

カインेटックスイメージングと エンドポイント生存率分析を用いた ハイスループット 3D 細胞培養アッセイの 最適化

画像および発光に基づく生存率定量による、3D 細胞培養モデルの
ハイスループット化に適した薬剤応答解析

著者

Ernest Heimsath, PhD,
Joe Clayton, PhD,
Agilent Technologies, Inc.

概要

3次元（3D）細胞培地モデルは、生理学的妥当性の高い組織特性をより忠実に再現できることから、創薬や新たな評価手法（New Approach Methodologies：NAM）ベースのワークフローで使用されることが増えています。これらのモデルを効果的に導入するには、形成、品質、薬剤応答を評価するための拡張性の高いメソッドが必要です。

このアプリケーションノートでは、HT-1080 スフェロイドモデルを用いたイメージング中心のワークフローについて説明します。Agilent BioTek Cytation 9 細胞イメージング・マルチモードプレートリーダーによる自動明視野/蛍光イメージングを使用して、3D モデル形成をモニタリングし、サイズと均一性を定量しました。Agilent eTox Red 染色を代表的な細胞死蛍光マーカーとして使用して、経時的な薬剤処理による細胞毒性を測定しました。続いて異なる原理の Promega CellTiter-Glo 3D Cell Viability Assay を実行して、ATP 量に基づいたエンドポイントでの細胞生存率を確認しました。

カインेटックスイメージングとエンドポイントの細胞生存率測定を組み合わせることで、モデル品質、経時的な応答、薬剤応答を関連付ける相補的情報を取得できます。これにより 3D 細胞培養モデルの拡張性の高い特性解析と最適化を実行し、NAM 関連のアッセイ開発に役立てることができます。

概要

スフェロイドやオルガノイドなどの 3D 細胞培養モデルは、従来の 二次元培養よりも、組織構造、細胞間の相互作用、微小環境の複雑さを正確に再現できます。その結果、3D 細胞培養モデルは、in vitro 研究の生理学的関連性を改善するためにがん研究、疾病モデルの構築、創薬で使用されることが増えています。^{1~6} またこれらのシステムは、動物試験への依存度低減しながら、生物学的予測性の向上を目指す NAM の導入拡大にも役立ちます。⁷

3D 培養モデルにはこのような利点がありますが、これを大規模なスクリーニングワークフローに実装するのは依然として困難です。再現性の高いスフェロイドの作成および維持には多大な労力を要することがあり、さらにその成長、成熟、処理応答の研究では、多くの場合、複数点のタイムポイントで測定を収集する必要があります。さらに、3D モデルのイメージングと定量分析では、フォーカス、コントラスト、セグメンテーション、ウェル間の一貫性に関する課題が生じる可能性もあります。これらの要因により、堅牢な取り込みおよび分析ワークフローがないと、スループットが低下し、アッセイの最適化が困難になる可能性があります。

自動イメージング手法では、3D 培養の形成、形態、生存率、処理応答をカイネティクス明視野および蛍光ベースでモニタリングできるため、これらの課題を解決できます。これらのワークフローを定量画像分析と組み合わせることで、スフェロイドのサイズ、均一性、真円度、コンパクション（細胞凝集に伴う緻密化）、蛍光強度を測定できます。これらのワークフローを自動インキュベーションおよびプレート処理と統合すれば、再現性が高く、手動操作の少ない長期間の実験に適した拡張性の高いフレームワークになります。

Cytation 9 細胞イメージング・マルチモードプレートリーダーでは、自動イメージング、マルチモード検出、定量分析の機能が 1 つのプラットフォーム内に統合されています。このアプリケーションノートでは、Cytation 9 を使用して 3 つの解析目標を検証しました。まず、カイネティクス、明視野、蛍光イメージングを使用して 3D モデルの形成をモニタリングし、アッセイの最適化に役立つ特性（サイズ、均一性、コンパクションなど）を評価しました。次に、自動蛍光イメージングで Agilent eTox Red 染色を代表的な細胞死マーカーとして使用して、薬剤処理による細胞毒性を定量しました。最後に、イメージング手法とは異なる直行的評価手法として CellTiter-Glo 3D Cell Viability Assay を用いて、代謝的に活性な細胞のエンドポイント指標である ATP 量を測定しました。これらの一連の手法を用いて、カイネティクスイメージングとエンドポイント生存率測定を組み合わせることで 3D 細胞培養モデルの特性評価、アッセイ開発の効率化、および NAM 関連研究のワークフローを支援できることが示された。図 1 に、3D モデルの形成とカイネティクスイメージングベースの特性解析から、処理応答のモニタリング、エンドポイント生存率の確認までの、統合ワークフローの概要を示しています。

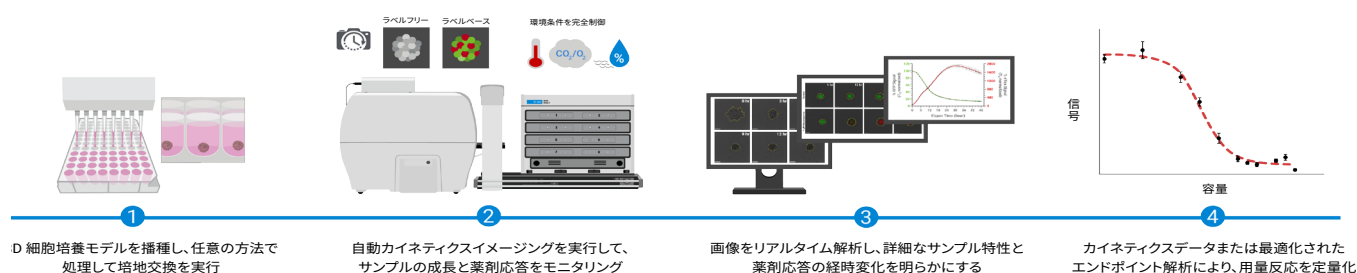


図 1. 3D 細胞培養モデルのカイネティクスイメージングおよび解析ワークフロー。サンプルを播種および処理し、環境を制御しながら自動カイネティクスイメージングでモニタリングし、リアルタイムで分析し、カイネティクスおよびエンドポイント用量反応測定を用いて定量しました。

