



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 μL / 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°C 冷蔵庫で事前に一晩解凍する。
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 μL × ウェル数 + α)
3. Celltiter-Glo 3D Reagent は使用前に室温(22 – 25°C)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)

- 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。

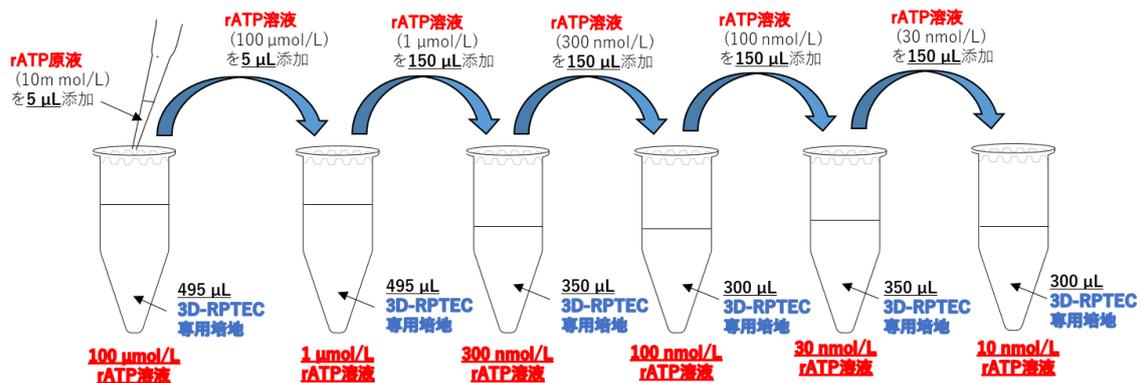


図1 rATP 標準液の調製例

2-2. 実施プロトコル

- 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。

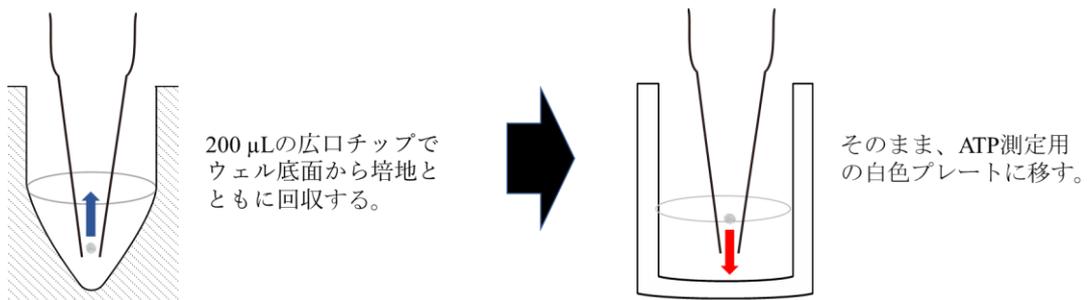


図2 3D-RPTEC の移動方法

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

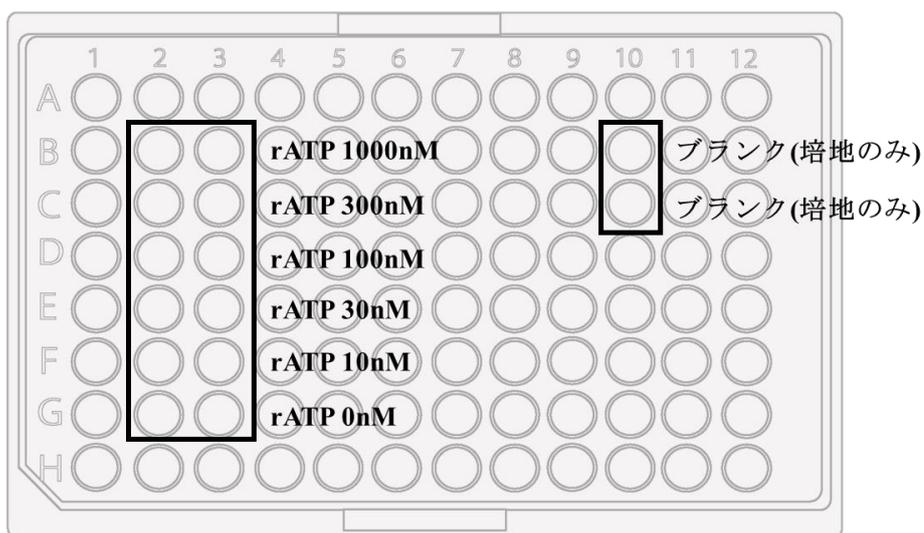


Plate 1：検量線、ブランク用プレート

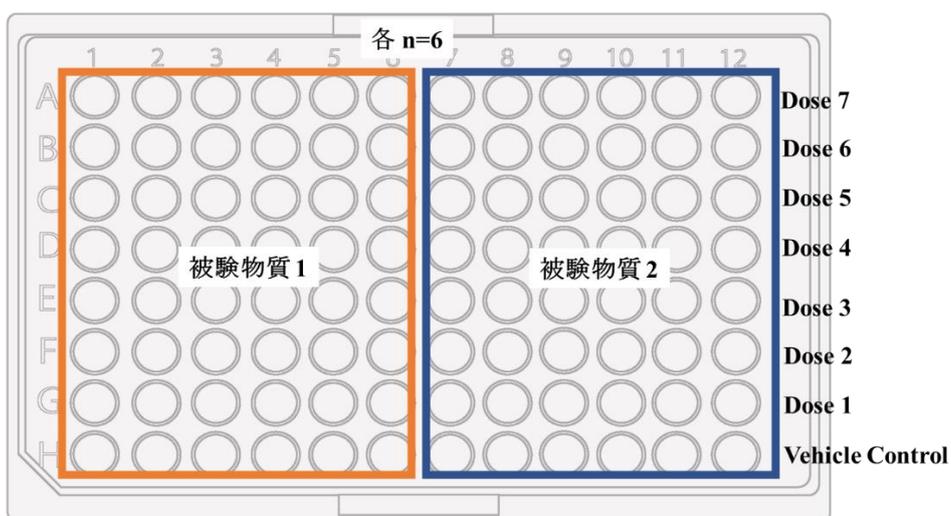


Plate 2：被験物質測定用プレート

4. 白色プレートのウェル内容量と等量（100 μL ）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 $^{\circ}\text{C}$ ）・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 μL 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 μL 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 μL 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 $^{\circ}\text{C}$ ）・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 $\mu\text{L}/\text{well}^*$ 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 $\mu\text{L}/\text{well}$ 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）

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. お問い合わせ先

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/>



被験物質調製記録

試験責任者確認： _____
 試験番号： _____

実施日： _____ 実施者： _____

1. 被験物質情報

No.	チューブラベルID	被験物質名	メーカー	製造番号	分子量	Lot No.	原液濃度 (mM)	秤量値 (mg)	培地添加量 (mL)	添加確認
①		Cisplatin	東京化成工業	D3371	300.1		1			<input type="checkbox"/> 確認
②		Adefovir	東京化成工業	A2322	273.2		3			<input type="checkbox"/> 確認
③		Mannitol	富士フィルム和光純薬	139-00842	182.2		100			<input type="checkbox"/> 確認
④		Cephalothin	東京化成工業	C2769	396.4		10			<input type="checkbox"/> 確認
⑤		Vancomycin	富士フィルム和光純薬	220-01304	1485.7		100			<input type="checkbox"/> 確認

