



アッセイプロトコル

High Content Analysis

創薬研究用ヒト腎細胞

3D-RPTEC[®]

日機装株式会社

はじめに

このたびは、”3D-RPTEC”をお買い上げいただきありがとうございます。本稿は 3D-RPTEC を用いたハイコンテンツアナリシス（HCA）のプロトコル例を示したものになります。3D-RPTEC を用いた評価のご参考になれば幸いです。

目次

| | |
|-------------------------------|-------|
| 1. 使用機器・試薬類 | - 3 - |
| 2. 実施例 | - 4 - |
| 2-1. 事前準備 | - 4 - |
| 2-2. 実施プロトコル（生細胞染色の場合） | - 4 - |
| 2-3. 実施プロトコル（固定細胞染色の場合） | - 6 - |
| 2-4. 画像解析 | - 7 - |
| 3. 問い合わせ先 | - 7 - |

1. 使用機器・試薬類

以下にハイコンテンツアナリシスに必要な機器や試薬の一例を示しております。各施設でのご使用に合わせて適宜改変してください。

測定機器

- ・共焦点定量イメージサイトメーターCellVoyager CQ1（横河電機）

測定用機材

| 製品名 | 製造 | カタログ番号 | 規格/容量 |
|------------------------------------|---------|--------|--------|
| 超低接着表面 96 ウェル スフェロイドクリアボトムプレート黒 丸底 | Corning | 4515 | 96well |

以下に、細胞小器官等を標識する色素試薬の例を記します。各標識色素の蛍光波長（色）は組み合わせに応じて選択ください。以下の試薬を用いた実施例を「2. 実施例」に示します。

試薬類

| 製品名 | 製造元 | 製品番号 | 規格 | 濃度 | Ex/Em |
|--|-------------------------------------|-----------|------------|-----------------|---------|
| Hoechst 33342 | Thermo Fisher Scientific | H3570 | 10 mL | 10 mg/mL | 350/461 |
| Cell ROX Green ¹ | Thermo Fisher Scientific | C10444 | 5 × 50 µL | 2.5mmol/L | 485/520 |
| ER Tracker Green | Thermo Fisher Scientific | E34251 | 100 µg | 1 mmol/L に調製 | 504/511 |
| Lyso Tracker Red | Thermo Fisher Scientific | L7528 | 20 × 50 µL | 1 mmol/L | 577/590 |
| Cell ROX Deep Red ² | Thermo Fisher Scientific | C10422 | 5 × 50 µL | 2.5mmol/L | 644/665 |
| Mito Tracker Deep Red | Thermo Fisher Scientific | M22426 | 20 × 50 µg | 1 mmol/L に調製 | 644/665 |
| Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) ※Ca ²⁺ /Mg ²⁺ 含有 | Thermo Fisher Scientific (gibco) | 14025-092 | 500 mL | - | - |

1：Cell ROX Green は核とミトコンドリア内の活性酸素（ROS）を標識する。

2：Cell ROX Deep Red は細胞質内の ROS を標識する。

多重染色組み合わせ例（終濃度 / 希釈倍率）

複数のマーカーで標識する場合は波長が重ならないような色素の組み合わせを設定する。

組み合わせ例①

- ・ Hoechst 33342（20 µg/mL / 原液から 500 倍希釈）
- ・ ER Tracker Green（500 nmol/L / 原液から 2000 倍希釈）
- ・ Mito Tracker Deep Red（100 nmol/L / 原液から 10000 倍希釈、段階希釈可）

組み合わせ例②

- ・ Cell ROX Green（5 µmol/L / 原液から 500 倍希釈）
- ・ Lyso Tracker Red（100 nmol/L / 原液から 10000 倍希釈、段階希釈可）
- ・ Cell ROX Deep Red（5 µmol/L / 原液から 500 倍希釈）

2. 実施例

2-1. 事前準備

1. 薬物曝露したプレートを観察し、スフェロイドの有無や形態を確認する。
※染色作業や測定プレートへの移し替え中の紛失やバラツキを考慮して例数は n=4~6 を推奨する。
2. 各染色試薬を培養培地へ添加し、調製した染色液を遮光して 37°C に温めておく。
3. 洗浄に必要な分の HBSS を分注し、37°C に温めておく。
必要量：(125 µL/well × 4 回洗浄) × ウェル数 + α

