分かるように冷蔵以外の特に 37°C に加温した場合には、非常に吸光度が高くなり、試薬が保存中に分解しホルマゼンを形成してしまっていることがわかる。FBS と混合されていない場合には、より分解される割合は低い、しかし室温以上では長期保存には耐えない。これらより試薬の保存は冷蔵遮光が望ましく、FBS は可能ならば面倒でも反応直前に分けて加えることが推奨されることになる。

#### 細胞の状態（接着と浮遊）

MTT 反応が細胞種や培地条件によって、その反応性が異なることは既に述べた通りであるが、細胞自身の状態（接着細胞が未接着の場合等）で反応性が異なるかどうかは知られていない。そこで今回、シャーレから剥がしてから時間の異なった（すなわち接着割合の異なる）同一種の細胞（8505C）とシャーレそのものが細胞培養用の物とそうでないものを用いて MTT 反応を行ない、影響を確かめた。結果を Fig. 9A に示すが、シャーレの種類により、また接着時間によって、MTT の反応性が異なっていた。ただしこれらの結果はシャーレにおいて直接 MTT 反応を行なったことによるとも考えられる。すなわち、操作として MTT 反応物を DMSO に溶解する前に上澄みを除くが、その際に MTT 代謝物の一部も浮遊している細胞と共に除かれてしまっている可能性は否定できないので、この結果が接着していた細胞数を反映しているのか、存在していた

細胞の状態を反映しているのかは疑問が残る。そこで Fig. 9B に示すように 1.5 ml チューブを反応容器とした場合の時間経過についても検討し、接着の有無で反応性そのものがやや異なることを確認した。

#### 金属の共存

初めに示したように、著者は MTT 反応を金属等の細胞毒性試験の指標として利用している。金属等の細胞毒性被検物質を高濃度に培地中に添加すると、場合により金属の沈澱が生じて MTT 反応を阻害する（濁って吸光度が高く見積もられる）ことはもちろんであるが、まれに比色の色調が Table 1 に示すように青色や緑色にシフトすることが観察される。溶液自体に濁りはなく、色調が異なるため、同一の測定波長では吸光度が低めに見積もられることになる。このような色の変化は金属を MTT 反応直後に添加した場合でも起き、これは細胞が死んだことによるわけではなく、MTT 反応物と金属とのキレートで色の変化を伴ったことによると考えられる。

#### エタノールの量

同様にエタノールの量（これ自身が被検物質というよりも、有機の被検物質を溶解するための溶媒としてよく利用される）が過剰に添加された場合にも、MTT 反応に影響を与えることがある。これも一般に金属の場合と同様、色調変化を伴うためと考えられたが、今回追試した結果、色調変化は観察されなかった。そこでエタノールの添加量、添加時期を換えて MTT 反応を行なった。結果を Fig. 10 に示すが、約 10% で細胞に影響を与え、20% 近くになると MTT 反応にも影響を与えることが分かった。ただし通

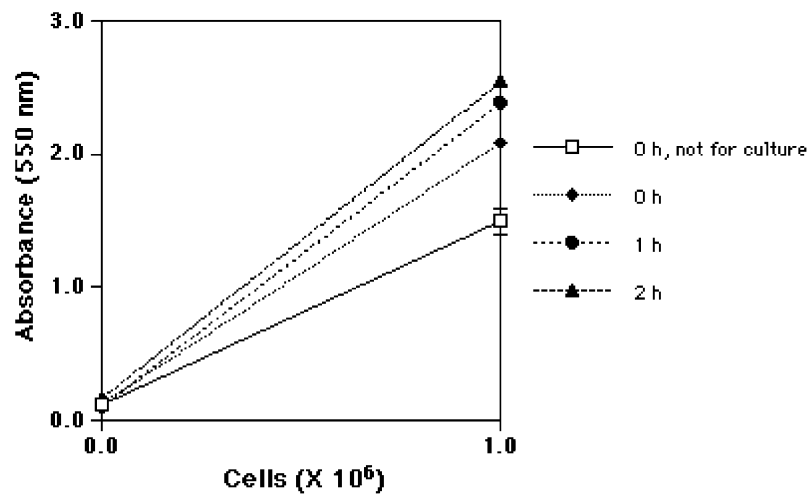


Fig. 9A. Effect of Adhesion on Dish

Ten cm dishes(for culture and not for)were used.

