タンパク定量法による培養細胞増殖率測定法の検討

東 泉・大 住 伴 子・黒 木 賀代子

九州歯科大学歯科薬理学講座 (主任: 黒木賀代子教授)

平成4年2月26日受理

An Evalution of Measurement of Cell Growth in Tissue Culture with Protein Quantitation

Sen Higashi, Tomoko Ohsumi and Kayoko Kuroki

Department of Dental Pharmacology (Chief: Prof. Kayoko Kuroki)

Kyushu Dental College, Kitakyushu, Japan

Two protein quantitation methods for measurement of cell growth in tissue culture were examined on their utility by using L 929 cell line. One was a modified Lowry method using a phenol reagent, and the other was the Dye binding assay method described by Bradford. The range of cell protein measurement was found to be enough to use and a little wider by the modified Lowry method than by the Dye binding assay method; $5 \sim 100 \mu\text{g}$ by the former and $5 \sim 60 \mu\text{g}$ by the latter. The calculated factor to convert bovine serum albumin standard equivalent (μg) to cell count was 2.0×10^3 cells by the modified Lowry method, and 2.8×10^3 cells by the Dye binding assay method. Furthermore, those two methods were compared with other two methods to which protein quantitation technique was not applied; one was nucleus counting through a microscope, and the other was a kind of colorimetric determination of the stained cell layer with Monocellater. Both of the protein quantitation methods were confirmed to give much less amount of scatter in measured values than nucleus counting or than the method with Monocellater.

Key words : Protein quantitation / Lowry method / Dye binding assay method / L 929

緒 言

化学物質がヒトに及ぼす影響を調べるための毒性試験法のなかで、最も一般的なのは動物実験である。しかし、実験の精度や再現性あるいはコストの問題、さらに最近では動物愛護の問題などからも、培養細胞を用いた毒性検索の簡易スクリーニング法が評価されている。当教室では、様々な歯科薬剤、歯科材料の細胞毒性を検討するため、培養細胞を用いて、その形態、増殖率に与える影響を調べてきた¹⁻³⁾。増殖率の測定には、従来、核計数法とモノセレーター法を用いてきたが、今回、より簡

易な測定方法として、培養細胞のタンパク質を定量する方法について評価を試みた。タンパク定量法としては、生体成分のタンパク定量に最も汎用されている Lowry 法⁴⁾を培養細胞に適用した Oyama ら (1956)⁵⁾ の方法 (以下 modified Lowry 法と略記) と、Coomasie Brilliant Blue G 250 が酸性 pH の条件下タンパク質と複合体を形成し色調が変化する性質を利用した方法 (以下色素結合法と略記)⁶⁾ を用いた。本研究では、まず、予備実験として供試細胞の培養時間と細胞タンパク質量の関係を観察し、色素結合法については発色試薬に与える強塩基の影響を観察した。続いて、これら2種類のタ

ンパク定量法における定量可能なタンパク質量の範囲およびタンパク質量と細胞数の関係をそれぞれ求めて比較検討した。また、これらのタンパク定量法を用いた場合と、核計数法およびモノセレーター法による増殖率測定法との比較も行った。

実験方法

I. 実験材料

A. 細胞および培養条件

細胞はマウスの正常皮下結合組織由来の L 929 株細胞 (NCTC Clone 929, 大日本製薬) を使用し、継代後 24 ~ 48 時間に実験を行った。同調培養の処置は行わなかった。培養液は Eagle 最少培地 (Nissui MEM-1, 日水製薬) に L-グルタミン (和光純薬) ならびに仔牛血清 (和光純薬) を 3% 添加し、 NaHCO_3 で pH を調整したものを用いた。インキュベーターは 5% CO_2 , 湿度 100% に調整した。

B. 試薬

1. 0.1 N NaOH - 2% Na_2CO_3

2. 1% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

3. 2% NaK tartrate

2, 3 を混和後, 1 を加えて 1 : 2 : 3 が 100 : 1 : 1 の割合となるように用時調製しアルカリ銅試薬とした。

4. Phenol (Folin-Ciocalteu) 試薬 (和光純薬)

1 N に希釈して用いた。

5. 発色試薬; Coomassie Brilliant Blue G 250 - methanol - 磷酸溶液 (以下 CBB と略記) (Bio Rad)

