

## 細胞内 ATP 測定への化学発光イメージング解析の応用

## Application of chemiluminescence imaging analysis for measurement of intracellular ATP

倉若 美咲樹<sup>1)</sup>

Misaki KURAWAKA

館花 春佳<sup>1, 2)</sup>

Haruka TATEHANA

志村 二三夫<sup>1)</sup>

Fumio SHIMURA

山崎 優子<sup>\*3)</sup>

Yuko YAMAZAKI

## 要旨

アデノシン三リン酸 (ATP) は生体におけるエネルギーの獲得および利用に重要な役割を果たしている。ATPの測定にはルシフェリン-ルシフェラーゼ反応を用いた生物発光による方法が良く知られているが、この方法でATPを定量するためには発光量を測定できる非常に高額で特殊なルミノメーターが必要である。本研究では、本学が保有し、汎用性が高く、タンパク質の検出等によく用いられているケミルミネッセンス撮影装置と画像解析ソフトを併用することによりATPの定量が可能であるか、検量線の直線性と検出限界を検討した。さらに、実際の培養肝細胞HepG2を用いて、細胞数の違いや培養液中の栄養状態、気相中の酸素濃度を0.1%以下にした際の細胞内ATP含有量の変化を本手法により測定した。その結果、ATP標準液を用いた場合は露光時間や測定範囲の調節により測定が可能になることが明らかとなった。10 μM以下のATP標準液も測定可能であることから、96-wellプレートスケールで培養細胞を用いた実験にも適用可能な手法であることが示された。また、実際の培養肝細胞HepG2を用いてATPの測定を行った結果、培養液へのグルコース非添加(24時間培養)あるいは気相の酸素濃度を0.1%以下にすること(1時間培養)により細胞内ATP量の減少が認められた。本法はルミノメーター機能の代用となる手法として用いることが可能であると結論された。

<sup>1)</sup> 十文字学園女子大学大学院 人間生活学研究科食物栄養学専攻  
Department of Food and Nutritional Sciences, Graduate School of Human Life Sciences, Jumonji University graduate school

<sup>2)</sup> 現所属：青森県立保健大学健康科学部栄養学科  
Department of Nutrition, Faculty of Health Sciences, Aomori University of Health and Welfare

<sup>3)</sup> 人間生活学部食物栄養学科  
Department of Food and Nutrition, Faculty of Human Life, Jumonji University

\* 投稿責任者

キーワード：ATP, ケミルミネッセンス, 画像解析, ルシフェリン-ルシフェラーゼ反応, 培養肝細胞

## 緒言

ATPはアデノシンのリボースの5'位のヒドロキシル基にリン酸が3分子連続して結合したヌクレオチドである。1分子中に高エネルギーリン酸結合を2個含み、生体におけるエネルギーの獲得および利用に重要な役割を果たしている<sup>1)</sup>。ATPを含む高エネルギーリン酸化合物はそのはたらきから「エネルギーの通貨 (energy currency)」とも呼ばれている。

ATPの測定方法は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を利用した方法<sup>2)</sup> やグリセロールのリン酸化を利用した比色もしくは蛍光法<sup>3, 4)</sup> などがあるが、その中でもルシフェリン-ルシフェラーゼ反応を用いた生物発光による測定法が広く用いられている<sup>5, 6, 7)</sup>。

ルシフェラーゼとはホタルなどが行う生物発光において、発光性物質であるルシフェリンの酸化反応を触媒する発光性酵素の総称である。ルシフェラーゼやルシフェリンは発光生物の種類ごとに特有の構造をしており、生物種の名前をとってホタルルシフェラーゼ、ホタルルシフェリンのように呼ばれることが多い。ホタルの場合、ルシフェリンはATP、酸素、 $Mg^{2+}$ イオン存在下でルシフェラーゼと反応し、2段階の反応を経て励起状態のオキシルシフェリンを生成する。これが基底状態へ移動する際に差分のエネルギーが可視光として放出される<sup>8)</sup>。この発光量はATP量に比例するため、発光量を測定することによりサンプル中のATP量を求めることができる。ルシフェリン-ルシフェラーゼ反応機構はFig. 1に示す。また、このルシフェリン-ルシフェラーゼ法は迅