実験

細胞株

HT-1080 線維肉腫細胞（部品番号 CCL-121）は、ATCC（マナサス、バージニア州、米国）から購入しました。核局在型 GFP 蛍光タンパク質（HT-1080-NLS-GFP）を安定して発現する派生細胞株は、アジレントの eLenti-Green（部品番号 8711010）を使用し、メーカーのガイドラインに従って作製しました。

3D モデルの形成

接着培養した HT-1080 細胞を、TrypLE Express（部品番号 12605036、Thermo Fisher Scientific、ウォルサム、マサチューセッツ州、米国）を用いて剥離し、300 × g で遠心分離して沈殿させてから、1X DPBS に再懸濁しました。細胞を、Nunclon Sphera 処理済みの Nunclon Sphera 96 ウェル U 底マイクロプレート（部品番号 174929、Thermo Fisher Scientific）に、 2×10^3 の細胞/ウェル密度で再播種し、スフェロイド形成過程をモニタリングしました。この代表的なスフェロイドワークフローを用いて、3D 細胞培養形成のカイネティクスイメージングベースの評価を実施しました。評価項目には薬剤処理試験前のアッセイのタイミングとモデル品質の最適化に使用できる、サイズ、均一性、コンパクション、関連特性の測定が含まれます。

薬剤処理

形成が完了したスフェロイドを Corning 96 ウェル丸底超低接着表面スフェロイドマイクロプレート（製品番号 4520）に移しました。このプレートはウェル底部の厚さが 87.5 µm で、イメージングアッセイに最適です。各ウェルに 250 nM の Agilent eTox Red 染色試薬（部品番号 8711009）と様々な濃度のスタウロスポリン（製品番号 1285、Tocris Biosciences）を含む培地を分注しました。本ワークフローでは蛍光細胞毒性評価試薬の例として eTox Red を選択していますが、画像取得および解析手法は、生存率、細胞死、あるいはその他の細胞健康性エンドポイント指標に対応する蛍光マーカーにも適用できるように設計しています。

画像取得

画像取得は、3D 細胞培養の特性評価を 2 段階で実施できるように構築しました。3D モデル形成の経時的なモニタリングとして、HT-1080-NLS-GFP モデルに対してラベルフリー明視野イメージングと蛍光イメージングを実施しました。明視野イメージングは、試薬を使用せずにスフェロイドの形成過程、サイズ、形態、コンパクションを経時的に評価するために用いました。一方、GFP 蛍光イメージングは、スフェロイド領域を明確に識別し、ウェル間における形成特性の比較をするラベルベースの評価手法として用いました。薬剤応答の解析では、GFP および CY5 蛍光チャンネルによる画像取得を行い、スフェロイドと eTox Red 染色をそれぞれモニタリングしました。ここで示されたチャンネル構成は、選択された GFP スフェロイド標識と eTox Red 細胞毒性試薬に対応するものです。適切な励起波長と発光波長を選択し、それに応じて解析ワークフローを調整することで、他の蛍光生存率や細胞状態のマーカーを組み込むことも可能です。画像

取得は、10 倍の 0.3 NA 対物レンズを搭載した Cytation 9 細胞イメージング・マルチモードプレートリーダーを用いて実施しました。経時的イメージングは、Cytation 9 と Agilent BioTek BioSpa 8 自動インキュベーターを連携させることで実現しました。これによりスケジュールに基づく培養と自動プレート搬送が可能となり、複数のタイムポイントでイメージングを実行しました。再現性の高い経時的な画像取得ができるように、各ウェルの高速な焦点合わせのためにレーザーオートフォーカスを採用しました。

画像解析

画像およびプレートリーダーベースの解析を実施して、3D 細胞培養モデルに関する 3 つの主要な特性カテゴリーを定量評価しました。第一の評価項目として、まず明視野画像と蛍光画像から、スフェロイドの形成過程とモデル品質を評価しました。明視野ベースのセグメンテーション解析を使用して、形態ベースの特性（経時的な投影面積、直径、真円度、コンパクション、ウェル間の均一性など）を定量しました。GFP 陽性スフェロイドの蛍光ベースのセグメンテーション解析は、スフェロイドのサイズと均一性のラベルベースの代替測定方法として使用できます。コントラストが高いため、代表的な HT-1080-NLS-GFP モデルでスフェロイドを同定できます。第二の評価項目として、次に実証済みの細胞死蛍光マーカーとなる eTox Red 蛍光を使用して、薬剤処理による細胞毒性を定量しました。蛍光画像を前処理してバックグラウンドを除去してから、GFP シグナルと eTox Red シグナルに対して独立した細胞解析を実行しました。eTox Red 蛍光を経時的な細胞死の指標として使用し、GFP シグナルに基づく初期のスフェロイド面積を用いてサイズごとの違いを補正しました。その後、面積を補正した eTox Red シグナルを、各タイムポイントでの対照群に対する倍率変化（fold change）に正規化しました。第三の評価項目として、CellTiter-Glo 3D Assay からのエンドポイント発光データを、ATP 量に基づくスフェロイド全体の細胞生存率情報として評価しました。これらのエンドポイント測定結果とカイネティクスイメージングデータを組み合わせることで、最終的な細胞生存率を、モデル形成の品質、初期のスフェロイドサイズ、均一性、薬剤応答の経時的な推移と関連付けて評価することが可能になりました。

