



アッセイプロトコル

ATP 測定

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 ATP 測定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. 実施方法	- 3 -
2-1. 事前準備	- 3 -
2-2. 実施プロトコル	- 4 -
3. 腎毒性評価の試験例.....	- 7 -
4. その他.....	- 7 -
5. 参考文献	- 7 -
6. 記録用紙	- 7 -
7. 問い合わせ先.....	- 8 -

1. 使用機器・試薬類

以下に ATP 測定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頂ければと思います。

測定機器

- ・ 蛍光発光測定用マイクロプレートリーダー

測定用機材（例）

製品名	製造	カタログ番号	規格/容量
Nunc™ F96 MicroWell™ Black and White Polystyrene Plate (白色プレート) または Corning® 96 ウェル 白 透明ボトム 平底 細胞培養表面処理 ポリスチレン マイクロプレート (白色クリアボトムプレート)	Thermo Scientific Corning	236105 3610	96well plate White 50 個/箱 96well plate 48 個/箱
セルセーバーチップラック入 (広口チップ)	QSP	FG-FB205R	200 μ L / 96 本 ×10 ラック

試薬類

製品名	製造	カタログ番号	規格/容量
CellTiter-Glo 3D Cell Viability Assay	Promega	G9681	10 mL
rATP	Promega	P1132	10 mM, 0.5 mL

2. 実施方法

2-1. 事前準備

1. Celltiter-Glo 3D Reagent を 4℃冷蔵庫で事前に一晚解凍する。
2. アッセイに必要な分の Celltiter-Glo 3D Reagent を分注しておく。
(1 ウェル 100 μ L × ウェル数 + α)
3. Celltiter-Glo 3D Reagent は使用前に室温(22 – 25℃)に戻しておく。(目安：30 分程度)

(検量線から ATP 量を算出する場合)

4. ATP 標準液 (rATP) を段階希釈する。下記に段階希釈の例を示す。

調製は 0.6 mL チューブを使用する。調製した各 rATP 溶液は、10 nmol/L~1000 nmol/L の溶液を 100 μ L ずつ白色プレートに添加する。

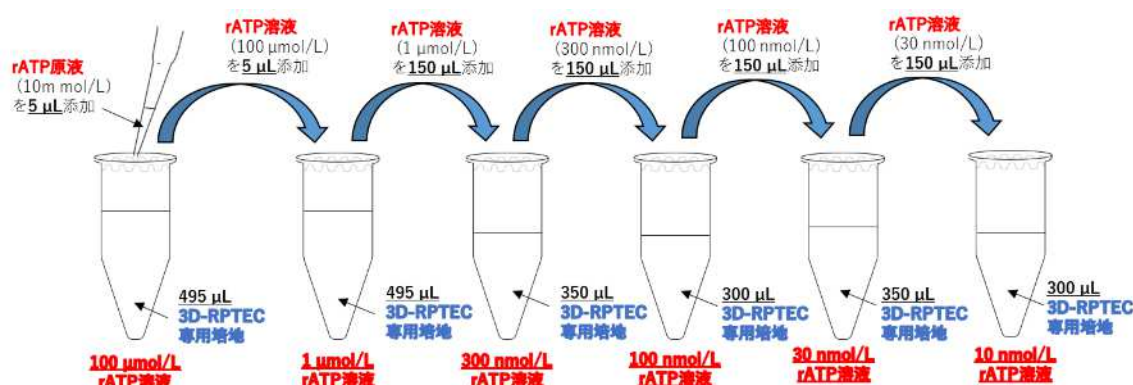


図 1 rATP 標準液の調製例

2-2. 実施プロトコル

1. 培養プレートから 3D-RPTEC を広口チップで培地とともに 100 μ L 吸引し、下図のように白色プレートまたは白色クリアボトムプレートに移す (細胞の回収漏れが懸念される場合は白色クリアボトムプレートを用いて細胞回収の確認が可能)。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。