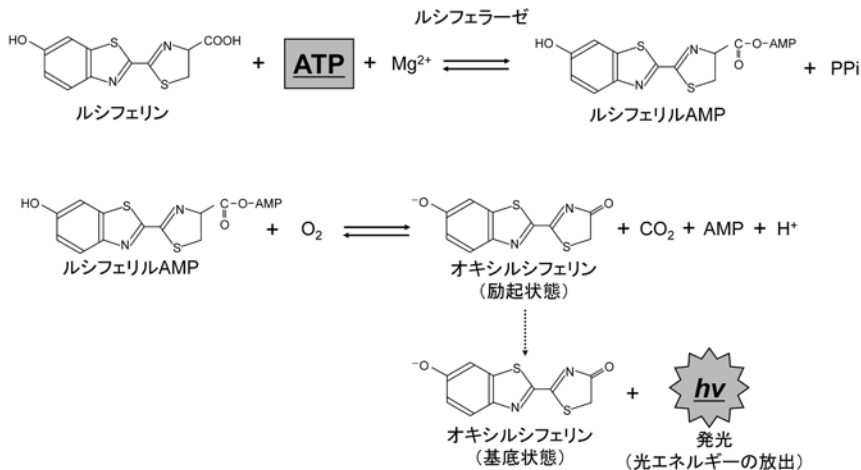


Fig. 1. ルシフェリン-ルシフェラーゼ反応 (ホタルの場合) による化学発光 (ケミルミネッセンス) とATP測定への利用。

ルシフェリン-ルシフェラーゼ反応は2段階で進む。ルシフェリンはATP、酸素、 $Mg^{2+}$ イオン存在下でルシフェラーゼと反応し、酵素分子中で生成したルシフェリルAMPが酸素分子と反応して励起状態のオキシルシフェリンを生成する。これが基底状態へ移動する際に差分のエネルギーが可視光として放出される<sup>8)</sup>。発光強度がATP濃度に依存するよう基質、酵素、補因子の濃度を十分量に設定することで、この反応系をATP濃度測定に応用できる。 $h$ : プランク定数。  $v$ : 光子の振動数。  $v = c/\lambda$  であり、 $c$ は光速、 $\lambda$ は波長を示す。ルシフェリン-ルシフェラーゼ系で生じる光の波長は生物種やルシフェラーゼの構造により異なるが、ホタルの場合、560 nm付近の波長の可視光が放出される。

速かつ簡便であることから、食品製造工場などの機械・器具類に付着している細菌などの汚染物質を検出する方法として厚生労働省監修の「食品衛生検査指針微生物編2004」にも掲載されており、簡易測定キットも販売されている<sup>9)</sup>。

ルシフェリン-ルシフェラーゼ反応を用いてATP量を実際に定量する際は発光量を計測できる特殊なルミノメーターが必要となるが、マイクロプレートも測定できる機種となると非常に高額であり、用途も限られる。本研究では、本学が保有する汎用性の高い装置であり、ウエスタンブロットティングによるタンパク質発現の検出等で広く用いられるケミルミネッセンス撮影装置と画像解析ソフトを併用することによりATPの定量が可能であるか検討することを目的とした。さらに、実際に培養細胞内のATP含有量の測定に耐えうる手法であるか併せて検討した。その方法と実際を報告する。

## 実験材料ならびに方法

### 1. 細胞培養

ヒト肝癌由来細胞株HepG2は理研BRC（茨城）から購入した。細胞培養に必要なDulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)、ウシ胎児血清 (FBS)、Penicillin Streptomycin、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) はいずれも Thermo Fisher Scientific (MA) から購入した。

HepG2はCO<sub>2</sub>インキュベーター内（二酸化炭素5%、湿度95%、温度37℃）で、培養用DMEM（10% FBS, Penicillin Streptomycin, フェノールレッド含有）中で培養した。1日もしくは2日おきに培養用DMEMを交換し、対数増殖期に継代を行った。実際に細胞実験を行う際は、血清などの影響を取り除くため実験用DMEM（FBS, Penicillin Streptomycin, フェノールレッド非含有）を用いて行った。実験用DMEMにグルコースを添加する際は、文献10を参考に11 mMとした。

### 2. HepG2の低酸素培養

気相の酸素濃度が0.1%以下の環境で細胞を培養するため、アネロパック<sup>®</sup>・ケンキ5%（三菱ガス化学株式会社、東京）を使用した。アネロパック<sup>®</sup>・ケンキ5%は気相の酸素濃度を0.1%以下にすると同時に二酸化炭素濃度を5%に維持する試薬である。アネロパック専用角型ジャーに細胞を播種した96-wellプレートを1枚、アネロパック<sup>®</sup>・ケンキ5%を1袋、気相の酸素濃度を確認するために嫌気指示薬（三菱ガス化学株式会社、東京）を1錠、気相の湿度を維持するために蒸留水を染み込ませたろ紙をセットして密封し、37℃で培養した。角型ジャー内の酸素濃度が0.1%以下となったことを嫌気指示薬で確認し、その時点まで培養開始時刻とした。

