

これから 3次元培養を始める方へ [Vol. 8]

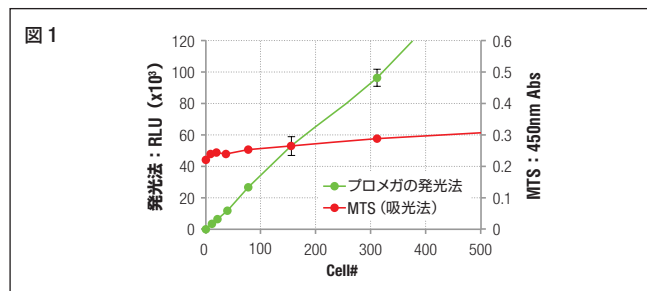
皆さんは日々の実験において、生存細胞数をどういった方法で測定していますか？

今回は細胞の持つ ATP から生存細胞の測定する技術と、昨今、注目が高まっている 3次元培養サンプルへの応用について紹介します。

① ATP の測定技術：

すべての生物の細胞は生き続けている限り、エネルギーとなる ATP を合成し続けています。プロメガでは ATP を指標とすることで生細胞数を計測する技術があります。この技術にも ATP を必要とするホタルルシフェラーゼの発光反応が深く関わっています。

細胞の還元能に基づいた MTT・MTS 法を用いた吸光法での細胞数測定でも良いかもしれませんが。ですが、発光法は非常にバックグラウンドが低いという特長があり、わずか数十個からの細胞数でも測定できるという強みがあります。(図 1)



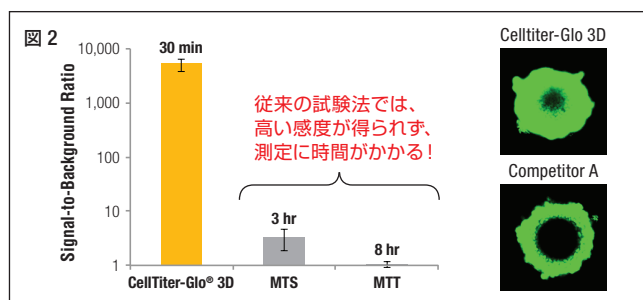
発光法は下記のメリットもあります。

- 検出感度や評価化合物の自家蛍光の問題から、わざわざ検出系を組み替えなくても良い!
- 初代培養細胞や患者由来の細胞などの貴重なサンプルにおいても、少ない細胞数で生細胞数の測定が十分できる!
- アッセイ時間が短く (プロメガの発光法: 約 15 分、MTS: 2 時間) 結果がすぐに得られる!
- 検出試薬の毒性がない! など。

② 2次元培養から 3次元培養への応用へ：

多くの研究室において、いわゆる 2次元培養がまだまだ主流です。しかし、2次元培養の環境は生体内とは多くの点で違っており、細胞本来の性質を十分反映していないと言われています。2次元培養と生体内の差を埋めるアッセイ系として 3次元培養法に注目が高まっており、様々な 3次元培養の技術が開発されています。

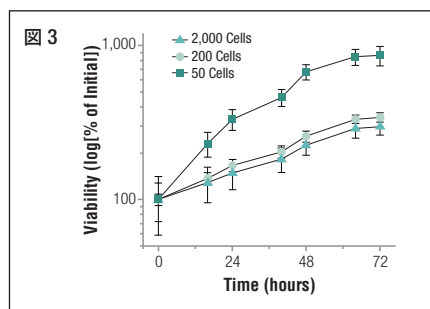
3次元培養サンプルでは細胞表面マーカーの染色など定性的な解析が可能ですが、定量的な解析方法については従来法では問題があります。MTT・MTS 法は 3次元培養サンプルにおいて十分なシグナルが得られないといった問題があるのです (図 2 左)。



この原因として、サンプルの内部まで試薬が十分に浸透しない点と、MTT・MTS 法ではバックグラウンドレベルが高い点にあります。

プロメガではこれらの問題点を改善し、独自の発光技術を 3次元培養サンプル用に最適化することに成功しました。CellTiter-Glo 3D は 3次元培養サンプルを十分に溶解することができます。図 2 右では DNA 結合蛍光色素を内部にまで浸透させることで試薬の細胞溶解性を示しました。

また、これまで 3次元培養サンプルの解析を行う際には細胞の固定あるいは溶解が必要なため、経時的なアッセイは難しい背景がありました。この点もプロメガでは新規ルシフェラーゼの発光技術を用いた RealTime-Glo により、対応できています。RealTime-Glo は膜透過性の前駆基質が生細胞内で還元され発光基質となることで測定を行う非溶解性の測定技術です。図 3 では Magnetic 3D Bioprinting kit にて形成したスフェロイドサンプルに対して、RealTime-Glo を加え、3次元培養下での経時的な細胞増殖が評価可能であることを示しました。



がん創薬の領域では、酵素を基盤とした *in vitro* の研究から、細胞株を使った薬剤スクリーニングへと移り、患者組織由来の細胞を用いた PDX (Patient-Derived-Xenograft) モデル

で評価する時代に移りつつあります。これからの創薬では、2次元・3次元・PDX モデルを組み合わせて最適な医薬品を開発するという流れになっていくのではないのでしょうか。プロメガの発光技術が、2次元培養サンプルだけでなく、皆様の 3次元培養サンプルの評価・検討の手助けとなればと思います。

最後に、プロメガでは 3次元培養下における種々の細胞マーカーについて測定を実施しており、下記のリンク先にて公開しています。

[高次元細胞実験プロジェクト](#)

[検索](#)

プロメガ株式会社

本社 〒103-0011
東京都中央区日本橋大伝馬町14-15 マツモトビル
Tel. 03-3669-7981 / Fax. 03-3669-7982

テクニカルサービス

Tel. 03-3669-7980 / Fax. 03-3669-7982
E-Mail : prometec@jp.promega.com