

APPLICATION NOTE

Celloger® Mini Plus を用いたノダゾール誘導細胞毒性の解析

1. はじめに

細胞毒性とは、化学物質や物理的な要因で、細胞が受ける障害の程度を指します。薬剤開発や生物学的研究において、細胞毒性アッセイにより細胞毒性を測定することは必要不可欠です。細胞には、アポトーシスやネクローシス、ネクロプトーシスなど、様々な細胞死プロセスを引き起こす複雑なシグナル経路があります。しかし、ほとんどの細胞毒性アッセイはエンドポイントの結果を測定するもので、薬剤に対する細胞の動的応答を研究することは難しいと言えます。

このアプリケーションノートの目的は、リアルタイムイメージングを利用した細胞毒性アッセイのパフォーマンスをテストすることです。そのため、様々な濃度のノダゾール（抗がん剤）で処理した細胞を蛍光色素で染色し、**Celloger® Mini Plus** を用いて細胞死のモニタリングを行いました。

タイムラプスイメージングで、ノダゾールの濃度に依存してアポトーシスが増加することを観察し、また **Celloger® Mini Plus** に付属の解析ソフトウェアを用いて、アポトーシスの定量化およびグラフの作成を行いました。

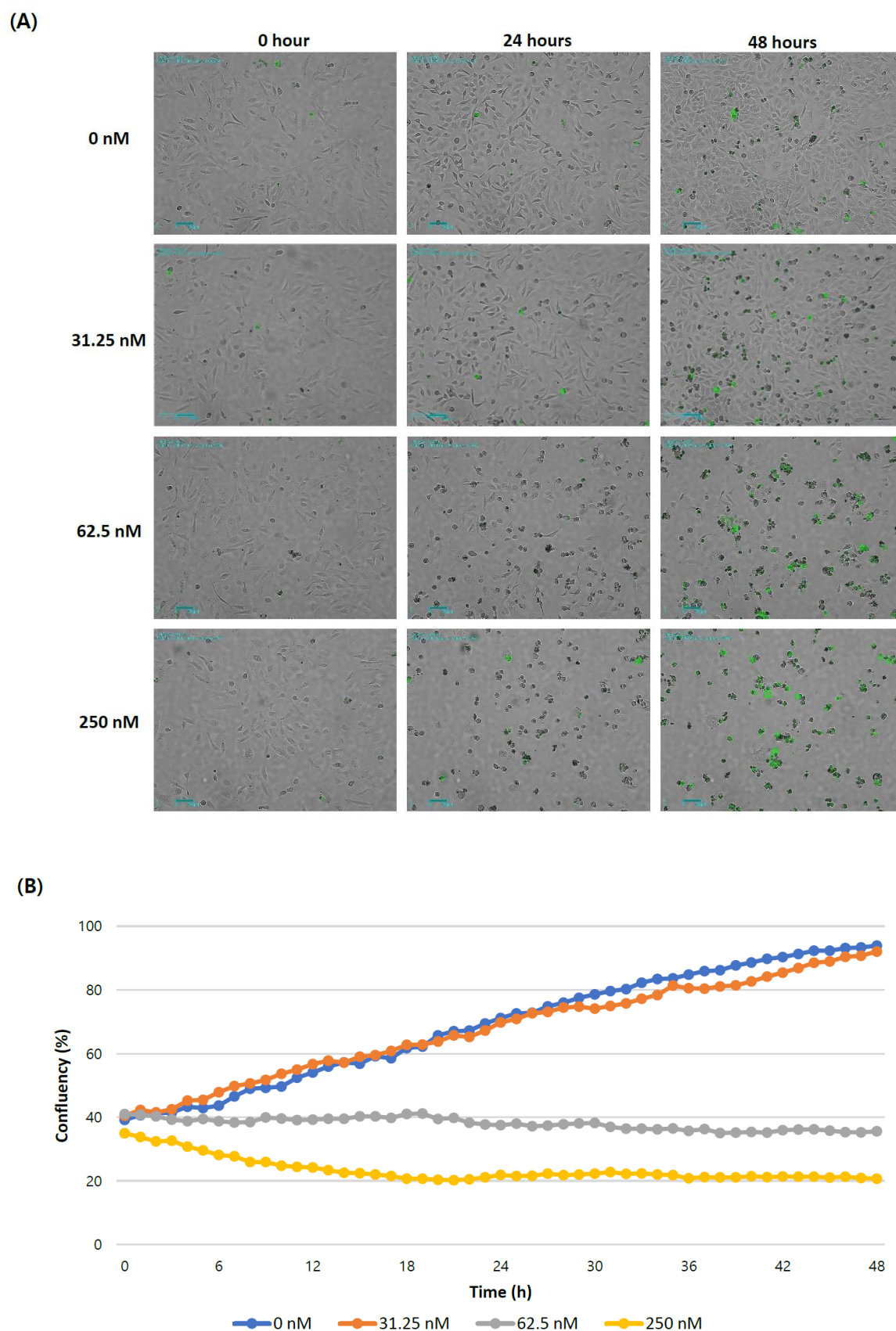
2. 方法

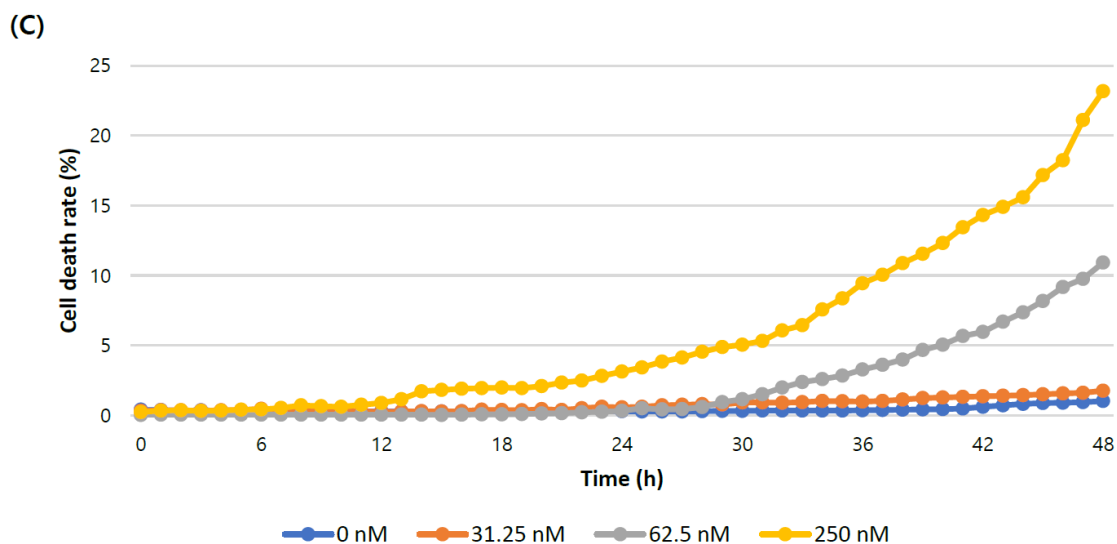
自動セルカウンター-Facscope B を使用して HeLa 細胞をカウントし、48 ウェルプレートに、 1×10^4 個/ウェルの細胞を播種しました。オーバーナイトで培養した後、様々な濃度（16.625nM、31.25nM、62.5nM、125nM、250nM）のノダゾールで処理しました。またこの段階で、細胞死に伴い細胞膜に障害を受けた細胞の DNA に結合する CellTox 緑色色素（Promega, G8742）をサンプルに加えました。