### 3. ATPの測定

#### 1) ATP標準液の調製

ATP標準液は動物培養細胞用ATP標準試薬（東洋ビーネット株式会社、東京）を参考にして調製した。アデノシン5'-三リン酸二ナトリウム水和物を最終濃度が10 mMとなるように10 mM HEPES緩衝液（pH 7.75）に加えた。0.6 mL容量チューブに100 μLずつ分注し、使用するまで-80℃で保存した。ATPの安定性の観点から凍結融解は5回までとした。

#### 2) ATPの測定

ATP濃度はルシフェリン-ルシフェラーゼ法に基づく『細胞の』ATP測定試薬<sup>TM</sup>（東洋ビーネット株式会社、東京）を用いて測定した。操作は付属の説明書に準じて行った。測定には黒色96-wellプレート（Thermo Fisher Scientific, MA）を使用し、操作は試薬の説明書に準じて行った。

ATP発光試薬をサンプルと同量加えて1分間マイクロプレートミキサーで混和させ、その後23℃で10分間インキュベーションした。インキュベーション後、96-wellプレートをケミルミネッセンス撮影装置であるCool saver AE-6955（アトー株式会社、東京）にセットし、露光時間を調

節しながら画像を撮影した。発光強度はImage J (National Institutes of Health, MD) を用いる画像解析により数値化した<sup>11)</sup>。発光強度をヒストグラム化し、数値化できるGelモードを使用した。ATP標準液を用いて検量線を作成し、ATPを定量した。各サンプルの測定は下記の通り行った。

### 3) ATP標準液の測定

10 mM ATP標準液をPBSで任意の濃度に希釈した。その後、黒色の96-wellフラットボトムプレートに希釈したATP標準液を100  $\mu$ Lずつ添加した。ATP発光液添加以降の操作は2)と同様に行った。

### 4) 細胞懸濁液中のATPの測定

PBS中にHepG2を懸濁させ、 $0-10 \times 10^4$  cells/wellになるよう黒色の96-wellフラットボトムプレートに100  $\mu$ L添加した。ATP発光液添加以降の操作は2)と同様に行った。

### 5) 接着細胞中のATP濃度の測定

実験前日にHepG2細胞を $8.75 \times 10^4$  cells/wellの濃度で播種し、黒色の96-wellフラットボトムプレート底面に接着させた。翌日培養液を取り除き、すみやかにPBSで2回洗浄して接着細胞表面の培養液成分を取り除いた。その後PBSを100  $\mu$ L添加した。ATP発光液添加以降の操作は2)と同様に行った。

## 4. 統計処理

統計ソフトはIBM SPSS Statistics 20 (アイ・ビー・エム株式会社, 東京) を用いた。2変数間の関係の強さを分析するためにPearsonの積率相関係数を算出した。さらに、一方の変数がもう一方の変数をどの程度説明できるのか調べるために単回帰分析を行い、決定係数を算出した。平均値の差を検定するために2群間では対応のないt検定を、3群以上では一元配置分散分析後にTukey HSDによる多重比較を行った。

## 結果および考察

### 1. ATP濃度測定レンジの確認

最初にATPの測定レンジを確認するため、ATP標準液の濃度を $10^2$  M (10 mM) から $10^{10}$  M (100 pM) まで10倍ずつ変化させて実験を行った。黒色の96-wellフラットボトムプレートにATP標準液とATP発光試薬を反応させ、ケミルミネッセンス撮影装置で撮影した実際の画像をFig. 2に示す。30秒露光させたところ、 $10^2$  M (10 mM) から $10^5$  M (10  $\mu$ M) まで発光を感知することができた (Fig. 2A)。さらに露光時間を10分としたところ、 $10^7$  M (100 nM) まで感知することができた (Fig. 2B)。データには示していないが、10分以上露光させても $10^7$  M (100 nM) より