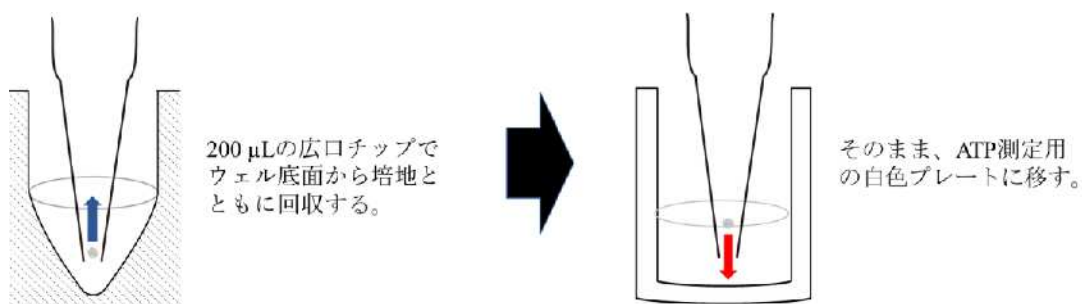


図 2 3D-RPTEC の移動方法

2. ブランクとして 3D-RPTEC が入っているプレートとは別の白色プレート※に専用培地 100 μ L を添加する。
3. 検量線から ATP 量を算出する場合は、2-1.「事前準備」で調製した ATP 標準液 (rATP) を 3D-RPTEC が入っているプレートとは別の白色プレート※に 100 μ L ずつ添加する。次頁に配置例を示す。

※ 検量線の高濃度域は発光値が高いため、ATP 標準液およびブランクはサンプルとは別プレートを推奨する。

※ 被験物質サンプルは 1 群 n=6 以上とすることで精度の良いデータを得ることができる。下図は n=6 の例を示す。

下図に薬物評価する際の配置例を示す。レイアウトは実験条件に合わせて適宜変更可能である。

Plate 1：検量線およびブランク用プレート Plate 2：被験物質測定用プレート

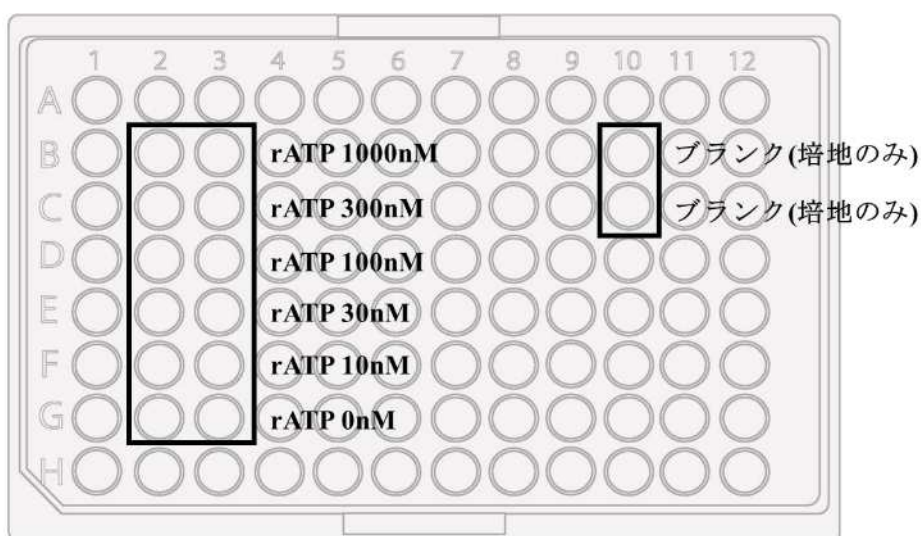


Plate 1：検量線、ブランク用プレート

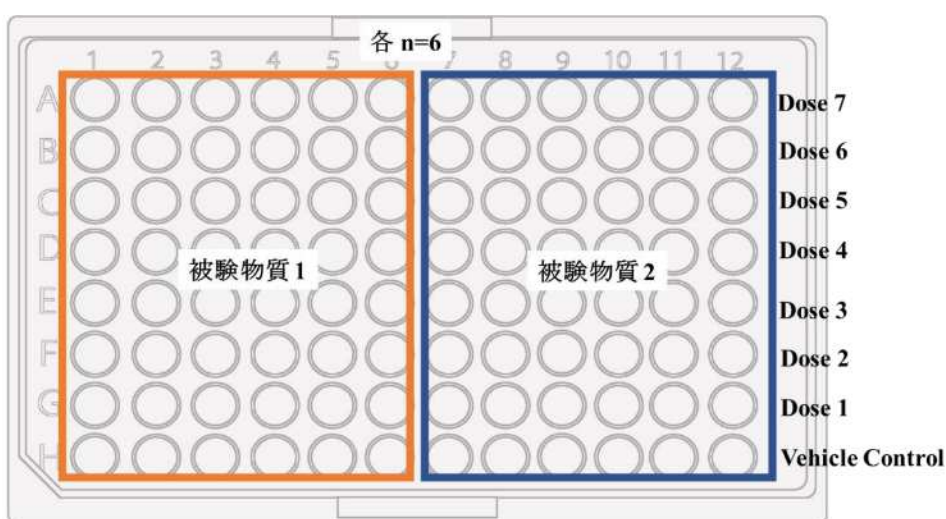


Plate 2：被験物質測定用プレート

4. 白色プレートのウェル内容量と等量（100 μ L）の Celltiter-Glo 3D Reagent を各ウェルに添加し、軽く混和する。
5. 室温（22–25 $^{\circ}$ C）・遮光で 30 分間静置する。なお、プレートシェーカーがある場合はアルミホイル等で遮光した白色プレート（Plate 2：被験物質測定用プレート）をシェーカーで 5 分間攪拌（約 1000 rpm、ウェル内がこぼれない程度）し、その後、室温にて 25 分間静置（計 30 分間の反応）を推奨する。シェーカーで均一に混和することでより安定的な発光値を得ることができる。
6. 蛍光発光測定用マイクロプレートリーダーで発光測定を行う（積算時間：1000 msec）。