エンドポイントプレートリーダー生存率アッセイ

カイネティクスイメージングの後に、直交的評価としてエンドポイントプレートリーダーベースのアッセイを用いて、薬剤処理による細胞毒性も評価しました。CellTiter-Glo 3D Assay を使用して、薬剤処理した 3D 細胞培養モデル中の代謝的に活性な細胞の指標として、発光により ATP 量を測定しました。このエンドポイント測定は経時的イメージングの後に実行したため、最終的な生存率情報をその前のカイネティクスイメージングデータ（スフェロイド形成品質、初期サイズと均一性、反応開始のタイミング、薬剤処理に依存する形態変化、蛍光細胞毒性シグナルなど）に関連付けて解釈することができました。

結果と考察

アッセイ最適化に向けた 3D 細胞培養モデル形成のカイネティクスモニタリング

明視野イメージングによる手法

ラベルフリーの明視野イメージングを使用して、3D 細胞培養モデルの形成過程を経時的にモニタリングするとともに、アッセイの最適化に関連する形態ベースの特性を定量しました（図 2）。代表的な HT-1080 スフェロイドワークフローでは、播種直後には分散していた細胞がウェル底部の比較的大きな投影面積を占めていました（図 2A）。細胞が融合、コンパクションするにつれて、明視野から算出された面積が減少し、その後安定化しました。これは、下流のアッセイに適した成熟スフェロイドが形成されたことを示しています。関連する明視野の画像およびグラフは、サイズ、形態、コンパクション、ウェル間の均一性の経時的な変化を示します（図 2B）。これらの測定結果は、薬剤処理を行う前に、どのウェルや培養条件がアッセイ実施基準を満たしているか特定するための、実用的な品質管理ステップとして利用できます。この手法の主な長所は、非侵襲的かつ試薬が不要であり、アッセイが複雑でなく、他の測定に利用するための蛍光チャンネルを確保できることです。主な短所は、この手法で得られるのが基本的に形態情報であるため、これだけでは生存細胞と非生存細胞を直接区別したり、特定の分子や細胞の表現型を特定したりすることはできないということです。

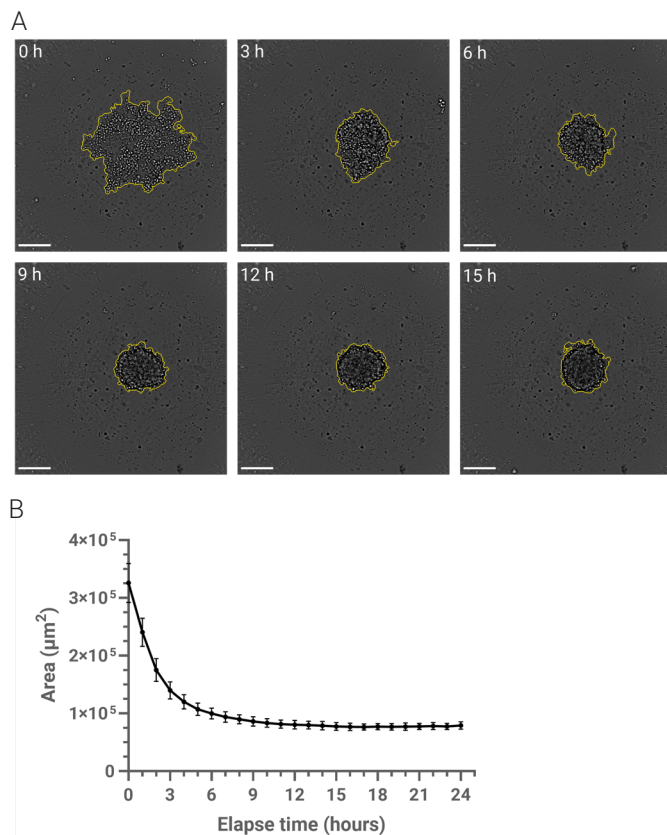
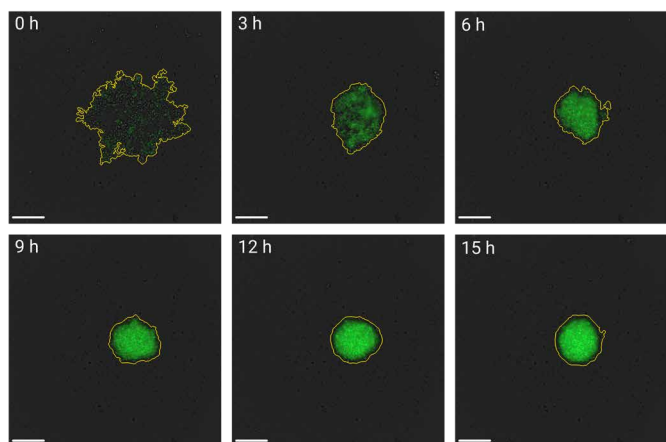


図 2.3D 細胞培養モデルのラベルフリーのカイネティクスモニタリング (A) 96 ウェル U 底マイクロプレートの底に沈降している HT-1080 細胞のスフェロイド形成のタイムラプス。スケールバー = 200 μm。(B) 明視野シグナルに基づくスフェロイド面積の定量。面積 (μm²) とエラーバー（標準偏差）は、96 ウェルマイクロプレート全体のすべてのスフェロイドから算出しています（n = 96）。