After a 10 ml 8505C cells suspension was added into the dish, MTT assay (0.4 mg/ml MTT) was performed immediately or difinited times (1 or 2 hours ; shown at the right side).

The supenatanant was removed and the residue was dissolved in 2.5 ml of DMSO.

The other procedures were conducted as indicated in the legend of Fig. 1.

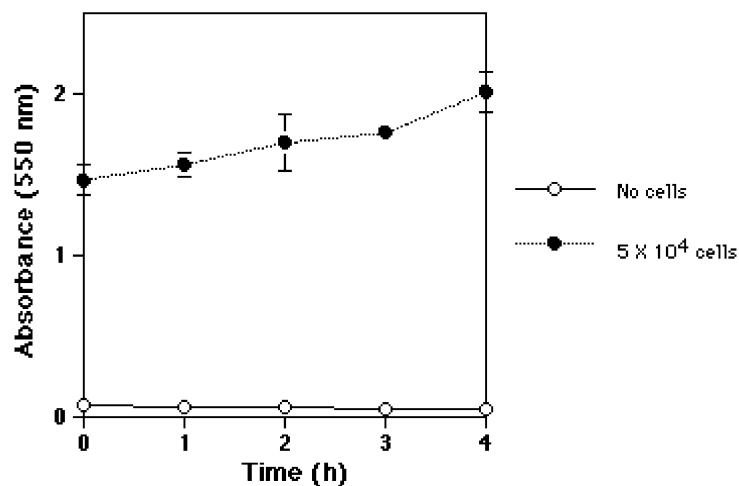


Fig. 9B. Effect of Adhesion on Eppendorf Tube

Each 500  $\mu$ l sample contained 0 or 5  $\times 10^4$  8505C cells/ml and 10% FBS.

After a 8505C cells suspension or the culture medium were added in the tubes, MTT assay (0.4 mg/ml MTT) were performed immediately or difinited times (1-4 hours).

The other procedures were conducted as indicated in the legend of Fig. 1.

常, 細胞毒性試験として用いられるエタノールは0.1%以下程度しか使用されないので, 特に問題とならないと思われた。

その他 (試薬の吸着, 反応物の安定性など)

シャーレや培養プレートに培地のみを加えた場合と細胞も含む場合とで, 時に MTT 反応の結果が同様な (同じぐ

Table 1. Typical Effect of Metals on MTT Assay

Metals	No or 10 <sup>4</sup> cells	Metal Addition	Color (Medium reacted)	Color (MTT product in DMSO)	Absorbance (550 nm)	Peaks (Wavelength and Absorbance)
None	Neg.	-	Red		0.203	378 (0.262), 556 (0.204)
	Pos.	-	Dark Red	Purple	1.352	555 (1.358)
Calcium	Neg.	Before MTT	Red		0.060	377 (0.245), 548 (0.061), 655 (0.017)
		After MTT	Red		0.071	378 (0.305), 547 (0.071), 656 (0.017)
	Pos.	Before	Dark Red	Purple	0.710	306.5 (0.539), 550 (0.710)
		After	Dark Red	Purple	0.808	306.5 0.560, 549.5 0.808
Cadmium	Neg.	Before	Blue	Blue	0.079	378.5 (0.482), 655 (0.126)
		After	Blue	Blue	0.106	376.5 (0.574), 648 (0.244)
	Pos.	Before	Blue	Blue	0.089	378 (0.541), 654.5 (0.201)
		After	Blue	Blue	0.381	329.5 0.994, 646 1.304
Aluminum	Neg.	Before	Yellow	Light Brown	0.050	380.5 (0.817), 584 (0.047), 659 (0.041)
		After	Yellow	Light Brown	0.069	307.5 (0.569), 381.5 (0.785), 654.5 (0.028)
	Pos.	Before	Yellow	Light Brown	0.048	379 (0.798), 669 (0.027)
		After	Yellow	Light Brown	0.433	306.5 (0.900), 380.5 (0.826), 507.5 0.533
Manganese	Neg.	Before	Red		0.080	307.5 (0.341), 378.5 (0.375), 548 (0.080), 619.5 (0.070), 659.5 (0.071)
		After	Red		0.089	376.5 (0.359), 483 (0.090), 555 (0.089), 583 (0.089), 656 (0.088)
	Pos.	Before	Dark Red		0.242	306.5 (0.793), 364.5 (0.762), 518.5 (0.248), 586.5 (0.253)
		After	Dark Red		0.238	307 (0.910), 522 (0.240), 586 (0.250), 656 (0.210)

Experiments were performed by using with 24-wells plates.

