MTT 法によるリンパ球幼若化反応の検討

小林豊一^{*1)}, 原田ひとみ・柴田健介^{*2)},
廣瀬俊一^{*1)}

rapid communication

Studies on mitogen-induced proliferative response in colorimetric MTT assay

The effect of several agents on mitogen-induced proliferative response *in vitro* was studied by using colorimetric MTT[3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H tetrazolium bromide] assay. Immunomodulator levamisole and TOK-8801 enhanced concanavalin A and lipopolysaccharide response in murine splenocytes at concentrations of 10^{-6} ~ 10^{-5} M and 10^{-4} M, respectively. Immunosuppressant mizoribine decreased dose dependently this response.

These results show that MTT assay may be a useful method for the evaluation of immunological affecting agents on cell proliferative response.

Toyokazu Kobayashi^{*1)}, Hitomi Harada・Kensuke Shibata^{*2)}, Shun-ichi Hirose^{*1)}

key word: MTT assay, mitogen-induced proliferative response, mizoribine, levamisole, TOK-8801

MTT 法は細胞増殖機能の測定において、放射性ラベル化合物を用いることなく、しかも多検体を短時間に比較的簡便に処理できることから、その有用性は大きいと考えられる。しかし、本法は、MTT が生細胞のミトコンドリア内膜中に存在する呼吸鎖に関与する酵素により開裂され、MTT formazan が生成されること¹⁻³⁾を用いているため、生細胞すべてと反応することになる。よって、バックグラウンド値が高くなりやすく⁴⁾、精度や特異性でやや劣る感じがある。

今回、われわれは、MTT 法によるリンパ球増殖反応系において、常法に若干の改良を加えたあと、免疫作用薬の効果を評価することにより本法の有用性を検討した。

mizoribine (MZR)

levamisole (LMS)

TOK-8801

図 1 Chemical structure of mizoribine, levamisole and TOK-8801

材料と方法

(1) 使用動物

7 週齢の BALB/c 系雌性マウスを日本チャールスリバーより購入し、1 週間の予備飼育後、実験に使用した。

(2) 薬物

実験には、ミゾリビン (MZR, 旭化成工業), レバミゾール (LMS, Sigma), および TOK-8801 (旭化成工業)を用いた(図 1)。MZR と LMS は蒸留水で溶解後、TOK-8801 は等モル塩酸にて溶解後、リン酸緩衝液 (PBS, pH 7.2) でそれぞれ所定の濃度に希釈した。その他、ウシ胎児血清 (FCS, GIBCO), RPMI-1640 培地 (ニッスイ), concanavalin A (Con A, Sigma), lipopolysaccharide (LPS, 岩井化学) および MTT-細胞増殖測定キット (フナコシ) を用いた。

なお、マイトージュンの希釈にも PBS を用いた。

(3) 実験方法

マウスをエーテルにて致死せしめたあと、無菌的に脾臓を摘出し、ステンレスメッシュを用いて

^{*1)} Division of Rheumatology, Department of Medicine, Juntendo University School of Medicine
順天堂大学医学部膠原病内科学教室

^{*2)} Laboratory for Pharmacological Research, Institute For Life Science Research, Asahi Chemical Industry Co., LTD. 旭化成工業株式会社ライフサイエンス総合研究所薬理研究所

図 2

Studies on added splenocyte number and mitogen concentration in MTT assay

Each column shows mean of 2 experiments.

図 3

Studies on incubation time in MTT assay

Each column shows mean of 2 experiments.

図 4

Studies on MTT reaction time

Each column shows mean of 2 experiments.

単一脾細胞に分離した。10% FCS-RPMI-1640 培地にて脾細胞を所定数に調製して、96穴平底マイクロテストプレート(ファルコン3072)に100 μl ずつ分注した。その後、Tリンパ球マイトージェンとして Con A, Bリンパ球マイトージェンとして LPS を所定の濃度となるようにそれぞれ10 μl 添加し、各薬液も10 μl 添加して、37°C 5% CO₂ 存在下で一定時間培養した。

さらに、MTT(5 mg/ml)を、10 μl 添加して一定時間培養後、培養終了時に塩酸-イソプロパノールを150 μl 添加して混和し、MTT-formazan を完全に溶解させたあと、EIAリーダー(MCC/340, 大日本製薬)を用いて主波長540 nm, 副波長690 nmにて吸光度を測定した。

(4) 実験データの統計処理

実験データの有意差検定には、Dunnettの多重比較を用い、有意差確率1%と5%で両側検定した。

結 果

(1) 実験条件の検討

MTT法での実験条件を定めるために、添加脾細胞数、マイトージェンの至適濃度、培養時間、およびMTT添加後の反応時間について検討した。その結果、図2に示すごとく添加脾細胞数が 5×10^4 /ウエル および 1×10^5 /ウエルでは、OD値が低く増殖反応は不充分であり、逆に 5×10^5 /ウエルではバックグラウンドが高いことより、添

図5 Effect of immuno-suppressant and modulators on mitogen-induced proliferative response in MTT assay

Each column shows mean $\pm$ SD of 8 experiments.