A



B

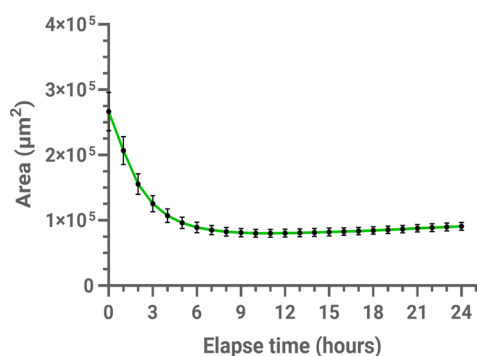


図 3.3D 細胞培養モデルの蛍光ベースのカイネティクスモニタリング。(A) 96 ウェル U 底マイクロプレートに沈降している、核局在型 GFP を発現する HT-1080 細胞のスフェロイド形成のタイムラプス。スケールバー = 200 μm 。(B) GFP 蛍光シグナルに基づくスフェロイド面積の定量。平均面積 (μm^2) とエラーバー (標準偏差) は、96 ウェルマイクロプレート全体のすべてのスフェロイドから算出しています ($n = 96$)。

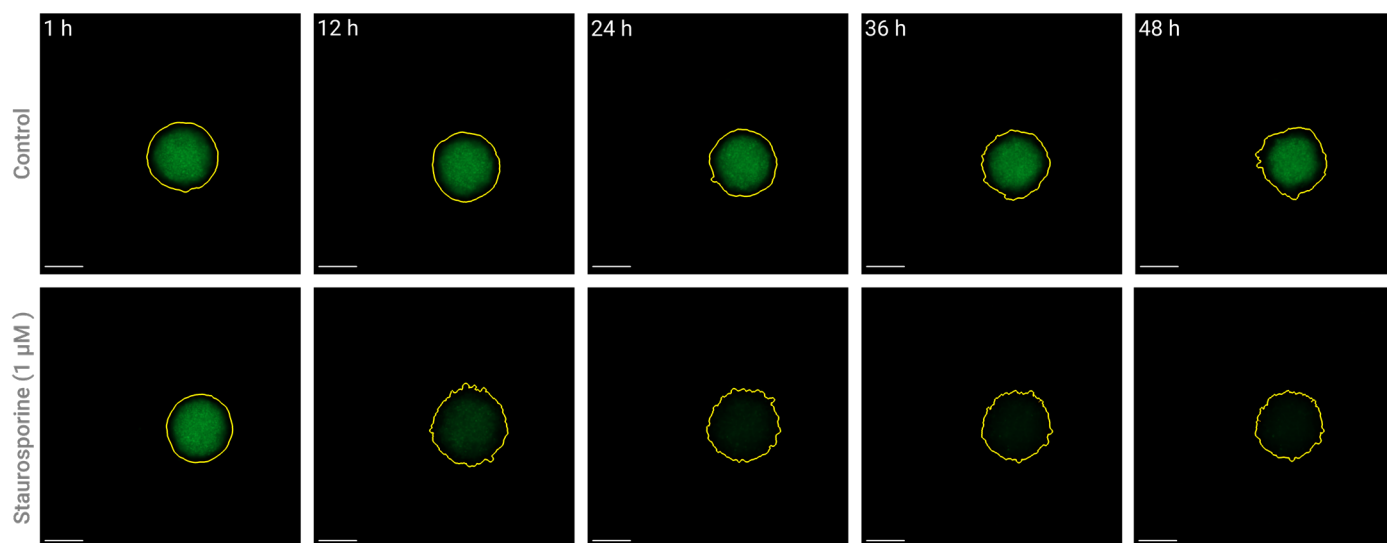
蛍光標識を用いたイメージング手法

蛍光標識ベースのイメージングは、3D モデルの形成と均一性を定量するための補完的な方法です (図 3)。HT-1080-NLS-GFP モデルでは、核局在型 GFP によってスフェロイドを蛍光ベースで特定し、スフェロイドの面積、サイズ分布、形成中のウェル間の一貫性 (図 3B) を測定できました。この手法は、自動解析ワークフローにおいて、明視野のコントラストが低い場合に被写体の鮮明度を上げ、スフェロイドの輪郭の認識の安定性を向上させることができます。そのため、蛍光標識によるスフェロイド評価は、プレート全体の統計解析、反復実験間の比較、ならびに後続の薬剤応答試験に適した十分に再現性の高いモデルが形成されているかの確認に利用できます。この手法の主な長所は、蛍光標識されたスフェロイドのコントラストと認識の特異性が上がることです。短所は、適切な蛍光標識や遺伝子改変細胞モデルが必要であることです。そのため、すべての 3D 培養系に適しているわけではありません。また蛍光チャネルを使用するため、機能解析用のチャネルを消費してしまうことが挙げられます。

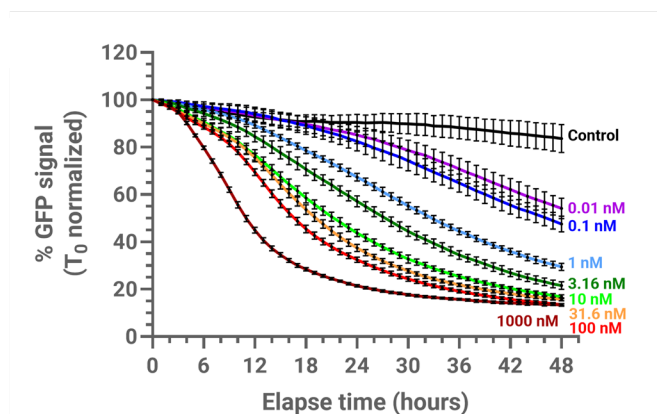
蛍光標識に基づく薬剤誘導性細胞毒性と生存率応答の定量解析

スフェロイド形成条件の確立後、自動カイネティクス蛍光イメージングを用いて、薬剤誘導性細胞毒性を定量的に評価しました。十分に形成された HT-1080 スフェロイドを、eTox Red 染色試薬存在下でスタウロスポリン処理しました。eTox Red により膜の完全性が損なわれている細胞内の核が選択的にラベル化されるため、細胞死を特定できます。スタウロスポリン処理により、内因性 GFP シグナルが濃度依存で低下しました (図 4A および B)。24 時間時点における EC_{50} は 2.7 nM でした (図 4C)。一方 eTox Red シグナルは、スタウロスポリン処理により濃度依存で増大しました (図 5)。