6. 標準タンパク質; Bovine serum albumin (以下 BSA と略記) (Sigma)

II. 実験方法

A. タンパク定量法

1. 試料の調製

検量線の作成には、培養チューブ (先細スピッツ, 10 ml, 岩城硝子) にトリプシン処理後の細胞浮遊液 ($1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^5$ 個/ml) より希釈系列を調製し、仔牛血清を含まない培養液を加え、全量を 2 ml とした。これを 800 ~ 1000 rpm で、3 分間遠心分離を行い上清を除去し phosphate buffered saline (以下 PBS と略記) で 2 回洗浄した。得られた細胞をよく乾燥させ、このタンパク質量を定量した。

培養時間と細胞あたりのタンパク質量の関係を観察する予備実験、およびタンパク定量法とそれ以外の増殖率測定法である核計数法、モノセレーター法との比較を行

Fig. 1 Modified Lowry method for protein quantitation.

Fig. 2 Dye binding assay method for protein quantitation.

Fig. 3 The method of counting cell nuclei (A) and Monocellater method (B).

う実験においては、培養皿（プラスチック製、直径 35 mm, Falcon）に 5×10^4 個/ml の細胞を植え込み、24 時間あるいは 72 時間培養して得られた細胞層を 37°C PBS にて洗浄し伏せて乾燥させ、このタンパク質量を定量した。

標準タンパク質溶液は、まず BSA を 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるよう 0.1 M NaOH に溶解し、これを適宜希釈して用いた。

2. Modified Lowry 法

Oyama らの方法に従い十分乾燥した細胞に、用時調製したアルカリ銅試薬を加え、細胞を完全に溶解するためピペティングし均一のタンパク質溶液とした。これより一定量を採り水で適宜濃度を調製し、全量を 2.5 ml とした。次に、phenol 試薬を 0.5 ml 加え攪はんし 30 分間室温放置後、分光光度計（Bausch & Lomb, 島津）で 660 nm の吸光度を測定した（Fig. 1）。

3. 色素結合法

2. と同様に乾燥した培養細胞に細胞溶解のため NaOH 溶液を加え、タンパク質溶液とした。これより一定量を採り希釈した発色試薬を添加し緩やかに攪はん後、発色の安定な 5 ～ 60 分の間に 595 nm の吸光度を測定した（Fig. 2）。なお、発色試薬に与える強塩基の影響について調べる予備実験を行い、細胞溶解に用いる NaOH の濃度を決定した。即ち、タンパク質量 0, 25, 50 μg の BSA を含む試料中に最終濃度が 0, 3, 6, 30,

90 mM となるよう NaOH を添加し、その吸光度を測定した。

B. タンパク定量法以外の増殖率測定法

1. 核計数法⁷⁾

細胞層に 0.1 M クエン酸 - 0.1% クリスタル紫溶液 3.5 ml を加え、37°C で 1 時間インキュベーションし、1500 rpm で 15 分間遠心分離を行った。上清 3 ml を除去し、残りの液を均一に分散させ細胞核浮遊液とした。Burker-Turk 型血球計算板を用いて鏡検下に核数を算定した（Fig. 3 (A)）。

2. モノセレーター法

細胞層をメタノールで 5 分間固定し、PBS で洗浄した。次に 0.1% クリスタル紫溶液を 1 ml 加え 15 分間染色した。再度 PBS で洗浄し、風乾したものをモノセレーター（オリンパス光学工業）で測定した（Fig. 3 (B)）。

結 果

I. 供試細胞の培養時間と細胞タンパク質量の関係

培養 24 時間と 72 時間では、位相差像において細胞密度は明らかに後者が高く、ほぼ全面に cell sheet を形成した状態になっていた。しかしながら、modified Lowry 法で細胞 1 個あたりのタンパク質量を求めた結果、大差はなく、いずれも約 $4 \times 10^{-4} \mu\text{g}$ であった（Table 1）。

Table 1 The ratio of the protein content by modified Lowry method to cell count

		Time after planting	
		24hr	72hr
Protein	(P)	38.6 $\pm$ 0.8	66.2 $\pm$ 1.9
Cell count	(Cc)	1.0 $\times 10^5$	1.6 $\times 10^5$
P/Cc		3.86 $\times 10^{-4}$	4.13 $\times 10^{-4}$

P ; mean (μ g) $\pm$ S.D. (n = 4)

Fig. 4 Effect of increasing concentrations of alkaline on Dye binding assay method.