After 10<sup>4</sup> 8505C cells were attached on each well of the plates, MTT assay was performed with or without each metal and cells.

A 0.1 mol/l metal was added into each well before or after MTT reaction (0.4 mg/ml).

Centrifugation of the MTT reactant was then carried out at 2,000 rpm and the residue was dissolved in 250  $\mu$ l of DMSO.

Absorbance spectrum was measured using a spectrophotometer.

The other procedures were conducted as indicated in the legend of Fig. 1.

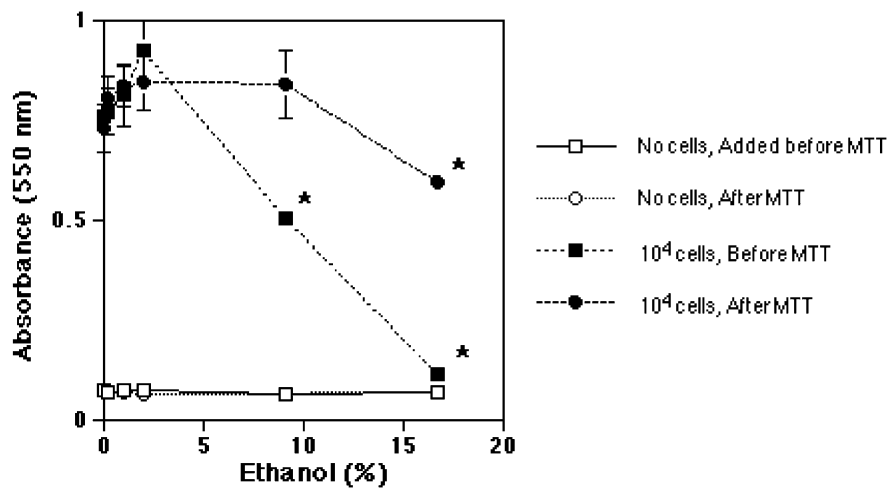


Fig. 10. Effect of Ethanol

Twenty four-wells plates were used.

After 10<sup>4</sup> 8505C cells were attached on each well of the plates, MTT assay was performed with or without ethanol and cells.

Ethanol was added into each well before or after MTT reaction (0.4 mg/ml).

Centrifugation of the MTT reactant was then carried out at 2,000 rpm and the residue was dissolved in 250  $\mu$ l of DMSO.

The other procedures were conducted as indicated in the legend of Fig. 1.

\* : Differences of absorbance in time were seen statistically.



らの吸光度が得られる) ことがある。非培養容器の 1.5 ml のチューブを用いた場合も同様である。反応に使った容器を精査すると光等によって細胞がなくても反応が起こったこと、さらにそれによって生じたホルマザンが本来細胞が接着に関わらない場所 (シャーレの側面等) に吸着し、それが上澄みと共に除くことができず、DMSO などで再溶解されることで、高めの吸光度が得られてしまうことがわかった。この現象は毎回同レベルで起こるわけではなく、再測定することで影響が出なくなることもあるが、MTT 反応が容器によって誤差を生じることは目新しい事実である。

また MTT 反応物の安定性も考慮の必要がある。Fig. 11 には MTT 反応後の DMSO 溶液の吸光度変化を示すが、初期においてはブランク、サンプル溶液とも時間経過と共に吸光度は上昇傾向にある。しかし時間がたつと共にサンプル溶液の吸光度は下降した。これは DMSO への反応物の再溶解時に未反応の試薬が残存し、それが光や温度ですぐに代謝されるが、反応物の分解も同時に起こるため、徐々に退色した結果と考えている。