A



B



C

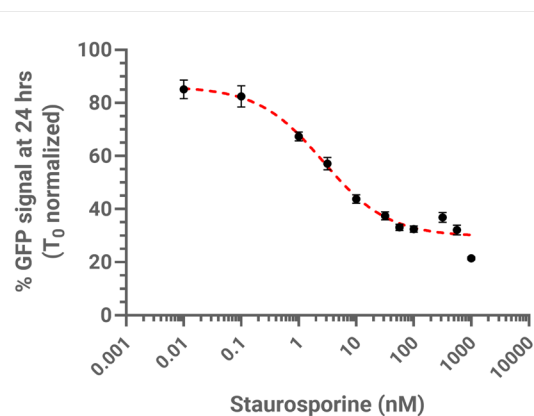
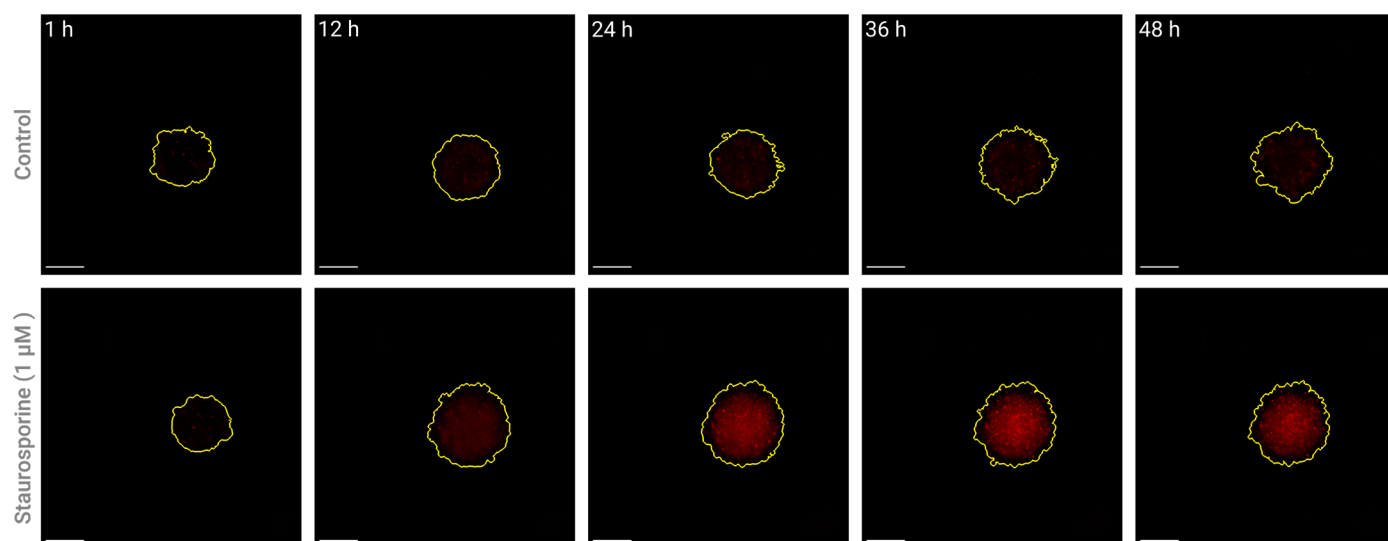


図 4. 内因性 GFP 発現を用いた薬物誘発毒性のカイネティクス定量。(A) HT-1080-NLS-GFP スフェロイドのタイムラプス画像。溶媒対照群（上段）と 1 μ M のスタウロスポリン処理群（下段）スケールバー = 200 μ m。対照群では GFP 蛍光シグナルが維持されていますが、スフェロイドがスタウロスポリンに曝露されると消失します。スケールバー = 200 μ m。(B) (A) (黄色の輪郭) に基づく蛍光シグナルのセグメント化したマスクを使用して、スタウロスポリンにより誘発される内因性 GFP シグナルを定量したところ、用量に依存することが示された (B)。24 時間までの EC_{50} は 2.7 nM です。