2-2. 実施プロトコル（生細胞染色の場合）

1. 培養プレートから細胞を吸引しないように培地を除去する。
2. 調製した各染色液を 100 µL/well で各ウェルに添加する。
3. 遮光して 37°C インキュベーター内で 60 分間静置して染色する。
4. 培養プレートから細胞を吸引しないように染色液を除去する。
5. HBSS を 125 µL/well（染色液よりも多い容量を設定）で添加し、遮光で 5 分間静置する（洗浄作業）。
※3D-RPTEC は約 5 分間でウェル底に自然沈降する。
6. 3D-RPTEC の沈降を確認後、細胞を吸引しないように HBSS を吸引除去する。
（上記 HBSS での洗浄を 4 回繰り返す。V 底プレートでは残量があるので多めに洗浄することを推奨する。）

7. 培養プレートから 3D-RPTEC を広口チップで培地とともに 100 μL 吸引し、下図のように低接着黒色丸底プレートに移す。回収漏れを防ぐため、シングルピペットの使用を推奨する。

※明視野での画像解析に影響するため、黒色丸底プレートの底をチップ等で傷つけないようにご注意ください。

※3D-RPTEC 移動時の注意点※

3D-RPTEC 専用培地でチップ内をコーティングすることで、3D-RPTEC のチップ内壁への吸着による紛失を防ぐことができる。タンパク質成分が含まれていないバッファー中では細胞がチップやチューブ等の壁面に付着して細胞紛失につながることもあるため、タンパク質コーティング済みのチップまたは低吸着のチップの使用を推奨する。

方法：1.5mL チューブに 3D-RPTEC 専用培地を準備し、2~3 回ピペッティングする。

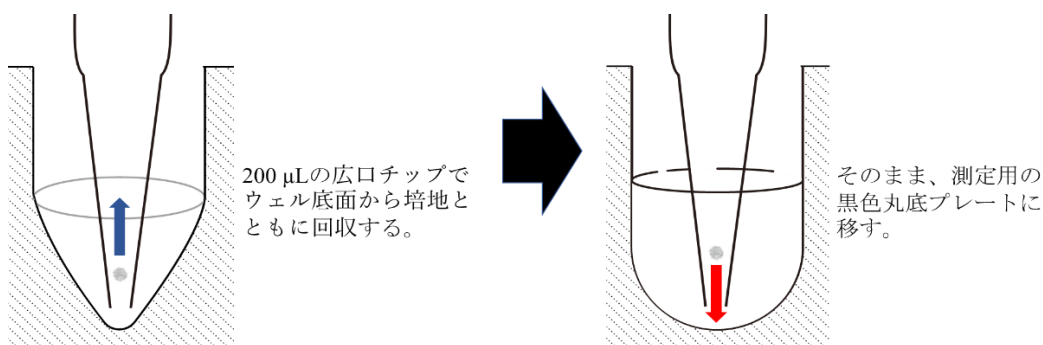


図2 3D-RPTEC の移動方法

8. ブランクとして培地のみ 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ を添加する。
9. CellVoyager CQ1 で測定する。測定の際は機器内の温度環境を 37°C に設定する。

※注意事項※

染色試薬によっては生細胞染色後に 4% PFA (4% パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液) 等で固定可能な色素もあるため、各試薬の取扱説明書に沿って実施して下さい。なお、メタノールで固定する場合、染色試薬によっては蛍光減衰を起こすことがあるため、必ず試薬の取扱説明書を事前にご確認ください。