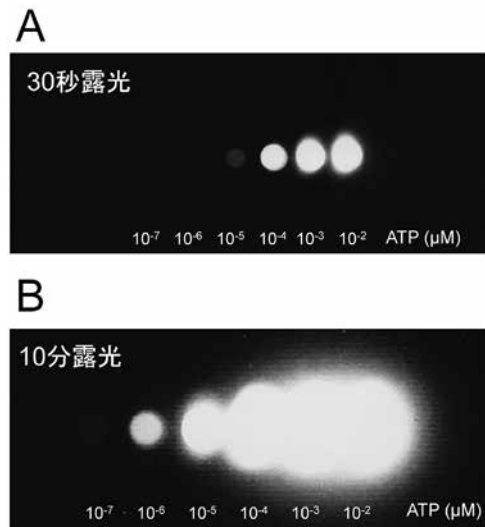


Fig. 2. ケミルミネッセンス撮影装置で撮影したルシフェリン-ルシフェラーゼ反応により生じた発光。

ATP標準液の濃度を $10^2$  M (10 mM) から $10^{10}$  M (100 pM) まで10倍ずつ変化させて黒色の96-wellフラットボトムプレートに100  $\mu$ Lずつ添加した。ATP発光試薬をサンプルと同量の100  $\mu$ Lずつ添加してケミルミネッセンス撮影装置で露光時間を調節しながら撮影した。A: 30秒露光させた画像。B: 10分露光させた画像。

低濃度では発光を感知することができなかった。『細胞の』ATP測定試薬™付属の説明書によると、ルミノメーターを使用すれば $10^{-10}$  M (100 pM)まで測定が可能である。本法はそれよりも感度が低いが、サンプルに合わせて露光時間を調節することにより、様々な濃度のATPの測定が可能となることが示唆された。

## 2. ATP 検量線の直線性の確認

ATP検量線の直線性を確認するため、ATP標準液の濃度を10  $\mu$ Mから100  $\mu$ Mまで10  $\mu$ M刻みとし、露光時間を10秒に設定して実験を行った。解析に使用した画像をFig. 3Aに示す。これらの発光スポット画像を画像解析ソフトImage Jを用いてヒストグラム化した(Fig. 3B)。それぞれのピーク面積値をグラフに示すと、80  $\mu$ M以上で過剰露光状態となり、0-100  $\mu$ M全体ではシグモイ

ド曲線となった(Fig. 3C)。そこで、この中の直線領域である10-70  $\mu$ Mまでの箇所を抜粋してグラフを作成した(Fig. 3D)。その結果、ATP濃度とピークの面積値間の相関係数は0.9975 ( $p < 0.001$ )で有意な正の相関が認められた。さらに決定係数 $R^2$ は0.9938 ( $p < 0.001$ )であった。

一方、培養細胞内に含まれているATP量は、ラット由来初代グリア細胞ではおよそ0.15 nmol/mg protein<sup>6</sup>、ヒト肝癌由来細胞HepG2ではおよそ10 nmol/mg protein<sup>4</sup>や5 nmol/mg protein<sup>6</sup>、マウス脂肪細胞由来3T3-L1ではおよそ30 nmol/mg protein<sup>3</sup>、ラット骨格筋細胞由来L6ではおよそ20 nmol/mg protein<sup>2</sup>と報告されている。培養条件、細胞の種類や数が異なるが、これらの値を本研究の実験系に当てはめて換算するとおよそ1-3  $\mu$ MのATP濃度に相当する。そこでさらに、ATP標準液の濃度を0, 0.5, 1, 1.5, 2, 5,

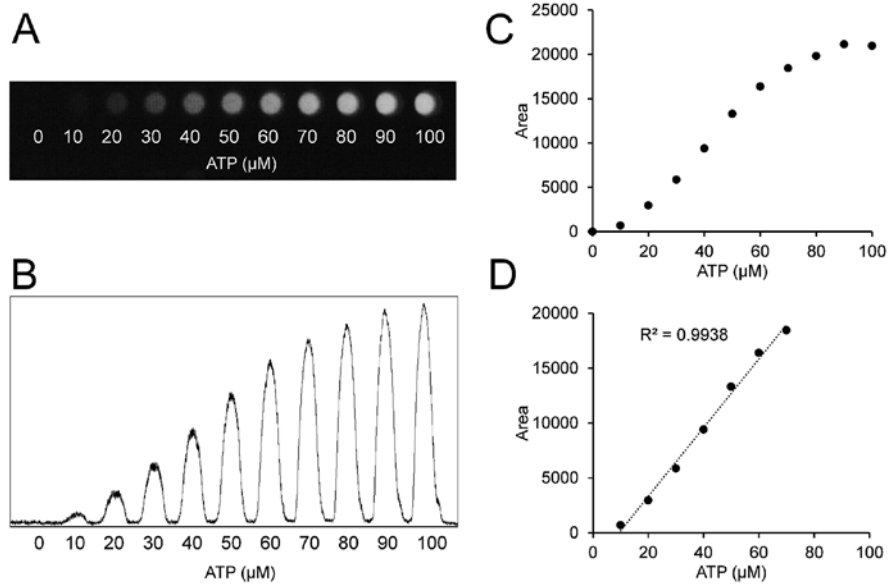


Fig. 3. 0-100  $\mu$ Lに調製したATP標準液の測定.