A



B

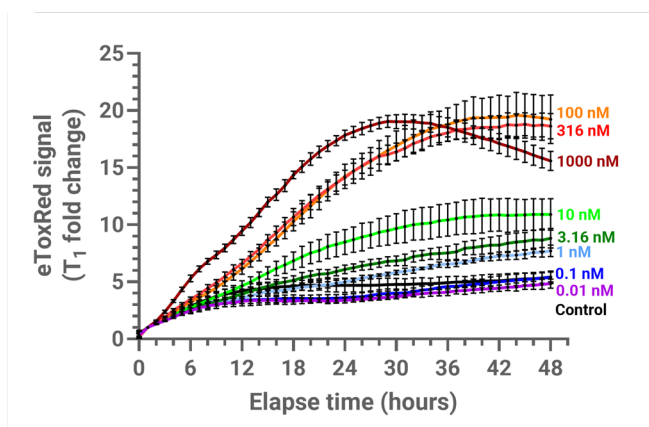
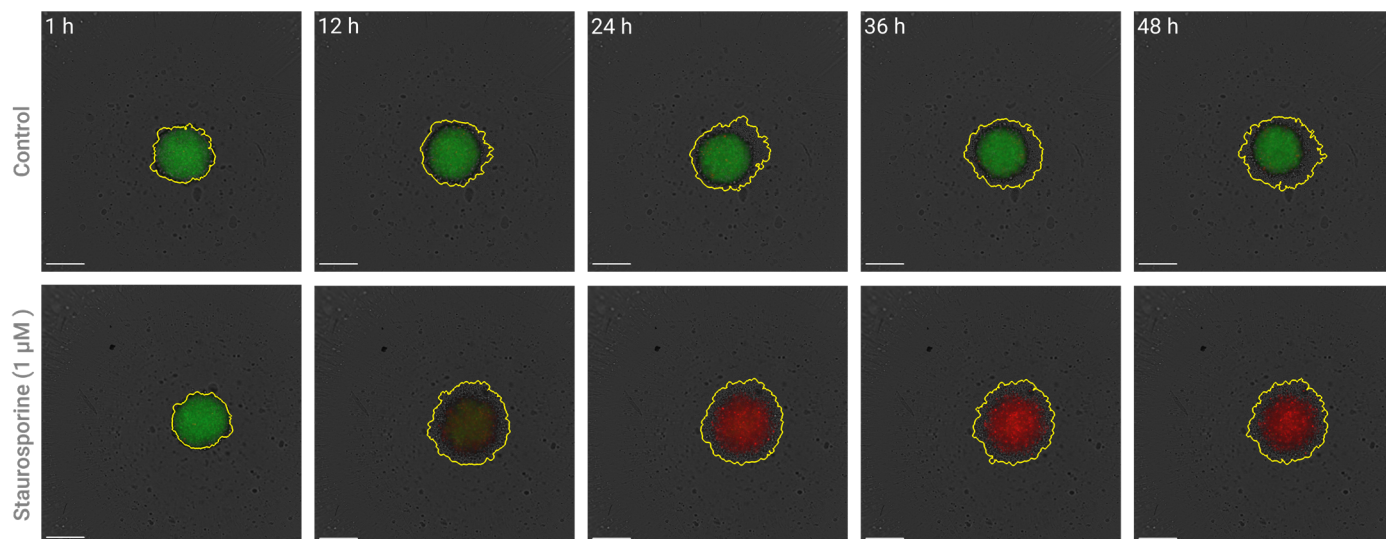


図 5. eTox Red (生体毒性蛍光染料) を用いた薬剤誘導性細胞毒性の経時的定量解析。(A) HT-1080-NLS-GFP スフェロイドのタイムラプス画像。対照群 (上段) と 1 μ M のスタウロスポリン処理群 (下段)。1 μ M のスタウロスポリンで処理したスフェロイドと比べて、対照群では eTox Red シグナルが基底レベルで維持されています。スケールバー = 200 μ m。(B) (A) の画像に基づく蛍光シグナルのセグメント化したマスク (黄色の輪郭) を使用して、スタウロスポリンにより誘発される eTox Red シグナルを定量したところ、用量に依存することが示された (B)。

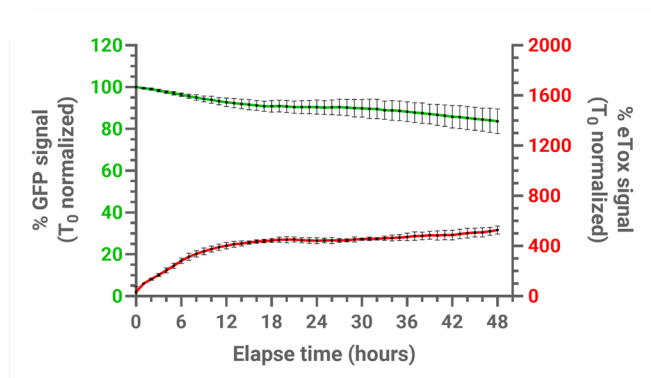
図 6 のとおり、スタウロスポリン処理により誘発される傾向は、カイネティクス GFP シグナルと eTox Red シグナルで逆になります。この 2 種類の蛍光インジケータ間の関係は、比率 (eTox Red:GFP) として表すことができます。ここではそれを Toxicity Index と定義しました。

eTox Red シグナルと同様に、スタウロスポリン処理により Toxicity Index が濃度依存で増加し (図 7A)、 EC_{50} は 20.9 nM でした (図 7B)。

A



B



C

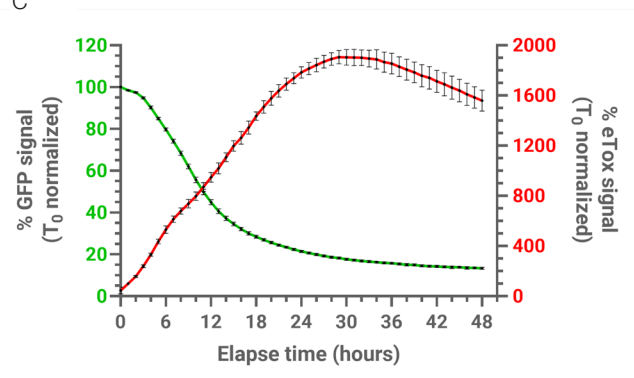
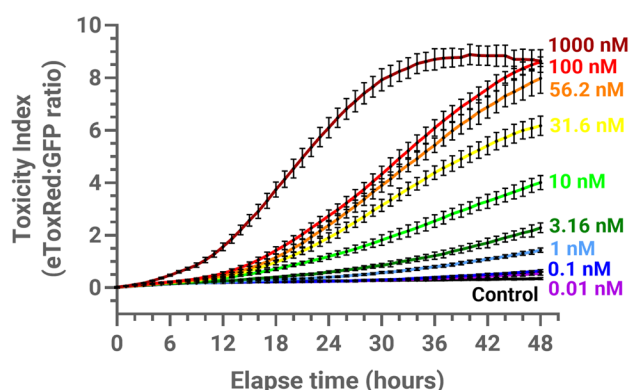