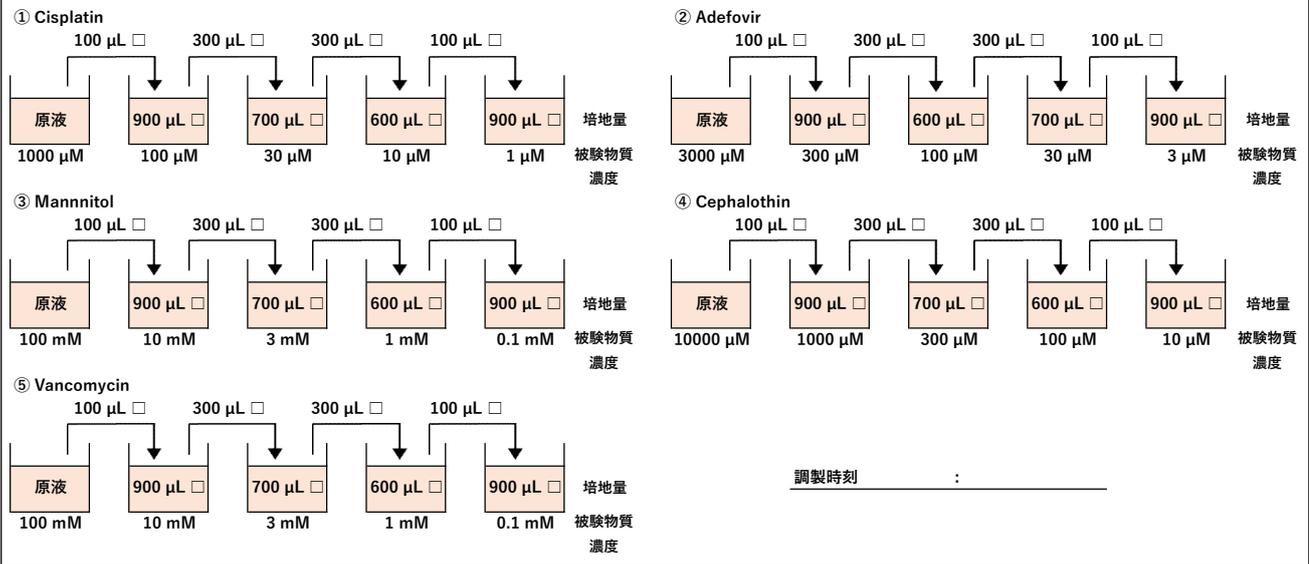
2. 実施手順

【被験物質原液の調製】

1	原液調製および希釈調製に必要な培地量を50 mLチューブに分注し、37°Cの恒温槽で温浴する。 分注量：	<input type="checkbox"/> 確認
2	上記の被験物質情報の「チューブラベルID」と、本日使用するチューブに記載したIDが同一であるか確認する。	<input type="checkbox"/> 確認
3	各被験物質の入った1.5 mLチューブをスピンドウンする。	<input type="checkbox"/> 確認
4	上記の「1.被験物質情報」の「培地添加量」欄に記載の容量で専用培地を添加し、被験物質の原液を調製する。	<input type="checkbox"/> 確認
5	ボルテックスして溶解を確認する。(CephalothinおよびVancomycinは溶解しにくいので、5分間の超音波またはボルテックスにより溶解させる)	<input type="checkbox"/> 確認
6	スピンドウンし、溶け残りが無いかを確認する。	<input type="checkbox"/> 確認

【被験物質含有培地の調製】

1	下図に従って、1.5mLチューブもしくは96well deep well plate等へ専用培地を添加する。	<input type="checkbox"/> 確認
2	下図に従って各被験物質の原液から段階希釈し、調製する。(段階希釈の際はチップは交換せずに同じものを使用しても良い)	<input type="checkbox"/> 確認



【3D-RPTEC培養プレートへの添加】

1	下記レイアウトのウェルに細胞があることを観察して確認する。紛失が確認された場合は予備のウェルから補充する。	<input type="checkbox"/> 確認
2	培養プレートの各ウェルから培地を吸引する。	<input type="checkbox"/> 確認

調製した被験物質、媒体対照用の培地（常温以上）を下図に従って100 μL/well, n=4で添加する。
 ※調製した容器から直接培養プレートへ添加する。(必要以上の吸着を防ぐため、調製した容器から分取して各wellに添加する)

培養プレート被験物質配置図 (各列分注したら□チェックする。)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Cisplatin 1 μM				Adefovir 3 μM				Mannitol 0.1 mM			
B	Cisplatin 10 μM				Adefovir 30 μM				Mannitol 1 mM			
C	Cisplatin 30 μM				Adefovir 100 μM				Mannitol 3 mM			
D	Cisplatin 100 μM				Adefovir 300 μM				Mannitol 10 mM			
E	Cephalothin 10 μM				Vancomycin 0.1 mM				予備			
F	Cephalothin 100 μM				Vancomycin 1 mM				予備			
G	Cephalothin 300 μM				Vancomycin 3 mM				Vehicle control			
H	Cephalothin 1000 μM				Vancomycin 10 mM				培地のみ			