ATP標準液を0-100  $\mu$ Lで調製し、黒色の96-wellフラットボトムプレートに100  $\mu$ Lずつ添加した。ATP発光試薬をサンプルと同量の100  $\mu$ Lずつ添加してケミルミネッセンス撮影装置で撮影した。撮影した画像を用いて発光強度を測定した。A：撮影した実際の画像データ。B：発光強度をヒストグラムに変換した画像データ。C：0-100  $\mu$ M ATP標準液の発光強度の変化。D：10-70  $\mu$ M ATP標準液の発光強度と検量線。Pearsonの積率相関係数を算出したのち、単回帰分析により決定係数を算出した。

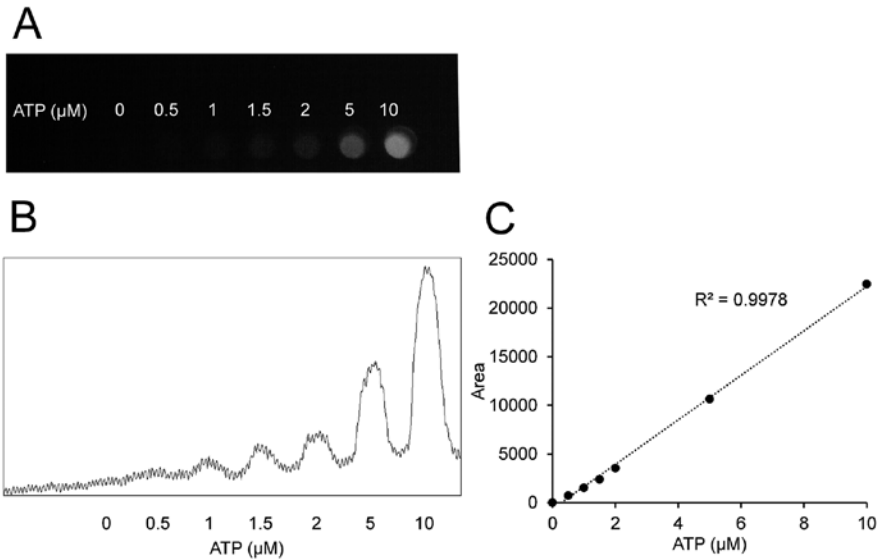


Fig. 4. 0-10  $\mu\text{M}$ に調製したATP標準液の検量線.

0-10  $\mu\text{M}$ に調製したATP標準液を黒色の96-wellフラットボトムプレートに100  $\mu\text{L}$ ずつ添加した。ATP発光試薬をサンプルと同量の100  $\mu\text{L}$ ずつ添加してケミルミネッセンス撮影装置で撮影した。撮影した画像を用いて発光強度を測定した。A：撮影した実際の画像データ。B：発光強度をヒストグラムに変換した画像データ。C：ATP濃度と発光強度の検量線。Pearsonの積率相関係数を算出したのち、単回帰分析により決定係数を算出した。

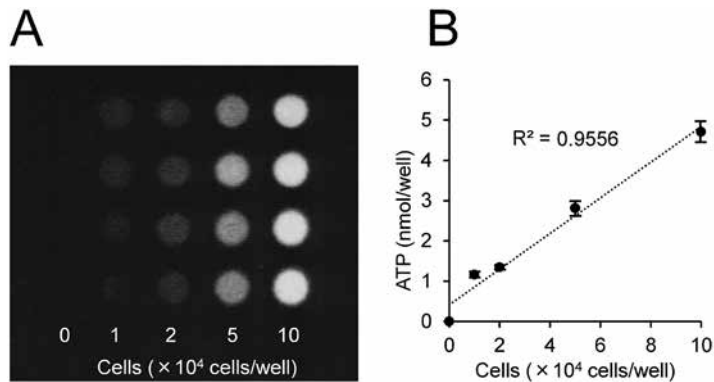


Fig. 5. 細胞数と細胞内ATP含有量の関係.