図 6. 内因性発現シグナルと細胞毒性蛍光色素の経時反応プロファイルの比較。(A) HT-1080-NLS-GFP スフェロイドのタイムラプス画像。対照群処理 (上段)、または 1 μ M のスタウロスポリンの存在下 (下段) では、内因性 GFP シグナル (緑) が eTox Red シグナル (赤) と重なっています。スケールバー = 200 μ m。対照群 (B)、または 1 μ M のスタウロスポリン処理群 (C) における両方蛍光シグナルの経時的変化の定量結果は、薬剤処理に対する応答として、内因性「生存率」GFP シグナルと eTox Red 細胞毒性シグナルの間に逆のカイネティクスな関係があることを示しています。

この手法は、定量的且つ時間分解能のある情報を提供できる点が特徴であり、初期スフェロイドサイズで正規化することも可能である。さらに生物学的課題（膜の完全性、生細胞シグナル、アポトーシス、代謝活性、その他の生存率関連のエンドポイントなど）に応じてさまざまな蛍光マーカーにも適用できます。一方、その短所はマーカーごとに異なります。蛍光試薬を添加するとアッセイ依存の制約が生じる可能性があり、測定結果が色素の浸透性、光学シグナル減衰、被験化合物の自家蛍光、マーカーのメカニズム、さらには選択したエンドポイントでは捕捉されない薬剤応答の影響を受ける可能性があります。このワークフローは HT-1080 スフェロイドと eTox Red を用いて実証されたが、適切な蛍光ベースの生存率、細胞毒性、細胞状態などの評価系を組み込むことで、様々な 3D 細胞培養モデルやスフェロイドに幅広く適用できます。このような汎用性は NAM を重視したワークフローにとって重要です。なぜなら 1 つの単体の試薬やエンドポイントに依存することなく、同じ解析フレームワークを用いて、モデルの適格性評価、薬剤応答の特性解析、および生物学的に関連性の高いアッセイ条件の比較に対応できるためです。

A



B

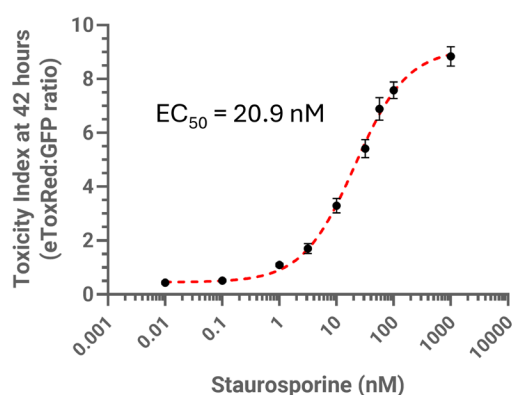


図 7. Toxicity Index は、生存率（GFP）シグナルと細胞毒性（eTox Red）シグナルの間の関係を示します。(A) HT-1080-GFP スフェロイドにおける Toxicity Index（eToxRed シグナルと内因性 GFP シグナルの比率）の経時変化。スタウロスポリンの濃度の増加に伴い、Toxicity Index は上昇した。(B) Toxicity Index に基づく 24 時間時点でのスタウロスポリン用量反応応答解析の定量化。EC₅₀ は 20.9 nM。

CellTiter-Glo 3D によるプレートリーダーを用いた、直交的エンドポイント定量評価

経時的イメージングワークフローを補完するため、24 時間時点で、CellTiter-Glo 3D Assay を用いて直交的なエンドポイント生存率アッセイを実行しました（図 8）。このアッセイは、代謝活性のある細胞を発光シグナルとして、ATP 量を測定するものであり、アッセイは 3D 培養モデル用に最適化されています。スタウロスポリン処理により、ATP シグナルが濃度依存的に低下し、IC₅₀ は 3.8 nM でした。これは蛍光イメージングで見られた細胞毒性効果と一致します。

CellTiter-Glo 3D Assay の主な長所は、全体的な生存率を高い感度と拡張性で簡単に測定できることです。そのため、スクリーニングアプリケーションに最適です。ただし、エンドポイントのバルク測定では、形態、シグナルの空間的分布、薬剤応答のタイミングに関する情報は取得できません。そのため、ATP に基づく細胞生存率測定は、モデル品質と薬剤処理関連の変化に関する追加情報と組み合わせることで、最も豊富な情報を取得できます。

今回のワークフローでは、3D 細胞培養モデルでの処理効果を確認するための直交的なエンドポイント生存率アッセイとして、CellTiter-Glo 3D Assay を使用しています。

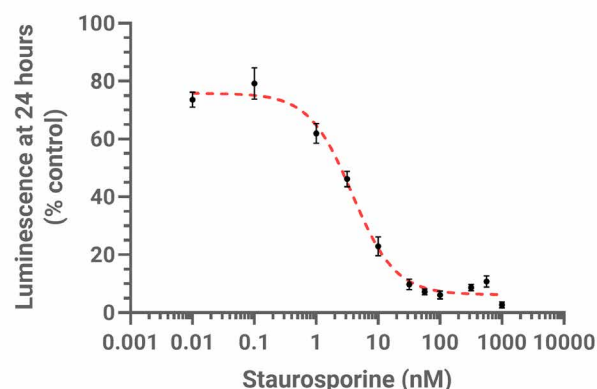


図 8. CellTiter-Glo 3D Assay を用いた 3D 細胞培養モデルにおける薬剤応答の定量評価。HT-1080-GFP スフェロイドを様々な濃度のスタウロスポリンに 24 時間暴露した後、CellTiter-Glo 3D による発光シグナルを定量した。IC₅₀ は 3.8 nM