II. 色素結合法における強塩基の影響

試料中に含まれる NaOH の濃度を 0 ~ 90 mM の範囲で変化させて発色への影響を観察した結果を Fig. 4 に示した。BSA の量にかかわらず吸光度は NaOH の濃度とともに上昇したが、検量線はいずれも直線性を維持し定量性は保たれていた。

III. タンパク質量の定量可能域

Fig. 1 および 2 に示した測定条件で BSA の検量線を作成した結果、modified Lowry 法では 5 ~ 100 μ g の範囲で定量性が認められた。

一方、色素結合法では 5 ~ 60 μ g の範囲では定量性が認められるが、60 μ g 以上では発色感度が著しく低下した (Fig. 5)。

IV. 細胞数とタンパク質量との関係

Fig. 6 および 7 に BSA より換算したタンパク質量と細胞数との関係を示した。これより modified Lowry 法では 2.0×10^3 個/ μ g、色素結合法では 2.8×10^3 個/ μ g であった。即ち、modified Lowry 法より色素結合法による方が、1 μ g あたりの細胞数がやや多く見積ら

Fig. 5 Correlation between the amount of BSA and absorbance at 595 nm measured by Dye binding assay method.

Fig. 6 Correlation between cell count and protein content measured by modified Lowry method.

Fig. 7 Correlation between cell count and protein content measured by Dye binding assay method.

Table 2 Comparison of four different methods for measurement of cell growth

	S.D. $\times 100 / \text{mean}$ (%)	Cell count ($\times 10^4 / \text{dish}$)
Monocellater method	10.3	
Cell nuclei counting	17.9	8.4
Modified Lowry method	5.4	16.6
Dye binding assay method	2.9	15.9

Replanted cells ($1 \times 10^5 / \text{dish}$) were cultivated for 24 hours ($n = 5$).

れる結果となった。

V. 核計数法およびモノセレーター法との比較

2種類のタンパク定量法と核計数法およびモノセレーター法との比較を行うために、一定量の細胞に対して、各定量方法を実施し、得られた測定結果を比較した。測定値のばらつきは核計数法が最も大きく、ついでモノセレーター法が大きかった。Modified Lowry法は色素結合法よりも測定値のばらつきがやや大きい、両者とも核計数法やモノセレーター法に比較すれば、その値は著しく小さかった。核計数法ではタンパク定量法により算出した細胞数の約50%の細胞数となった (Table 2)。

考 察

当教室ではこれまで薬物の細胞毒性を比較するために様々な方法で細胞増殖率に与える影響を調べてきた。細胞増殖率の測定は様々な方法で行われるが、今回は細胞数をタンパク質量として定量する方法をL929株細胞において検討した。

細胞1個あたりのタンパク質量はその細胞がどの分裂サイクルにあるか等により異なる⁷⁾が、本実験のように同調培養を行わず細胞集団としてみる場合、培養密度や時間による大きな変化はみられなかった。従って、化学物質の簡易毒性試験法⁸⁾などの細胞毒性実験に設定されているような一般的な培養細胞条件下では、細胞あたりのタンパク質量の変動は少ないものと考えられる。

今回検討した一般的な2種類のタンパク定量法では、modified Lowry法で5～100 μg 、色素結合法では5～60 μg の範囲で測定が可能であり、これによって、Fig. 6, 7に示した検量線を導くことができた。即ち、いずれの方法も培養細胞のタンパク定量には適した方法であると考えられる。