PBS中に培養肝細胞HepG2を懸濁させ、黒色の96-wellフラットボトムプレートに0-10 $\times 10^4$  cells/wellになるよう100  $\mu\text{L}$ ずつ添加した。ATP発光試薬をサンプルと同量の100  $\mu\text{L}$ ずつ添加してケミルミネッセンス撮影装置で撮影した。撮影した画像を用いて発光強度を測定した。A：撮影した実際の画像データ。B：細胞数によるATP含有量。値は平均値 $\pm$ 標準誤差 ( $n = 4$ )。Pearsonの積率相関係数を算出したのち、単回帰分析により決定係数を算出した。

10  $\mu$ Mとし、露光時間を1分に設定して実験を行った。解析に使用した画像をFig. 4Aに示す。これらの発光スポット画像を画像解析ソフトImage Jを用いてヒストグラム化した(Fig. 4B)。それぞれのピーク面積値をグラフに示した(Fig. 4C)。その結果、ATP濃度とピークの面積値間の相関係数は0.9989 ( $p < 0.001$ )で有意な正の相関が認められた。さらに決定係数 $R^2$ は0.9978 ( $p < 0.001$ )であった。

以上の結果より、本法はルミノメーターを使用した際の感度よりも低い、露光時間や測定範囲の調節により96-wellプレートスケールで培養細胞を用いた実験には適用可能な手法であることが示された。

### 3. 細胞懸濁液中の細胞数とATP量の関係

続いて実際の培養肝細胞HepG2を用いて実験を行った。ATP含有量と細胞数との相関は高く、培養細胞の細胞数や細胞活性の測定に利用されている<sup>12)</sup>。そこで、細胞数が $0.1 \times 10^4$  cells/wellになるように調製し、ATP濃度を測定した。実際に撮影した画像はFig. 5Aに示す。撮影した画像を目視したところ、細胞数に依存して発光が強くなるように見受けられた。次にFig. 5Aを画像解析し、得られた数値をグラフにした(Fig. 5B)。その結果、細胞数とATP濃度間の相関係数は0.9775 ( $p < 0.001$ )で有意な正の相関が認められた。さらに決定係数 $R^2$ は0.9556 ( $p < 0.001$ )であった。

### 4. 培養液中のグルコースおよび大気中の酸素が細胞内ATP量におよぼす影響

生体にとってグルコースは主要なエネルギー源である。肝臓において、グルコース1分子は解糖系で2分子、ピルビン酸に変換されたのちTCA回路を経て完全に酸化されれば合計38分子のATPを産生する<sup>1)</sup>。そこで本法により、培養液中のグルコースの有無が培養肝細胞内ATP含有量に与える影響を検出することが可能か検討する

ため、11 mMグルコース存在下・非存在下でHepG2を24時間培養し、細胞内のATP含有量を測定した。実際に撮影した画像はFig 6Aに示す。撮影した画像を目視したところ、グルコースが含まれている培養液で培養した細胞の発光が強く見受けられた。次にFig 6Aを画像解析し、得られた数値をグラフにした(Fig. 6B)。その結果、グルコースを含む培養液で培養した細胞で有意にATP含有量が増加した。

一方、Chengqianら<sup>13)</sup>によると、酸素濃度が2%の条件下でヒト骨肉腫由来細胞143B、ヒト子宮頸がん由来細胞HeLa、ヒト肝がん由来細胞

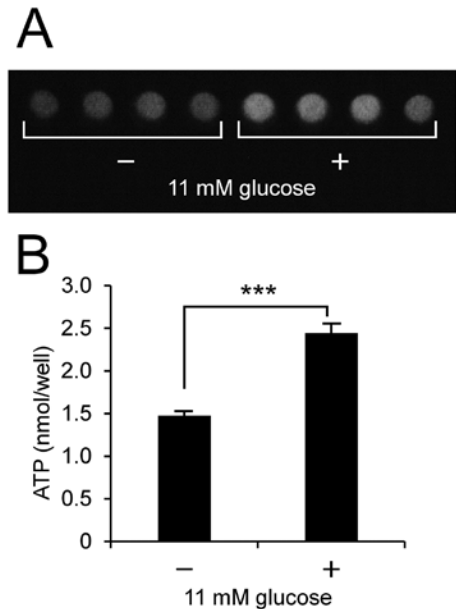


Fig. 6. 培養液中のグルコース存在下・非存在下における細胞内ATP含有量。

実験前日に培養肝細胞HepG2を黒色の96-wellフラットボトムプレートに $8.75 \times 10^4$  cells/wellになるよう播種した。翌日11 mMグルコースを含む実験用DMEMまたはグルコースを含まない実験用DMEMに変え、さらに24時間培養した。24時間培養後に細胞内に存在するATP含有量を測定した。A:撮影した実際の画像データ。B:培養液中のグルコースの有無による細胞内のATP含有量。値は平均値 $\pm$ 標準誤差 ( $n = 4$ )。対応のない $t$ 検定で平均値の差を検定した。\*\*\* $p < 0.001$ 。