4 インキュベーター (37°C, 5%CO2) で培養する。培養開始時刻 (: ~) 確認

【備考欄】 ※使用機器情報など記載。[記載例：マイクロピペットP1000 (GILSON, 200-1000μL)]

使用機器： 炭酸ガスインキュベーター (設定：37°C、5% CO2、)
 マイクロピペットP1000 () 確認
 マイクロピペットP200 () 確認

ATP測定記録

試験責任者確認： _____

試験番号： _____

実施日： _____

実施者： _____

1. 使用機器・試薬類

【使用機器】

マイクロプレートリーダー	(機器名： _____ / メーカー： _____)
--------------	----------------------------

【使用機材】

アッセイプレート	96well white plate [Nunc™ F96 MicroWell™ Black and White Polystyrene Plate, Thermo Scientific™, 236105] → もしくは、クリアボトム96well white plate (例：Corning、型番3610) を使用することも可。
広口チップ (例)	200 μL広口チップ [セルセーバーチップブラック入, FG-FB205R]

【使用培地・試薬】

培地	3D-RPTEC 専用培地 [NCP03CM, 100mL] (Lot. _____) (Exp. _____)
ATP測定キット	CellTiter-Glo 3D Cell Viability Assay [Promega, G9681, 10mL×10本] (Lot. _____) (Exp. _____)
ATP standard	10 mM rATP [Promega, P1132, 分注済み (5 μL)] (Lot. _____)

2. 事前準備

【前日準備】

1	Celltiter-Glo 3D Reagentを2本冷蔵庫 (4°C) に移し、一晩かけて解凍する。 ※直接水浴に入れない。 ※Celltiter-Glo 3D Reagentは1試験ごとに2本分使い切りとする。	<input type="checkbox"/> 確認
---	--	-----------------------------

【当日準備】

2	測定の30分前にCelltiter-Glo 3D Reagentを室温に戻しておく。	<input type="checkbox"/> 確認
3	測定前にCelltiter-Glo 3D Reagentを穏やかに数回転倒混和し、均一な溶液にする。	<input type="checkbox"/> 確認

3. 実施プロトコル

【3D-RPTECの回収】

1	広口チップを使用して、ウェル底面から3D-RPTECを培地とともに 100 μL 吸引し、アッセイプレートへ移す (配置図Plate2参照)。 ※回収漏れを防ぐため シングルピペット を使用する。 (回収時刻 _____ : _____)	<input type="checkbox"/> 確認
2	回収漏れがないことを顕微鏡で培養プレート各ウェルを確認する。 ※回収後の培養プレートは、ATP測定終了まで37°Cインキュベーターへ戻して保管しておく。 回収漏れを測定した場合 <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> 確認

【ATP standardの調製】 ※0.6mLまたは1.5mLマイクロチューブを使用する。

3	分注済みの5 μLの10 mM rATPを解凍後にスピンドウンし、495 μLの専用培地で希釈して100 μM rATPを調製する。	<input type="checkbox"/> 確認
4	100 μM rATP溶液を下図に従って段階希釈し、1000, 300, 100, 30, 10 nM rATP溶液を調製する。 使用ピペット 1-20 μL：マイクロピペットP20 20-200 μL：マイクロピペットP200 200-1000 μL：マイクロピペットP1000	<input type="checkbox"/> 確認
5	調製したrATP溶液または専用培地 (0 nMとblank用) をアッセイプレート (Plate1) へ100 μL/wellで分注する。	<input type="checkbox"/> 確認

【ATP測定試薬の添加、反応、測定】 ※マルチピペット使用可

6	等量 (100 μL) のCelltiter-Glo 3D Reagentをアッセイプレート (Plate1及びPlate2の色塗ウェル) に添加して軽く混和する。	<input type="checkbox"/> 確認
7	遮光、室温で30分間静置する。(反応時刻 _____ : _____ ~ _____ : _____)	<input type="checkbox"/> 確認
8	マイクロプレートリーダーにて発光測定を行う (integration time : 1000 msec)。 (測定時刻 _____ : _____)	<input type="checkbox"/> 確認