インキュベーター内に設置した **Celloger® Mini Plus** で、1 時間おきに 48 時間、細胞の画像を撮影し、解析ソフトウェアにより解析を行いました。細胞死の割合（%）は、蛍光カバー率（=死細胞）÷明視野コンフルエンス（全細胞）で算出しました。

3. 結果

様々な濃度のノダゾールで細胞を処理し、イメージングを行った結果、濃度依存的に細胞の形態が変化し、またコンフルエンスが低下することが明視野にて観察されました（図 1 A、B）。さらに、CellTox で染色された死細胞の蛍光イメージングから得られた蛍光カバー率や細胞死の定量化により、蛍光染色された細胞の割合がアポトーシスに伴って増加することが示されました（図 1 C）。

図 1.タイムラプスイメージングを利用したノダゾール濃度依存的細胞死の解析





- (A) ノコダゾールの各濃度の明視野および蛍光のマージ画像（24 時間毎）。緑色の蛍光は死細胞を示している。（スケールバー：200 μ m）
- (B) 全細胞のコンフルエンス（%）グラフ。
- (C) 細胞死（%）グラフ

4. 結論

Celloger® Mini Plus ライブセルイメージャーは、インキュベーター内で明視野画像と蛍光画像を同時にイメージングすることが可能です。可動式のカメラにより、ユーザーの設定に合わせ、セットされた間隔で様々なポジションのイメージングが可能です。解析ソフトウェアを使用することで撮影した画像のコンフルエンスを算出し、コンフルエンスグラフを作成することもできます。また、蛍光カバー率を測定することにより、ノコダゾールの濃度によるアポトーシスの定量化が可能となります。

※本資料は、Curiosis 社の許諾を得て、ワケンビーテック社が原文資料(英語)を日本語に翻訳したものです。

Curiosis 社や弊社の許諾なく複製、転載などを行うことはお控えください