

# OrganoPlate<sup>®</sup>を用いて培養したCaco-2細胞の 管状構造を3Dイメージングで捉える ～最適なZスタック撮影～

薬剤開発のプロセスにおける薬物動態試験（透過、吸収、輸送等）において、ヒト結腸癌由来細胞株であるCaco-2細胞が広く利用されている。従来のセルカルチャーインサート等を利用した単層培養の手法に比べて、MIMETAS社の3D組織培養プラットフォームであるOrganoPlate<sup>®</sup>を利用すると、より生体に近い環境を再現した試験が可能なが知られている。また、透過性試験において細胞のバリア機能を評価する際には、タイトジャンクションのマーカーであるZO-1の発現状態を確かめることが必要であり、共焦点顕微鏡を用いた適切な3次元観察が重要となる。本アプリケーションノートでは、OrganoPlate<sup>®</sup>上に培養したCaco-2細胞の、共焦点レーザー顕微鏡システムAX/AX Rを用いたイメージング手法について紹介する。

キーワード：3D組織培養、Caco-2、共焦点顕微鏡、Z intensity correction

## 実験の概要

3D組織培養プラットフォームOrganoPlate<sup>®</sup>（製造元：MIMETAS）は、マイクロ流路を用いた灌流により、共培養や、管状構造を持つ組織の作製、生体に近い微小環境の再現が可能なシステムである。OrganoPlate<sup>®</sup> 3-lane 40は、1つのゲル導入用レーンと2つの灌流用レーンを持つ40個の組織培養チップで構成される（図1）。

中央のチャンネルにゲルを導入後、上部のチャンネルにCaco-2細胞を播種し、OrganoFlow<sup>®</sup>を使用してCO<sub>2</sub>インキュベーター内で灌流培養し、管腔構造を形成した（図2）。

顕微鏡：AX/AX R

対物レンズ：CFI Apochromat LWD Lambda S 20XC WI (NA 0.95) (図3)、CFI Plan Apochromat Lambda S 25XC Sil (NA 1.05) (図4)

図1.

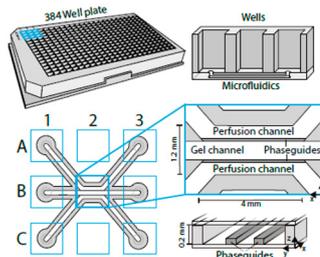
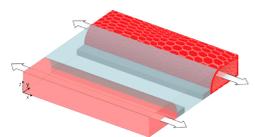


図2.



## 管腔構造の3次元観察

共焦点レーザー顕微鏡システム AX/AX Rおよび20倍水浸対物レンズを用いると、OrganoPlate<sup>®</sup> 3-lane 40に播種されたCaco-2の管腔構造を正確に捉えることができる（図3A, B）。また、3D空間における任意の視点から各マーカーの局在を確認できる。例えば、Caco-2細胞とゲルの界面において、タイトジャンクションのマーカーであるZO-1の局在の確認が可能である（図3C）。

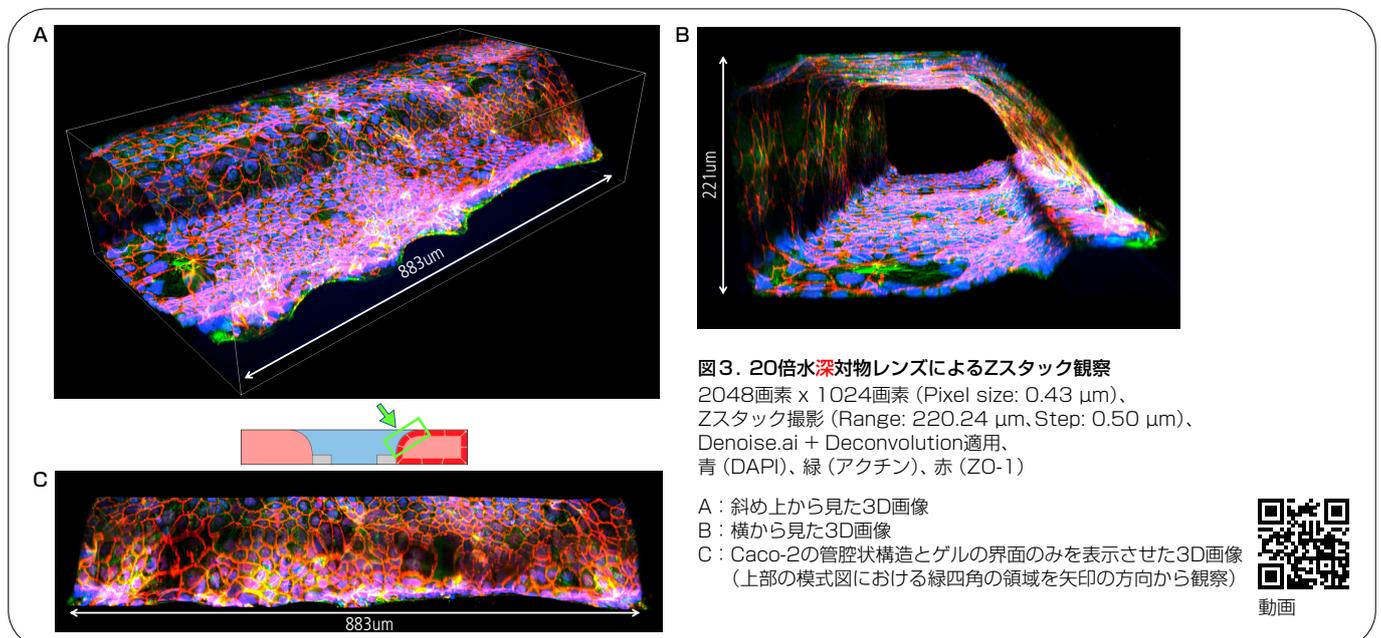


図3. 20倍水深対物レンズによるZスタック観察

2048画素 x 1024画素 (Pixel size: 0.43 μm)、Zスタック撮影 (Range: 220.24 μm, Step: 0.50 μm)、Denoise.ai + Deconvolution適用、青 (DAPI)、緑 (アクチン)、赤 (ZO-1)