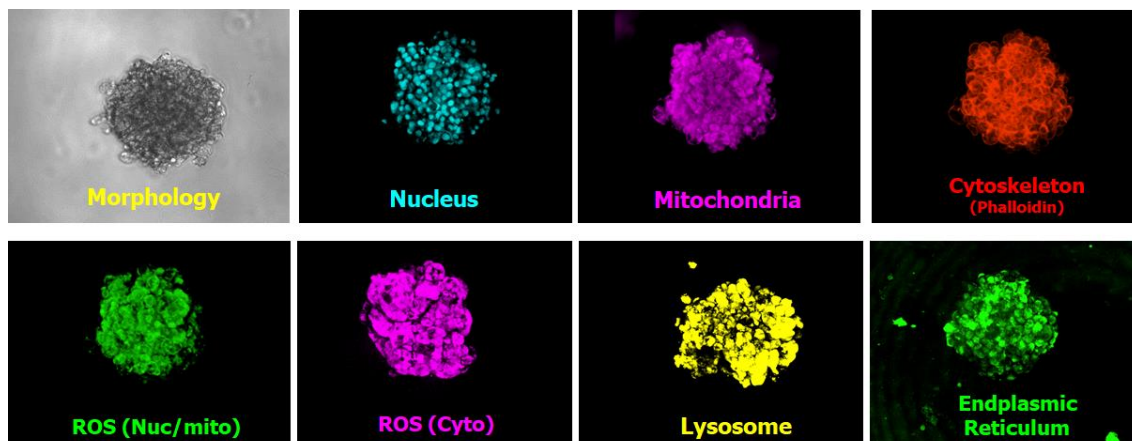
2-3. 実施プロトコル（固定細胞染色の場合）

実施例として、PFA で固定した細胞をファロイジンで染色するプロトコルを紹介します。

ファロイジン：Phalloidin-iFluor 555（AAT Bioquest、型番 23119、コスモバイオ販売）
556/569 nm（Ex/Em）、原液を 1000 倍希釈して使用

1. 培養プレートから細胞を吸引しないように培地を除去する。
2. 4% PFA を 100 μ L/well で添加し、45 分間静置して固定する。
3. 培養プレートから細胞を吸引しないように 4% PFA を除去する。
4. PBS を 125 μ L/well で添加し、5 分間静置する。
5. Phalloidin-iFluor 溶液を 1% BSA（PBS で調製）で希釈調製する（原液を 1000 倍希釈）。
6. 調製したファロイジン染色液を 100 μ L/well で各ウェルに添加する。
7. 遮光して室温で 60 分間静置して染色する。
8. 培養プレートから細胞を吸引しないように染色液を除去する。
9. PBS を 125 μ L/well で添加し、遮光で 5 分間静置する（洗浄作業）。
※3D-RPTEC は約 5 分間でウェル底に自然沈降する。
10. 3D-RPTEC の沈降を確認したのち、細胞を吸引しないように PBS を吸引除去する。
（PBS での洗浄を 3 回繰り返す。）
11. 2-2 の 7.以降と同様の手順で 3D-RPTEC の移動と測定を行う。

以下に 3D-RPTEC のハイコンテンツアナリシス時の染色画像例を示す。



※蛍光画像は輝度値を疑似カラーで画像化

| | |
|-----------------------|-----------------------|
| Nucleus | Hoechst 33342 |
| Mitochondria | Mito Tracker Deep Red |
| Cytoskeleton (Actin) | Phalloidin |
| ROS (核/ミトコンドリア) | Cell ROX Green |
| ROS (細胞質) | Cell ROX Deep Red |
| Lysosome | Lyso Tracker Red |
| Endoplasmic Reticulum | ER Tracker Green |

2-4. 画像解析

CellVoyager CQ1 でスフェロイドの蛍光画像を取得して定量化することで薬物の各細胞小器官への影響を評価することができる。解析手法は実験目的に応じて設定する。なお、3D-RPTEC での解析例を以下に記す。

| | |
|----------|--|
| 解析ソフトウェア | CellPathfinder (横河電機) |
| スライス数 | 1視野あたり21枚のzスタック画像 (1スタックあたり4.76 μm 間隔) |
| 形態解析 | 明視野画像から画像処理によって細胞の肥厚部分を強調したDPC (Digital Phase Contrast) 画像を作成し、3D-RPTECを認識させた。認識したスフェロイドの形態パラメータ (area, diameter, circumference, circularity, compactness, anisometry) を数値化した。 |
| 輝度値の解析 | 21枚のスライス画像を1枚に統合したMaxIP画像を採用した。各波長の総蛍光強度であるTotal intensityを数値化した。 |
| 不採用画像 | デブリによって輝度値に影響する画像は除外した (Hoechst33342はデブリの染色等によって輝度値に影響することがある)。 |

3. 問い合わせ先

日機装株式会社
創薬研究用ヒト腎細胞お問い合わせアドレス
Mail: 3D-RPTEC@nikkiso.co.jp
HP: <https://www.nikkiso.co.jp/products/medical/3drptec/>