Lowry法では、還元反応による呈色を利用している

ため、干渉物質としては還元物質や界面活性剤などがよく知られている。一方、色素結合法はLowry法に比べて干渉物質の影響が少なく、感度、迅速性の面でも優れているといわれている。しかし、CBBは特にDNAにより発色が阻害され、タンパク質量の高濃度領域では界面活性剤、また酸性側での色調変化を利用しているため、強塩基緩衝液でも干渉を受ける恐れがある⁹⁾。従って、これらの定量法を初めて用いる場合、あらかじめ試料中の試薬によってどの程度の発色変化が起こるかの検討が必要である。

今回、細胞溶解のために用いた強塩基緩衝液は、予備実験において 1×10^5 個の細胞に対しては10 mMのNaOHで十分であることが判明した。従って、0.1 MのNaOHであれば十分であり、試料中の最終濃度は30 mM以下であると考えられる。また、CBBの使用説明書には、NaOH濃度が0.1 M以上になるとタンパク質の高濃度領域でCBBの発色を強く妨害すると記されている。このため、最終濃度が0～90 mMとなるようなNaOHの範囲で発色性を調べた。結果は、Fig. 4に示したように吸光度は全体的にシフトし、NaOH濃度に依存して高くなるものの、定量性には影響しなかった。即ち、色素結合法で細胞溶解のために用いるNaOHは0.27 M (最終濃度90 mM) 以下であれば発色性の低下はないことを確認した。

2種類のタンパク定量法から換算した1 μg あたりの細胞数はmodified Lowry法で 2.0×10^3 個、色素結合法で 2.8×10^3 個となり、色素結合法の方が幾分多くなっている。この原因は発色試薬であるCBBの感度が標準タンパク質であるBSAに対して特異的に高いことが原因であると思われる。

さらにこれらの2種類のタンパク定量法と、核計数法およびモノセレーター法とを比較した結果、次のことが明らかになった。核計数法は、細胞の培養皿からの回収

率,あるいは細胞浮遊液の拡散状態などの操作段階での誤差が大きい。一方,モノセレーターを用いる方法では培養皿底面に固定染色された細胞の分布が均一である場合には最も簡単な操作で測定できる。ただし,この方法も付着細胞の分散状態など測定までの操作技術が結果に影響してくる。これに対し,今回検討したタンパク定量法は干渉物質の影響の問題はあるものの,この点での誤差は著しく少なかった。

結 論

タンパク定量を応用した培養細胞増殖率測定法として,modified Lowry 法と色素結合法という2種類の方法に着目し,その有用性をL 929 株細胞を用いて検討したところ,細胞タンパク質の測定範囲は,modified Lowry 法では5~100 μg ,色素結合法では5~60 μg であり,前者の方がやや広がったが,いずれも増殖率測定に適用可能な範囲であった。また,標準BSA量として得られるタンパク質定量値を細胞数に置き換えるとタンパク質1 μg はmodified Lowry 法で 2.0×10^3 個,色素結合法で 2.8×10^3 個の細胞数に相当することがわかった。さらに,これら2種類の方法はタンパク定量法以外の増殖率測定法である核計数法あるいはモノセレーター法のいずれに比較しても,測定値のばらつきが著しく少なかった。

引用文献

- 1) 黒木賀代子,大住伴子:培養L細胞に対するクレゾールとホルマリンの増殖抑制作用.九州歯会誌 39:481-491,1985.
- 2) 黒木賀代子,大住伴子:ホルムアルデヒドとグルタルアルデヒドによる培養L細胞の形態変化.九州歯会誌 39:663-671,1985.
- 3) 黒木賀代子,大住伴子,村上雄次:Glutaraldehydeの培養細胞に対する作用.日薬理誌 88:65-70,1986.
- 4) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.:Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265-275,1951.
- 5) Oyama, V. I. and Eagle, H.:Measurement of cell growth in tissue culture with a phenol reagent (Folin-Ciocalteu). Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 91:305-307,1956.
- 6) Bradford, M. M.:A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72:248-254,1976.
- 7) 黒田行昭:動物組織培養法.共立出版,東京,1974,136-137,246-254.
- 8) 日本組織培養学会編:組織培養の技術 第二版.朝倉書店,東京,1990,256-259.
- 9) Sedmak, J. and Grossberg, S. E.:A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using CBB G 250. Anal. Biochem. 79:544-552,1977.