** $P < 0.01$ compared to the control group.

加脾細胞数は 2×10^5 /ウェルが最適であった。マイトージェン濃度は、Con A, LPS ともに sub-maximal 濃度をこの系における至適濃度とみなすと、その濃度はそれぞれ Con A が $2 \mu\text{g/ml}$, LPS が $20 \mu\text{g/ml}$ であった。なお、このときの培養時間は 72 時間、MTT 反応時間は 6 時間で行

った。

つぎに、培養時間および MTT 反応時間について検討した。図 3 に示すごとく、培養時間が 48 時間ではバックグラウンドが高く、増殖反応の明らかな低下を示す場合もあるため、培養時間を 72 時間と定め MTT 反応時間を 3 および 6 時間で比較(図 4)してみると、3 時間では反応時間が不十分であり、6 時間のほうが適していた。

以上より、MTT 法でリンパ球幼若化反応を検討する最適条件は、添加脾細胞数が 2×10^5 /ウェル、マイトージェンとして Con A が $2 \mu\text{g/ml}$, LPS が $20 \mu\text{g/ml}$, 培養時間が 72 時間および MTT 反応時間が 6 時間であった。

(2) MTT 法を用いたリンパ球幼若化反応に対する各種薬物の効果

MZR, LMS, および TOK-8801 のマイトージェン誘発リンパ球幼若化反応に対する効果を、前述の最適条件下で検討した。MZR は、図 5a に示すごとく、Con A 応答に対しては 10^{-6} M 以上で、LPS 応答に対しては 10^{-5} M 以上でそれぞれ用量依存的な有意な抑制を示した。図 5b には、LMS の検討結果を示したが、LMS は 10^{-4} M においてのみ Con A および LPS 応答を有意に促進させた。

一方、TOK-8801 は、図 5c に示すごとく、 10^{-6} ~ 10^{-5} M で Con A および LPS 応答を有意に促進させ、 10^{-4} M では、マイトージェン応答に対しては抑制傾向を示した。なお、マイトージェン非刺激下において、TOK-8801 は 10^{-4} M で、MZR は 10^{-5} M 以上でそれぞれ生細胞の減少を示した(図 5a, c)。

考 察

細胞増殖能の評価には ^3H -サイミジン法が繁用されているが、最近では MTT 法も一部用いられている。今回、MTT 法の有用性の一つとして、リンパ球幼若化反応に対する免疫作用薬の評価を試みた。

MTT 法は、最終的に吸光度で測定するので、薬効評価のためには、薬物による反応促進作用も評価できる程度にマイトージェン反応による吸光度を抑え、かつ、ブランクとの差を十分に保たなければならない。そこで、この最適実験条件を求めたあと、免疫抑制剤として mizoribine, 免疫調

節作用を有する薬物として levamisole, および TOK-8801 の効果を評価した. MTT 法において, MZR は Con A 応答に対しては 10^{-6}M 以上, LPS 応答に対しては 10^{-5}M 以上で抑制作用を示した. ^3H -サイミジン法での本剤の Con A 応答に対する IC_{50} は約 10^{-6}M であること(未発表:旭化成工業, 伊東らの成績)より, MTT 法による免疫抑制剤の感度も ^3H -サイミジン法に劣るものではないと考えられる.

一方, LMS が両マイトーゲン応答に対して促進作用を示す濃度は 10^{-4}M と高濃度を要した. また, TOK-8801 は $10^{-6}\sim 10^{-5}\text{M}$ で Con A 応答, LPS 応答に対してともに促進作用を示し, 10^{-4}M では逆に Con A 応答に対して抑制傾向を示した. TOK-8801 の 10^{-4}M ではマイトーゲン非刺激下でも生細胞数減少が認められたことより, この濃度では TOK-8801 がリンパ球に対して細胞障害作用を示すことも考えられる. LMS および TOK-8801 の ^3H -サイミジン法での成績⁴⁾では, 両マイトーゲン応答に対して LMS は 10^{-4}M でのみ促進作用を示し, TOK-8801 は $10^{-6}\sim 10^{-5}\text{M}$ で明らかな促進作用を, 10^{-4}M で抑制作用を示している. この成績は今回の MTT 法による成績と一致するもの

である.

以上, MTT 法を用いることにより, ^3H -サイミジン法と比較しても遜色なく, 免疫作用薬のリンパ球幼若化反応に対する効果を評価できることが判明した. 今後, 簡便な MTT 法は, 免疫作用薬のスクリーニングや薬効評価においてますます有用性が高まるであろう.

文 献

- 1) Slater, T.F., Sawyer, B., Strauli, U.: Studies on succinate-tetrazolium reductase systems III. Points of coupling of form different tetrazolium salts. *Biochim. Biophys. Acta* 77: 383-393, 1963.
- 2) Mosmann, T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65: 55-63, 1983.
- 3) 菅原 勇, 石坂重昭, 辻井 正, 西山利正: MTT アッセイ—細胞増殖能および細胞障害試験に応用可能な迅速比色定量法—. *医学のあゆみ* 128(11): 733-735, 1984.
- 4) Fujiwara, M., Shibata, K., Takayanagi, N., Matsunari, K., Yamamoto, I.: Immunomodulatory activity of the newly synthesized compound TOK-8801 [N-(2-Phenylethyl)-3, 6, 6-Trimethyl-5, 6-Dihydroimidazo[2, 1-b] thiazole-2-Carboxamide]. *Japan. J. Pharmacol.* 51: 549-554, 1989.