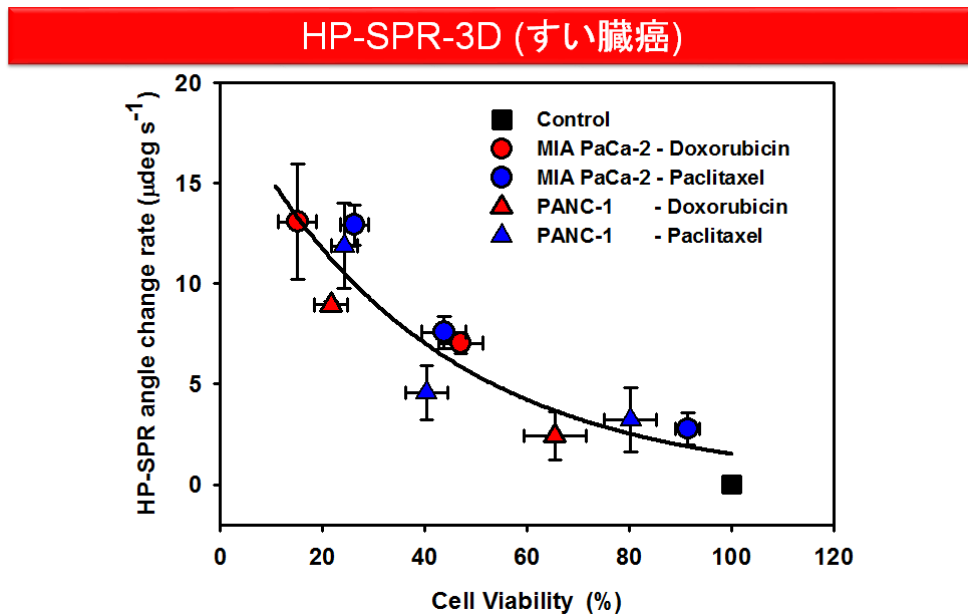


(2) HP-SPR (−3D) を用いたすい臓がん細胞への細胞毒性評価試験 (図 2)



【目的】生理的濃度で生理活性成分を探索する場合、生細胞を用いた *in vivo*-like セルベースアッセイが多く選択される。これは、細胞外マトリクスとの三次元培養による方法であり、2~4 週間の長い判定期間、蛍光色素と成分との競合反応による誤判定、判定試薬が必要な上に、効果と副作用（毒性）の同時判定が難しく、手技が煩雑で、労力を要する。一方、装置を用いる方法では、ターゲット成分の作用機序に左右される、従来法の結果との相関が低い、多剤併用薬効の評価が困難、という問題を抱えている。そこで、本研究では、レーザー分光法的一种である表面プラズモン共鳴法（SPR）を高精度化し開発した装置（HP-SPR）を用い、新規 *in vivo*-like セルベースアッセイの確立を検討した。

【方法】抗がん剤として、ドキシソルビシン、またはパクリタキセルを用いた。供試細胞として、ヒト膵がん細胞である、MIA PaCa-2 および PANC-1 を用いた。従来法であり臨床結果と相関がある三次元培養法として、CD-DST 法による細胞生存率の測定を行った。

各種成分を含む液体培地 DMEM を用いて、各がん細胞を 3.5×10^6 cells/ml 懸濁液として調製し、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）8 : 1 : 1（容量）に、調製した細胞懸濁液を 1/10 濃度になるように混合し、6 穴マイクロプレートの各穴に 30 μl を 3 滴ずつ落下、37°C、CO₂ 5%、湿度 91% 下にて 1 時間インキュベートした。その後、各種成分を含む DMEM 培地を 3ml ずつ各穴に入れ 24 時間インキュベートし、各種濃度の抗がん剤ストック溶液を 30 μL ずつ添加、さらに 24 時間インキュベートした。その後、各穴の培地を 4 ml の DMEM と交換、37°C、CO₂ 5%、湿度 91% 下にてプレートミキサーで 10 分間振とう後、同様の作業をもう一度繰り返した。さらに、各穴の培地を 4 ml の PCM-2 培地と交換し、2~3 日毎に 4 ml の PCM-2 培地で液交換を行いながら、7 日間培養を行った。各穴を 0.1% コラーゲナーゼを含む DMEM 培地 3 ml と交換、37°C、CO₂ 5%、湿度 91% 下にてプレートミキサーで 30 分間振とうした。コラーゲンが取り除かれた細胞をトリパンブルーで染色し、血球計算盤により細胞数を計測、コントロールの細胞生存数を 100% として生細胞数を計算した。

HP-SPR では、前例と同様に測定し、薬剤が細胞に作用し始める時間帯である薬剤投入後 25 分以降で、安定した直線的なシグナル部分を 5 分間モニターし、各細胞におけるコントロールの変化率を差し引き、HP-SPR 角度変化率として求めた。

【結果と考察】セルラインや抗がん剤の種類に依存せず、有意義に高い相関が得られた ($P < 0.001$)。抗がん剤の作用機構は、ドキソルビシンは、DNA への挿入とともに、トポイソメラーゼ II を阻害し、DNA 鎖を切断することにより働き、パクリタキセルは、微小管の脱重合の阻害により、細胞分裂を停止させる。このように異なっている。また、用いたセルラインはともに、K-ras 並びに p53 に変異が認められる。ただし、変異の箇所は異なっており、個人差を現わしている。

これを用い、従来法である共培養と高い相関が得られた。HP-SPR により検出されるシグナルは、ミトコンドリア内膜電位変化に由来する。このため、測定成分添加後早期のミトコンドリアの内膜電位変化率が、細胞の最終挙動の定量的なカギであることが示唆された。得られた結果は個人差や成分の作用機序の違いにも依存しないことが確認できた。HP-SPR 法は、非標識なため、標識による誤判定もなく、細胞培養も不要なため、非常に短時間で *in vivo*-like な効果と毒性の判定が可能となった。

これらのことから、得られた結果は、抗がん剤の作用機序の違い、および個人の遺伝子発現の違いに関わらず、薬効の評価を行えることを示している。