さらに MTT 反応物を溶解する溶媒を比較した結果を Fig. 12 に示す。今回溶媒として、DMSO と未反応の MTT 試薬が溶解しやすいメタノールを使用し、MTT 反応まで同様の条件で行なって、最後の有機溶媒に再溶解する行程を 2 種の溶媒で比較した。まず色調は、DMSO に溶解した場合と比べて、メタノールに溶解した場合はやや青色 (高波長) 側にシフトし、これは溶媒の性質 (DMSO は塩基性、メタノールは酸性) のためと思われた。吸光度そのものはメタノールの方が非常に低く、しかも揮発により容積

が変化しやすいため、測定における再現性が非常に悪くなる傾向があった。

#### WST-1 との比較

MTT 試薬の煩雑な操作性、光不安定性を補う形で開発された WST-1 と MTT とを比較してみると、確かに MTT の場合、操作は煩雑であるが、WST-1 の場合は別途 1-Methoxy PMS などの電子供与体を用いる必要がある。また WST-1 の場合には水溶性の反応生成物を生じるので、すぐに吸光度測定が可能ではあるが、培地の色に影響を受けやすい (試薬の取扱説明書にはフェノールレッドなどの有色物を除くことが推奨されている)。MTT の場合には不溶性ホルマザンを生成することを利用し、有色物の除去、容積を減らして感度上昇できる可能性があり、必ずしもどちらが優れているとは言い難い面があると思われる。光不安定性について、WST-1 は大幅に改善された (溶液は 1 年以上の保存安定性がある) とされているが<sup>9)</sup>、1-Methoxy PMS と混合後の安定性はわずか 3 日となっている。MTT は特に溶液において不安定であると考えられているが、先に述べたように分解を最小限に食い止めることは可能であり、WST-1 を用いても、無色から有色という比色変化ではないため (元の物質、反応生成物とも黄色)、切片を持つ検量線を引かなければならず、モル吸光係数が MTT の倍ぐらいであるとしても、実質的な感度差はほとんどない。本論文でここまで挙げたような MTT の性質を熟知して使用すれば、逆に MTT の方が優れた点も多いと思われる。

WST-1 以外にも<sup>3</sup>H-チミジンを用いた DNA 合成における細胞取込みを検出する方法<sup>10)</sup> も使われることがある。利

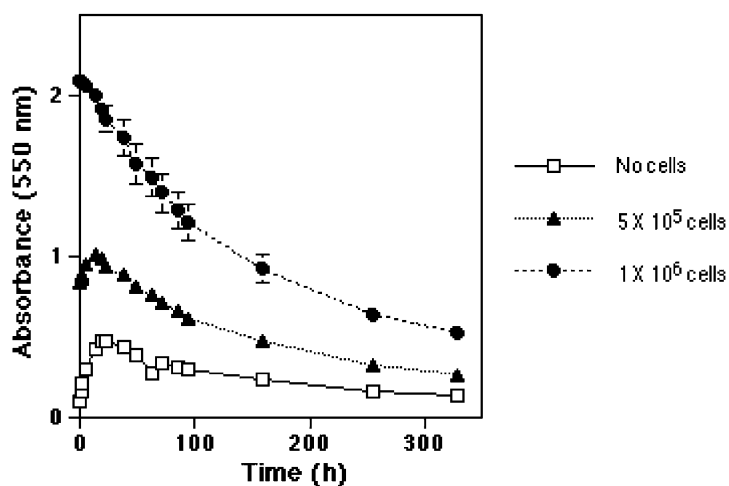


Fig. 11. Effect of Time Progress on MTT Product

MTT reaction was performed in 10 cm dish by using with  $0-10^6$  8505C cells and 0.4 mg/ml MTT.

After the reaction left at 37°C for 2 hours, MTT product was dissolved into 2.5 ml DMSO and the absorbance was measured by a plate reader.

These absorbances were remeasured after 0-14 days.

Leaving was performed at room temperature and not prevented light.