結論

本研究では、Agilent BioTek Cytation 9 細胞イメージング・マルチモードプレートリーダーを用いた、3D 細胞培養モデルの特性解析と最適化のためのイメージング中心のワークフローを紹介しました(表 1)。経時的な明視野、蛍光イメージングを用いて、サイズ、形態、コンパクション、均一性などの特性を経時的に測定することで、モデル形成を定量的に評価することができました。これによりアッセイの最適化や、アッセイに適した条件を確立するための客観的な指標が得られました。さらに、カイネティクス蛍光イメージングは、薬剤処理によって誘発される効果の時間分解特性解析に対応しています。そのため、同じ実験ワークフロー内で毒性反応と薬剤応答を定量的に評価できます。

CellTiter-Glo 3D Assay では ATP 量に基づく細胞生存率を評価するための直交的エンドポイント測定を実施しました。これは、イメージングで取得した情報が、下流の解析結果の解釈強化にどのように役立つかを示す代表例です。カイネティクスイメージングでは、薬剤処理前にモデル品質を確立し、生物学的反応の発現と進行を捕捉できるため、エンドポイント測定だけでは取得できない重要な情報を得ることができます。

これらの手法を組み合わせることで、イメージングを 3D 細胞培養ワークフローの基本的な分析ツールとして活用でき、アッセイ開発と処理応答の特性解析だけでなく、エンドポイント生存率アッセイの解釈やその他の補完的分析プラットフォームへの情報提供にも対応できます。この統合型戦略は、スフェロイド、オルガノイド、およびその他の高度な 3D 細胞培養モデルを用いた NAM 関連研究や創薬アプリケーションの実用的なフレームワークを提供します。

表 1.画像および発光ベースの 3D 細胞培養ワークフロー手法

ワークフローの目的	手法	主な測定	長所	短所
3D 細胞培養形成の カイネティクスモニタリング	ラベルフリーの明視野イメージング	投影面積、直径、形状、コンパクション、 ウェル間の均一性	非侵襲的、試薬が不要、実施が容易、 アッセイ準備の QC や最適化に最適	主に形態ベースであり、生存率や特 定の表現型を直接測定するものでは ない
3D 細胞培養形成の カイネティクスモニタリング	蛍光ラベルベースのイメージング	蛍光により輪郭が定義されたスフェロイド の面積、サイズ分布、均一性	コントラストが高く、スフェロイドの輪 郭が明確に表示されるため、自動セ グメンテーション、リプリケート間比 較、プレートレベルでの統計解析が 容易	適切な蛍光標識や遺伝子改変細胞モデ ルが必要で、蛍光チャネルを使用する
薬剤誘導性細胞毒性または細胞生存率応答 の定量評価	Agilent eTox Red による蛍光標識 イメージング	面積で正規化した経時的な蛍光生 存率、細胞毒性、または細胞健全性 シグナル	適合する蛍光マーカーやエンドポイン ト特異的なアッセイ設計に適用でき る、定量的なカイネティクス情報を提 供する。	マーカーの選択と検証が必要。試薬 の浸透性、光シグナルの減衰、化合 物の自家蛍光、またはエンドポイン ト固有の生物学的限界により影響を 受ける可能性がある
直交的エンドポイント 生存率確認	プレートリーダーベースの CellTiter- Glo 3D 発光アッセイ	代謝活性のある細胞を表すエンドポ イントの ATP ベースの細胞生存率 シグナル	イメージングによるカイネティクスお よび形態情報を補完する、シンプル で拡張性の高い、高感度なバルク生 存率情報	エンドポイントで破壊的なため、空 間的情報、形態、反応タイミングを 取得できない

参考文献

1. Hirschhaeuser, F.; Menne, H.; Dittfeld, C.; West, J.; Mueller-Klieser, W.; Kunz-Schughart, L. A. Multicellular Tumor Spheroids: An Underestimated Tool is Catching Up Again. *J Biotechnol* **2010**, 148(1):3-15. DOI: doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.01.012
2. Nath, S.; Devi, G.R. Three-Dimensional Culture Systems in Cancer Research: Focus on Tumor Spheroids Model. *Pharmacol Ther* **2016**, 163:94–10. DOI: doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.03.013
3. Thoma, C. R.; Zimmermann, M.; Agarkova, I.; Kelm, J. M.; Krek, W. 3D Cell Culture Systems Modeling Tumor Growth Determinants in Cancer Target Discovery. *Adv Drug Deliv Rev* **2014**, 6(9–70):29–41. DOI: doi.org/10.1016/j.addr.2014.03.001
4. Friedrich, J.; Seidel, C.; Ebner, R.; Kunz-Schughart, L. A. Spheroids-Based Drug Screen: Considerations and Practical Approach. *Nat Protoc* **2009**, 4:309-324. DOI: doi.org/10.1038/nprot.2008.226
5. Wang, Y.; Jeon, H. 3D Cell Cultures Toward Quantitative High-Throughput Drug Screening. *Trends Pharmacol Sci*.**2022**, 43(7):569-581 DOI: doi.org/10.1016/j.tips.2022.03.014
6. Liang, Z.; Aslam, M.; Haq, W. U. I.; Wiesler, M.; Mutlu, S. N.; Stahlhut, P.; Verma-Fuehring, R.; Zahn, I.; Paulsen, F. P.; Groll, J. et al. A High-Throughput 3D Conjunctival Spheroids Model for Standardized In Vitro Testing. *Sci Reports* **2026**, 16(23101). DOI: doi.org/10.1038/s41598-026-63887-0
7. United States Food and Drug Administration. New Approach Methodologies. [New Approach Methodologies \(NAMs\) | FDA](#)

このアプリケーションで使用された製品

アジレント製品

BioTek Cytation 9 細胞イメージング・

マルチモードプレートリーダー 

その他の製品

Promega CellTiter-Glo 3D Cell Viability Assay

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、
医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。
本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに
変更されることがあります。

DE-016962

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2026
Printed in Japan, August 10, 2026
5994-9400JAJP