以下に、「簡易法」として培養プレート中に直接 Celltiter-Glo 3D Reagent を添加する方法を記す。スクリーニング等のサンプル数が多い場合の簡易的測定法であり、いずれの方法でも同様の測定結果を得ることができる。なお、培養を継続するウェルがある場合は培養プレートから白色プレートに測定サンプルを移してから ATP 量を測定する方法（上記）を推奨する。

1. ブランクとして 3D-RPTEC が入っているプレートとは別の白色プレートに専用培地 100 μ L を添加する。
2. 検量線から ATP 量を算出する場合は、2-1.「事前準備」で調製した ATP 標準液（rATP）を 3D-RPTEC が入っているプレートとは別の白色プレートに 100 μ L ずつ添加する。
3. 3D-RPTEC の培養プレート中の ATP 測定ウェル、ブランクウェルおよび ATP 標準液の各ウェルに Celltiter-Glo 3D Reagent を 100 μ L ずつ添加する。なお、8 連または 12 連等のマルチチャンネルピペットを使用しても良い。
4. 室温（22–25 $^{\circ}$ C）・遮光で 30 分間静置する。
5. 反応後の培養プレートの各ウェルをシングルピペットまたはマルチチャンネルピペットを用いてピペッティングによりゆっくりと混和し、全量または 180 μ L/well*を白色プレート（Plate 2：被験物質測定用プレート）に移す。
*: 泡立ちが気になる場合はプレート遠心機により泡立ちを除去しても良い。180 μ L/wellとすることで泡立ちなく回収することができる。
6. 蛍光発光測定用マイクロプレートリーダーで発光測定を行う（積算時間：1000 msec）。

3. 腎毒性評価の試験例

以下に 3D-RPTEC®の ATP 測定による腎毒性評価の試験例を示す。詳細は 5. 参考文献の文献 3 (Arakawa H et. al) を参照。

薬物曝露濃度：有効血中濃度の 100 倍濃度を最高用量とし、公比約 3 で用量を設定

曝露日数：7 日間（2～3 日に 1 回の培地交換による薬物曝露）

測定対象：CellTiter-Glo 3D Cell Viability Assay による 1well あたりの発光値

評価対象：7 日間曝露後のスフェロイド ATP 量の減少（Control 群との比較）

溶媒：DMSO*または 3D-RPTEC 専用培地

*：腎毒性薬物である Cisplatin は DMSO と付加体を形成する（Fisher SJ *et al.*, *Neurotoxicology* . 2008 May;29(3):444-52）ことで毒性作用が軽減することが知られているため、DMSO 以外の媒体（培地や培地など）で調製することを推奨する。

4. その他

3D-RPTEC®を用いた腎毒性評価は、細胞数の観点から MTT 法や WST 法のような培地の吸光度による毒性評価では感度が低い傾向がある。一方、CellTiter-Glo 3D Cell Viability Assay のような「発光測定」による毒性評価の方が高感度に薬物の毒性を検出することができる。また、細胞傷害性マーカーとして培地中の LDH（乳酸脱水素酵素）を LDH-Glo Cytotoxicity Assay（Promega）を用いて測定することも可能である。なお、CellTiter-Glo 3D Cell Viability Assay を用いた細胞内 ATP 量測定と、LDH-Glo Cytotoxicity Assay による培地中の LDH の測定は併用して評価することができる。

5. 参考文献

1. CellTiter-Glo® 3D Cell Viability Assay Protocol
2. Xia, M. *et al.* (2008). Compound cytotoxicity profiling using quantitative high-throughput screening. *Environ. Health Perspect.* 116, 284–91.
3. Arakawa, H. *et al.* (2024). Three-dimensional Culture of Human Proximal Tubular Epithelial Cells for an in vitro Evaluation of Drug-induced Kidney Injury. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* 113 (11) 3255-3264.

6. 記録用紙

多施設バリデーション実施（AMED レギュラトリーサイエンス事業）で使用した記録用紙

を別紙に載せる。

7. 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/>