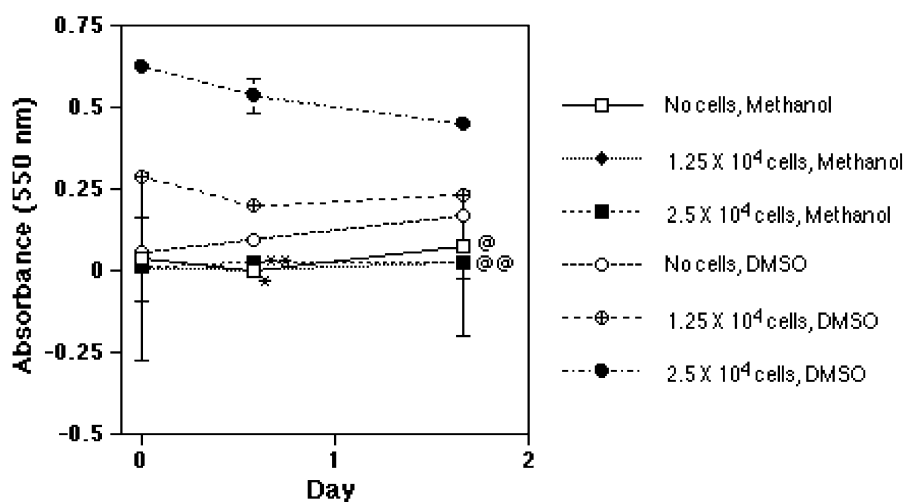


Fig. 12. Effect of Solvent

Twenty four-wells plates were used.

Each 500 $\mu$ l sample contained 0–2.5  $\times 10^4$  8505C cells.

Centrifugation of the MTT reactant was then carried out at 15,000 rpm and the residue was dissolved in 250 $\mu$ l of solvent (methanol or DMSO)

The other procedures were conducted as indicated in the legend of Fig. 1.

\*: Solvent (Methanol) volume was reduced for standing several hours.

@: The residue was redissolved in methanol and the absorbance was remeasured.

点は放射性同位体を利用するため、感度が高いことであるが、同時に使用場所に制限を受けること、細胞取り込みに時間がかかることや廃棄物処理の問題がある。また最近、Bromodeoxyuridine (BrdU) の DNS 合成期の取込みを指標にした方法も市販化された<sup>11)</sup>。この方法は  $^3\text{H}$ -チミジンを用いた方法に似ているが、放射性同位元素は用いず、ペルオキシダーゼ標識した抗 BrdU 抗体を用いる方法である。この方法も BrdU の細胞取込みに時間がかかり、短時間での細胞増殖や接着といった反応をモニターすることはできない。

以上、今回、著者は MTT 試薬を生細胞数計測に使用していくなかで生じた誤差や副反応について、一部その改善方法を含めて報告した。本試薬はすでに繁用されており<sup>12–17)</sup>、日常の研究において何の疑いもなく使用されている感があるが、著者の経験したようなエラーに遭遇しつつも気付かない場合や無視されて来た可能性があることは、頻度の違いはあるものの否定できない。これらを把握、あるいはそもそもそのようなことのない反応系を新規構築することが、手技の習熟によらず目的とする適切な結果を得ることに繋がり、非常に有意義と考えられ、本論文がその手助けとなることを期待する。

## 謝 辞

本研究遂行にあたり、培養細胞 8505C をご供与頂きました東北大学加齢医学総合研究所に感謝いたします。また的

確なアドバイスを頂き、試薬を御供与頂いた同志社女子大学の木津良一教授に心より深謝致します。

## 引用文献

- 1) SLATER, T. F., SAWYER, B. and STRAULI, U. (1963). Studies on Succinate-tetrazolium Reductase Systems III. -Points of Coupling of Four Different Tetrazolium Salts. *Biochim. Biophys. Acta*, **77**, 383–393.
- 2) MOSMANN, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods*, **65**, 55–63.
- 3) SCUDIERO, D. A., SHOEMAKER, R. H., PAULL, K. D., MONKS, A., TIERNEY, S., NOFZIGER, T. H., CURENS, M. J., SENIFF, D. and BOYD, M. R. (1988). Evaluation of a Soluble Tetrazolium/Formazan Assay for Cell Growth and Drug Sensitivity in Culture Using Human and Tumor Cell Lines. *Cancer Res.*, **48**, 4827–4833.
- 4) ISHIYAMA, M., SHIGA, M., SAKAMOTO, K., MIZOGUCHI, M. and HE, PIN-GANG (1993). A New Sulfonated Tetrazolium Salt That Produces a Highly Water-Soluble Formazan Dye. *Chem. Pharm. Bull.*, **41**, 1118–1122.
- 5) VOIGT, W., BULANKIN, A., MULLER, T., SCHOEBER, C., GROTHEY, A., HOANG-VU, C. and SCHMOLL, H. J. (2000). Schedule-Dependent Antagonism of Gemcitabine and Cisplatin in Human Anaplastic