プレート配置図

Plate 1：検量線, blank用プレート

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	1000 nM					300 nM		} rATP 検量線n=2					
B													
C													
D	100 nM					30 nM							
E													
F												blank	
G	10 nM					0 nM						blank	
H													

Plate 2：被験物質測定用プレート (プレートへ移したら□チェックする。)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Cisplatin 1 μM	<input type="checkbox"/>	Adefovir 3 μM	<input type="checkbox"/>	Adefovir 3 μM	<input type="checkbox"/>	Mannitol 0.1 mM	<input type="checkbox"/>				
B	Cisplatin 10 μM	<input type="checkbox"/>	Adefovir 30 μM	<input type="checkbox"/>	Adefovir 30 μM	<input type="checkbox"/>	Mannitol 1 mM	<input type="checkbox"/>				
C	Cisplatin 30 μM	<input type="checkbox"/>	Adefovir 100 μM	<input type="checkbox"/>	Adefovir 100 μM	<input type="checkbox"/>	Mannitol 3 mM	<input type="checkbox"/>				
D	Cisplatin 100 μM	<input type="checkbox"/>	Adefovir 300 μM	<input type="checkbox"/>	Adefovir 300 μM	<input type="checkbox"/>	Mannitol 10 mM	<input type="checkbox"/>				
E	Cephalothin 10 μM	<input type="checkbox"/>	Vancomycin 0.1 mM	<input type="checkbox"/>	Vancomycin 0.1 mM	<input type="checkbox"/>	予備					
F	Cephalothin 100 μM	<input type="checkbox"/>	Vancomycin 1 mM	<input type="checkbox"/>	Vancomycin 1 mM	<input type="checkbox"/>						
G	Cephalothin 300 μM	<input type="checkbox"/>	Vancomycin 3 mM	<input type="checkbox"/>	Vancomycin 3 mM	<input type="checkbox"/>	Vehicle control					
H	Cephalothin 1000 μM	<input type="checkbox"/>	Vancomycin 10 mM	<input type="checkbox"/>	Vancomycin 10 mM	<input type="checkbox"/>	培地のみ	<input type="checkbox"/>				

【備考欄】 ※使用機器情報など記載。 [記載例：マイクロピペットP1000 (GILSON, 200-1000μL)]

使用機器： 炭酸ガスインキュベーター (設定：37°C、5% CO2、 _____)	
マイクロピペットP20 (_____)	<input type="checkbox"/> 確認
マイクロピペットP200 (_____)	<input type="checkbox"/> 確認
マイクロピペットP1000 (_____)	<input type="checkbox"/> 確認

ATP解析シート

試験責任者確認: _____
試験番号: _____

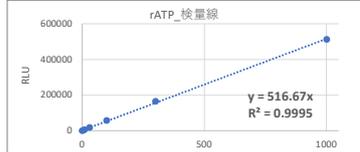
実施日: _____ 実施者: _____

1. 検量線、blank

【プレート配置図】

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1000 nM					300 nM						
B												
C												
D	100 nM					30 nM						
E												
F												
G	10 nM					0 nM					blank	blank
H												

rATP濃度	発光量Ave. (-blank)
1000 nM	512985
300 nM	164993
100 nM	57276
30 nM	19201
10 nM	6218
0 nM	31



【rawデータ入力】

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	508331	517711	1879	363	671	161554	168504	647	114	40	33	22
B	2108	1962	552	256	348	714	674	208	93	38	31	26
C	558	546	318	219	199	236	201	98	79	48	36	25
D	55615	59009	349	149	163	19447	19027	140	52	39	20	13
E	344	336	143	95	93	147	128	61	46	38	24	15
F	137	121	97	83	60	52	45	45	28	27	26	33
G	6302	6206	74	52	49	56	78	31	22	8	21	39
H	74	79	43	41	42	40	24	29	14	12	16	20