A : 斜め上から見た3D画像

B : 横から見た3D画像

C : Caco-2の管腔状構造とゲルの界面のみを表示させた3D画像 (上部の模式図における緑四角の領域を矢印の方向から観察)



動画

## Zスタック撮影の設定

OrganoPlate®で培養した組織について良質な3次元画像データを取得するには、Z軸位置に応じて最適な明るさに撮影条件を調整できるZ intensity correctionの機能が有用である。「管腔構造の最上部（最深部）に合わせて固定した撮影条件」と、「Z intensity correctionを利用して段階的に調整した撮影条件」について、取得された共焦点画像を比較したところ、前者の条件ではMIP画像や管腔構造の下部を撮影した共焦点画像において輝度が飽和した。一方、後者の条件では輝度が飽和することなく良質な画像を取得できることが確認できた（図4）。

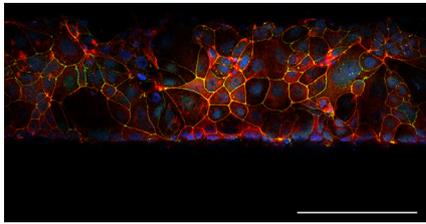
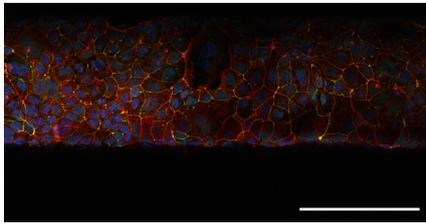
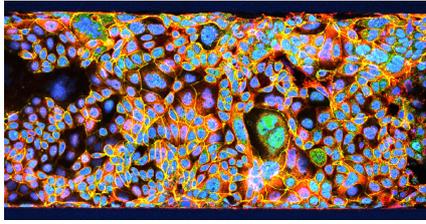
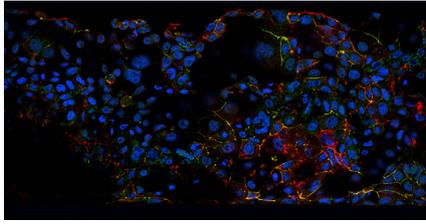
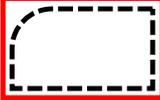
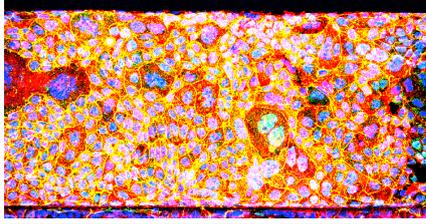
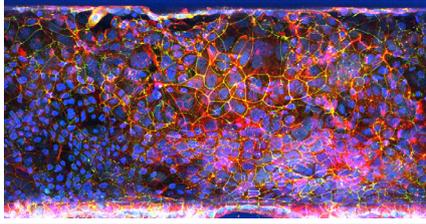
	最上部のZ位置に合わせて固定した撮影条件	Z intensity correctionによる各Z位置に最適な撮影条件
		
管腔構造の最上部の共焦点画像 		
管腔構造の中間部の共焦点画像 		
管腔構造の最下部の共焦点画像 		
管腔構造全体のMIP画像 		

図4. 25倍シリコンオイル浸対物レンズによるZスタック撮影条件の比較

1024画素 x 1024画素 (Pixel size: 0.69 μm)、Zスタック撮影 (Range: 250 μm, Step: 0.70 μm)、Denoise.ai + Deconvolution適用、青 (DAPI)、緑 (ZO-1)、赤 (アクチン)、スケールバー: 200 μm、MIP画像についてコントラスト調整を実施

## まとめ

MIMETASのOrganoPlate®を利用して培養したCaco-2細胞の組織を、共焦点レーザー顕微鏡システムAX/AX Rを用いて最適なZスタック撮影条件でイメージング可能であることが確認できた。

## 製品情報

# MIMETAS

## OrganoPlate® 3-lane 64

(Product code: 6405-400-B 製造元: MIMETAS)

OrganoPlate® 3-lane 64は、64個の独立したチップ内にゲル導入用と2つの灌流用の合計3つのレーンが構成されています。OrganoPlate® 3-lane 64は自動化ワークフローに最適化されているためデータの再現性を向上させることができます。上・内皮細管のApicalとBasal側からアクセスできるため毒性スクリーニングを目的としたバリアアッセイや輸送試験などに利用することができます。



製品に対するお問い合わせ：  
ミメタスジャパン株式会社



## 共焦点レーザー顕微鏡システム AX/AX R



AX/AX Rは、従来機比4倍の8K x 8K画素の高解像度画像を実現。対角25 mmの広視野でサンプルの広範囲を一度に撮影でき、光毒性を低減します。AX Rのレゾナントスキャナーは、2K x 2Kの高解像度を実現。毎秒720フレーム (2048 x 16画素) の高速取得により、生きたサンプルの変化や反応を逃さず捉えます。