- Thyroid Cancer Cell Lines. *Clin. Cancer Res.*, **6**, 2087–2093.
- 6) MASSART, C., POIRIER, C., FERGET, P., FARDEL, O. and GIBASSIER, J. (2005). Effect of Sodium Butyrate on Doxorubicin Resistance and Expression of Multidrug Resistance Genes in Thyroid Carcinoma Cells. *Anticancer Drugs*, **16**, 255–261.
- 7) ITOH, T., ITOH, Y., MIZUTANI, M., FUJISHIRO, K., FURUICHI, Y., KOMIYA, T. and HIBASAMI, H. (2004). Hot-water Extracts from Adzuki Beans (*Vigna angularis*) Suppress Not Only the Proliferation of KATO III Cells in Culture But also Benzo[a]pyrene-induced Tumorigenesis in Mouse Fore-stomach. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*(Tokyo), **50**, 295–299.
- 8) OHYAMA, K., AKAIKE, T., IMAI, M., TOYODA, H., HIROBE, C. and BESSHO, T. (2005). Human Gastric Signet Ring Carcinoma (KATO-III) Cell Apoptosis Induced by Vitex agnus-castus Fruit Extract through Intracellular Oxidative Stress. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **37**, 1496–1510.
- 9) Product Catalog of Dojin Laboratories 23rd Edition.
- 10) BRANDI, G., SCHIAVANO, G. F., ZAFFARONI, N., DE MARCO, C., PAIARDINI, M., CERVASI, B. and MAGNANI, M. (2005). Mechanisms of Action and Antiproliferative Properties of Brassica oleracea Juice in Human Breast Cancer Cell Lines. *J. Nutr.*, **135**, 1503–1509.
- 11) Funakoshi Reagent News, Bromodeoxyuridine Cell Proliferation Assay, Frontier, p.13, 1 June '05.
- 12) MONTORO, E., LEMUS, D., ECHEMENDIA, M., MARTIN, A., PORTAELS, F. and PALOMINO, J. C. (2005). Comparative Evaluation of the Nitrate Reduction Assay, the MTT Test, and the Resazurin Microtitre Assay for Drug Susceptibility Testing of Clinical Isolates of Mycobacterium Tuberculosis. *J. Antimicrob. Chemother.*, **55**, 500–505.
- 13) ARSECULERATNE, S. N. and ATAPATTU, D. N. (2004). The Assessment of the Viability of the Endospores of Rhinospordium seeberi with MTT (3-[4,5-dimethyl-2-thiazolyl]-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide). *Mycol. Res.*, **108**, 1423–1430.
- 14) CETIN, Y. and BULLERMAN, L.B. (2005). Cytotoxicity of Fusarium Mycotoxins to Mammalian Cell Cultures as Determined by the MTT Bioassay, *Food Chem. Toxicol.*, **43**, 755–764.
- 15) DUTTA, A., BANDYOPADHYAY, S., MANDAL, C. and CHATTERJEE, M. (2005). Development of a Modified MTT Assay for Screening Antimonial Resistant Field Isolates of Indian Visceral Leishmaniasis. *Parasitol. Int.*, **54**, 119–122.
- 16) NOGUCHI, K., IWAHASHI, M., TANI, M., NAKAMURA, M., NAKAMORI, M., NAKATANI, Y., UEDA, K., ISHIDA, K., NAKA, T., OJIMA, T., HOTTA, T., MIZOBATA, S. and YAMAUE, H. (2005). Evaluation of Chemosensitivity Testing with Highly Purified Tumor Cells in 435 Patients with Gastric Carcinoma Using an MTT Assay. *Anticancer Res.*, **25**, 931–937.
- 17) BURTON, J. D. (2005). The MTT Assay to Evaluate Chemosensitivity. *Methods Mol. Med.*, **110**, 69–78.
-