Hep3B, ラット心臓横紋筋由来細胞 H9c2を24時間培養すると, 通常の大気中に含まれている酸素濃度 (21%) で培養した場合と比較して細胞内のATP含有量が有意に低下することを報告している. そこで本研究ではより結果が明確になるよう培養肝細胞 HepG2を酸素濃度0.1%以下の条件下で培養し, 細胞内のATP含有量を測定した. データとしては示していないが, 培養時間は気相の酸素濃度が0.1%以下であっても細胞の生存率には影響を与えない1時間とした. 実際に撮影した画像はFig. 7Aに示す. 撮影した画像を目視したところ, 酸素濃度0.1%以下でグルコースを含まない培養液で培養した細胞の発光が弱く見えた. 次にFig. 7Aを画像解析し, 得られた数値をグラフにした (Fig. 7B). その結果, 酸素濃度0.1%以下でグルコースを含まない培養液で培養した細胞でATP含有量が有意に減少した. そのほか酸素濃度0.1%以下でグルコースを含む培養液で培養した細胞とグルコースの有無にかかわらず好氣的条件下 (酸素濃度21%) で培養した細胞

間では細胞内ATP含有量の有意な影響は認められなかった.

解糖系は嫌氣的条件下でも行われるが, 酸化的リン酸化によるATPの生成の過程では酸素を必要とする. 気相の酸素濃度が0.1%以下でも培養液中にグルコースが存在していれば解糖でATPの生成を維持できたためATP濃度に差が認められなかったと考えられる. また, 好氣的条件下で培養した細胞では, 1時間の培養ではグルコースの有無による細胞内のATP含有量に有意な影響は見られなかった. 実験に使用したDMEMにはグリシンなどのアミノ酸が含まれている<sup>14)</sup>. 好氣的条件下でグルコースを含まないDMEMで培養された細胞は, DMEM中のアミノ酸や細胞内に貯蔵されている中性脂肪などをエネルギー源として利用し, ミトコンドリア内の酸化的リン酸化によってATPの生成を維持できたためであると考えられる.

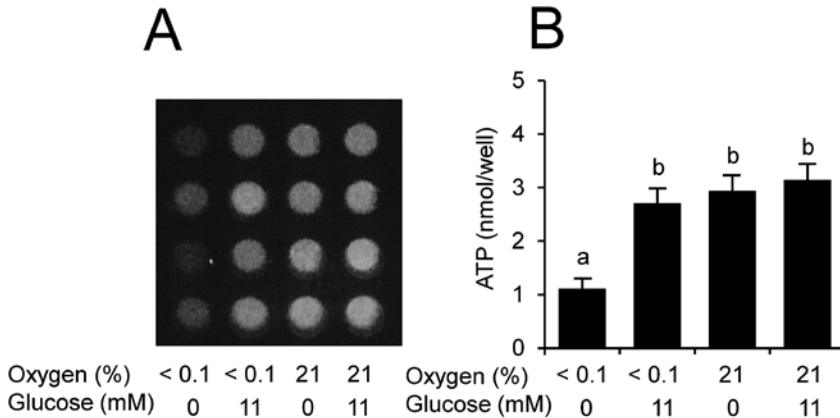


Fig. 7. 気相の酸素濃度と培養液中のグルコース存在下・非存在下における細胞内ATP含有量.

実験前日に培養肝細胞 HepG2を黒色の96-wellフラットボトムプレートに $8.75 \times 10^4$  cells/wellになるよう播種した. 翌日11 mMグルコースを含む実験用DMEMまたはグルコースを含まない実験用DMEMに変えた. その後気相の酸素濃度が21%または0.1%以下で1時間培養した. 1時間培養後に細胞内のATP含有量を測定した. A: 撮影した実際の画像データ. B: 酸素と培養液中のグルコースの有無による細胞内のATP含有量. 値は平均値 $\pm$ 標準誤差 ( $n = 4$ ). 一元配置分散分析後, Tukey HSDによる多重比較を行った. 異なるアルファベット間に有意差あり ( $p < 0.05$ ).



