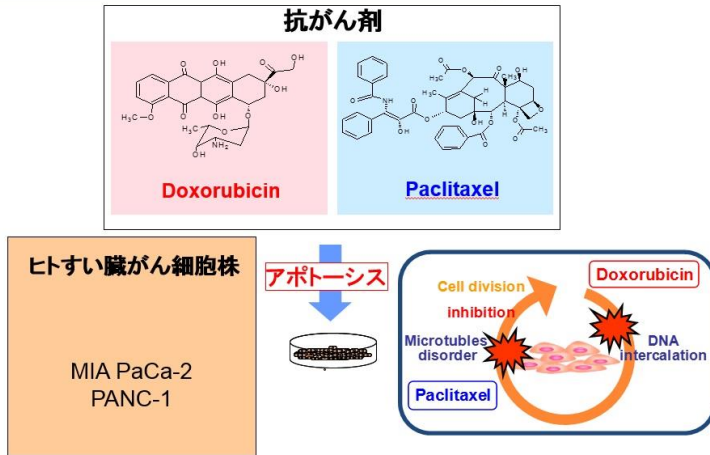


(1) HP-SPR (-3D) を用いたすい臓がん細胞の活性化測定 (図 2)

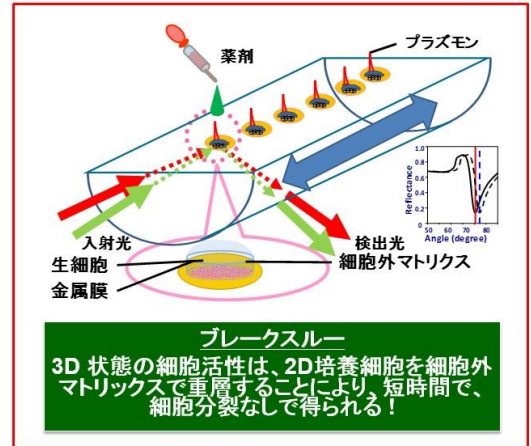
従来技術

新技術—新開発HP-SPR-3D

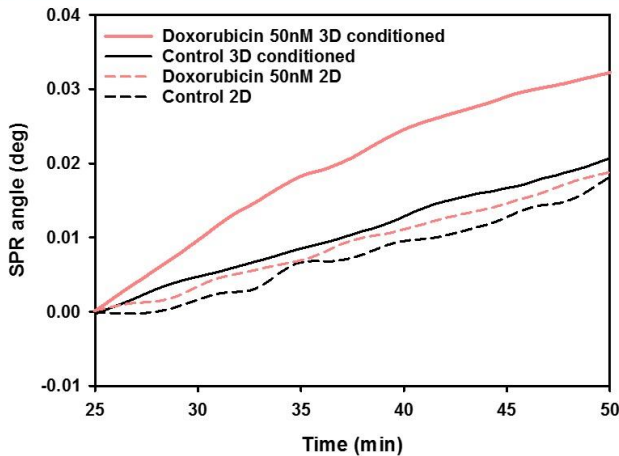
3D-セルベースアッセイ (CD-DST)



HP-SPR-3D



HP-SPR-2D vs 3D (すい臓癌)



**【目的】** 抗がん剤の評価に際しては、従来法では比較的長い判定期間を必要とするという問題がある。実際には三次元培養することなく、非分裂条件下で三次元培養（または生体内）と同等に活性化することができれば、少なくとも三次元培養のための期間は不要となり、迅速かつ簡便に対象物質を評価しうる。また、そのような三次元培養の模倣方法は、抗がん剤の評価のみならず、種々の刺激の生理活性の評価・判定への応用が期待できる。このため基板に維持した単層状の細胞の一部を、細胞外基質成分を含む組成物で覆い、細胞を非分裂条件下で活性化する方法の検討を行った。

**【方法】** 抗がん剤として 25 nM ドキソルビシンを用いた。

二次元培養では、BK7 スライドガラス上に 45 nm 金を蒸着したセンサーチップに、高さ約 1.5 mm、外径 9 mm、内径 8 mm のポリプロピレンリングをコラーゲン (Type A-I) で接着した。この中にペニシリン-ストレプトマイシン、および FBS フリーの DMEM に調製したヒト膵臓がん細胞 MIA PaCa-2 を、 $1 \times 10^6$  cells/ml を 100  $\mu$ l 滴下し、37  $^{\circ}$ C、CO<sub>2</sub> 5%、湿度 95% 下にて一晩保持した。

三次元培養状態では、同様に一晩保持した後、培養液 50  $\mu$ l を取り除き、コラーゲンドロップキットの A 液 (Collagen Cellmatrix Type CD)、B 液 (10 倍濃縮 F-12 培地)、および C 液 (再構成用緩衝液) を 8 : 1 : 1 の割合で混合したものを 30  $\mu$ l、細胞上全体に滴下し、再度 37 $^{\circ}$ C、CO<sub>2</sub> 5%、湿度 95% 下にて適宜静置した。その後、センサーチップを、マッチングオイルを介して HP-SPR センサーのプリズム上に設置し、5 ml の EMEM

(Minimum Essential Medium Eagle) で満たし、カスタムメイドの HP-SPR により測定を開始した。この際、CO<sub>2</sub> 5%, 37±0.1 °C 下にて行った。

なお、静置時間は、細胞分裂しない程度の短い時間に相当し、この HP-SPR シグナルの安定なトレンドを示すことにより決定した。測定開始 2~3 分後、SPR シグナルが安定していることを確かめ、ドキソルビシンを含む新しい 5 ml の EMEM, もしくはコントロールとして 5 ml の EMEM のみを交換した後、60 分間測定し続けた。

**【結果と考察】**二次元培養状態の細胞を用いた場合、コントロールと薬剤を投与したシグナルに差が認められず、細胞は活性化されていないことが確認できた。これに対して、三次元培養状態の細胞による試験では、細胞は活性化され、薬剤に対し感受性を示していることが判明した。25 nM ドキソルビシンは臨床で、抗がん効果が認められている。このように、本手法を用いることより、二次元培養細胞を細胞外マトリックスで重層することにより、短時間で、細胞分裂なしで三次元培養状態に活性化させ、生体内に近い微小環境を形成でき、臨床応用に結び付く、薬剤感受性試験が可能になることを証明した。