ATP補正用数値	516.7
決定係数 (R ²)	0.9995

2. 被験物質

【プレート配置図】

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Cisplatin 1 μM				Adefovir 3 μM				Mannitol 0.1 mM			
B	Cisplatin 10 μM				Adefovir 30 μM				Mannitol 1 mM			
C	Cisplatin 30 μM				Adefovir 100 μM				Mannitol 3 mM			
D	Cisplatin 100 μM				Adefovir 300 μM				Mannitol 10 mM			
E	Cephalothin 10 μM				Vancomycin 0.1 mM				予備			
F	Cephalothin 100 μM				Vancomycin 1 mM							
G	Cephalothin 300 μM				Vancomycin 3 mM				Vehicle control			
H	Cephalothin 1000 μM				Vancomycin 10 mM				培地のみ			

【rawデータ入力】

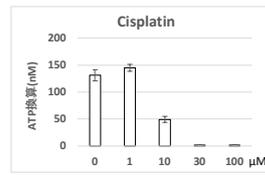
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	71298	72153	77008	79460	71891	68641	48018	77575	62649	66583	66345	69102
B	21584	26923	23942	29613	46227	71363	51892	57814	85801	77690	60143	68486
C	610	567	646	921	47944	50995	47156	44173	88944	71123	67720	80174
D	653	778	908	1156	36049	38374	39204	35815	80822	72403	96370	82208
E	67940	71004	57998	90446	67905	88794	68382	67531	76583	67373	67993	71218
F	79038	86602	86095	85584	54424	76920	62637	64067	64863	1672	1341	1117
G	12010	12754	15349	13654	75335	74582	60326	54608	73726	72936	63264	76078
H	302	396	472	603	2482	2544	1928	2303	66673	64716	59918	65746

rawデータAve.

Cisplatin		
濃度	発光強度Ave. (-blank)	SD
0 μM	67846	5335
1 μM	74944	3381
10 μM	25480	3029
30 μM	650	139
100 μM	838	186

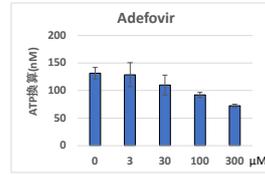
ATP補正値

Cisplatin		
濃度	ATP換算 (nM)	SD
0 μM	131	10
1 μM	145	7
10 μM	49	6
30 μM	1	0
100 μM	2	0



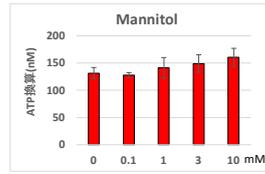
Adefovir		
濃度	発光強度Ave. (-blank)	SD
0 μM	67846	5335
3 μM	66495	11157
30 μM	56788	9341
100 μM	47531	2428
300 μM	37325	1461

Adefovir		
濃度	ATP換算 (nM)	SD
0 μM	131	10
3 μM	129	22
30 μM	110	18
100 μM	92	5
300 μM	72	3



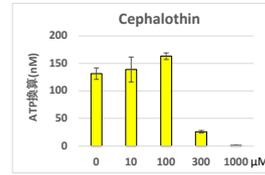
Mannitol		
濃度	発光強度Ave. (-blank)	SD
0 mM	67846	5335
0.1 mM	66134	2302
1 mM	72994	9638
3 mM	76954	8267
10 mM	82915	8608

Mannitol		
濃度	ATP換算 (nM)	SD
0 mM	131	10
0.1 mM	128	4
1 mM	141	19
3 mM	149	16
10 mM	160	17



Cephalothin		
濃度	発光強度Ave. (-blank)	SD
0 μM	67846	5335
10 μM	71811	11765
100 μM	84294	3076
300 μM	13406	1246
1000 μM	407	110

Cephalothin		
濃度	ATP換算 (nM)	SD
0 μM	131	10
10 μM	139	23
100 μM	163	6
300 μM	26	2
1000 μM	1	0



Vancomycin		
濃度	発光強度Ave. (-blank)	SD
0 mM	67846	5335
0.1 mM	73117	9035
1 mM	64476	8054
3 mM	66177	8980
10 mM	2278	240

Vancomycin		
濃度	ATP換算 (nM)	SD
0 mM	131	10
0.1 mM	142	17
1 mM	125	16
3 mM	128	17
10 mM	4	0