## 結語

ルシフェリン-ルシフェラーゼ反応による発光を用いてATPを定量する際、ルミノメーター機能の代用となる手法として、ケミルミネッセンス撮影装置と画像解析ソフトの併用により測定が可能であるか検討した。ATP標準液を用いた場合は露光時間や測定範囲の調節により測定が可能になることが明らかとなった。さらに、実際の培養肝細胞HepG2を用いて細胞数や培養液中のグルコースの有無、気相の酸素濃度によるATP含有量の変化を本研究の手法により検出することを可能とした。

本研究の一部は平成28年度プロジェクト研究「肝細胞を標的とし耐糖能改善を志向する機能性食品素材の探索とその機構に関する検討：とくにピルビン酸について」および平成29年度プロジェクト研究「肝細胞株におけるインスリンを凌ぐピルビン酸の糖・脂質代謝促進作用とその機構」の助成により行われたものである。

## 参考文献

- 1) 上代 淑人 監訳 (2001) ハーパー・生化学, 原著25版. 丸善出版株式会社, 東京.
- 2) Jun Yin, Zhanguo Gao, Dong Liu, Zhijun Liu, Jianping Ye (2007) Berberine improves glucose metabolism through induction of glycolysis. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 294: E148-E156.
- 3) Sasmita Tripathy, John D Chapman, Chang Y Han, Cathryn A Hogarth, Samuel L.M. Arnold, Jennifer Onken, Travis Kent, David R Goodlett, Nina Isoherranen (2016) All-trans-retinoic acid enhances mitochondrial function in models of human liver. *Molecular Pharmacology* 89: 560-574.
- 4) Inmaculada García-Ruiz, Pablo Solís-Muñoz, Daniel Fernández-Moreira, Teresa Muñoz-Yagüe, José A. Solís-Herruzo (2015) In vitro treatment of HepG2 cells with saturated fatty acids reproduces mitochondrial dysfunction found in nonalcoholic steatohepatitis. *Disease Models & Mechanisms* 8: 183-191.
- 5) Jiahua Ni, Zihui Zhang, Xiaoqin Luo, Lei Xiao, Nanping Wang (2015) Plasticizer DBP activates NLRP3 inflammasome through the P2X7 receptor in HepG2 and L02 cells. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 30: 178-185.
- 6) Ryota Eguchi, Sanae Akao, Ken-ichi Otsuguro, Soichiro Yamaguchi, Shigeo Ito (2015) Different mechanisms of extracellular adenosine accumulation by reduction of the external Ca<sup>2+</sup> concentration and inhibition of adenosine metabolism in spinal astrocytes. *Journal of Pharmacological Sciences* 128: 47-53.
- 7) Yi-Chiung Hsu, Hsin-Chen Lee, Yueh-Hsin Ping, Tsung-Yun Liu, Wing-Yiu Lui, Chin-Wen Chi (2007) Mitochondria are an essential mediator of nitric oxide/cyclic guanosine 3',5'-monophosphate blocking of glucose depletion-induced cytotoxicity in human HepG2 cells. *Molecular Cancer Research* 5: 923-32.
- 8) 加藤 博章, 中津 亨 (2007) ホタルの発光色を制御する仕組み-発光酵素ルシフェラーゼの結晶構造とメカニズム-. 京都大学低温物質科学研究センター誌11: 44-51.
- 9) 厚生労働省 監修 (2004) 食品衛生検査指針微生物編 2004, p 71-74. 社団法人日本食品衛生協会, 東京.
- 10) Atushi Kawano, Hiromichi Nakamura, Shu-ichi Hata, Miki Minakawa, Yutaka Miura, Kazumi Yagasaki (2009) Hypoglycemic effect of aspalathin, a rooibos tea component from *Aspalathus linearis*, in type 2 diabetic model db/db mice. *Phytomedicine* 16: 437-443.
- 11) Caroline A Schneider, Wayne S Rasband, Kevin W Eliceiri (2012) NIH Image to ImageJ: 25

- years of image analysis. *Nature Methods* 9: 671-675.
- 12) S. P. M. Crouch, R. Kozlowski, K. J. Slater, J. Fletcher (1993) The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *Journal of Immunological Methods* 160: 81-88.
- 13) Chengqian Yin, Dan He, Shuyang Chen, Xiaoling Tan, Nianli Sang (2016) Exogenous pyruvate facilitates cancer cell adaptation to hypoxia by serving as an oxygen surrogate. *Oncotarget* 7: 47494-47510.
- 14) Harry Eagle (1959) Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. *Science* 130: 432-437.