CellSeed
Regenerate the Future

cellZscope™による HUVEC を用いた血管内皮透過性評価

上皮及び内皮細胞の細胞層は、タイトジャンクションを構成要素とするバリア機能を持っています。近年、薬物や毒素などが、このバリア機能に与える影響を調べる研究が盛んです。特に、細胞層のバリア機能と電気抵抗（TER）には強い相関関係が見られ測定として有用です。

目 的

水腫性変化などの毒性反応を*in vitro* で評価する方法として、薬剤（陽性対照として IL-1β）がヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）の透過性に与える影響を **cellZscope™** により測定する

材 料

- HUVEC（倉敷紡績株式会社、Cat No. KE-4109P10）
- 培地；HuMedia-EG2（倉敷紡績株式会社、Cat No. KE-2150S）
- ラット尾コラーゲン I（CORNING、Cat No. 354236）
- 0.02N 酢酸
- D-PBS
- TrypLE™ Express Enzyme（ThermoFischer、Cat No. 12604013）
- セルカルチャーインサートコンパニオンプレート（24 well プレート、Falcon、Cat No. 353504）
- カルチャーインサート（ポアサイズ 0.4μm、24 well タイプ、Falcon、Cat No. 353095）

方 法

Day 1

1. コンパニオンプレートにカルチャーインサートをセットする
2. カルチャーインサートに 0.02N 酢酸で希釈した 50μg/mL のコラーゲン I を 100μL 加え、1 時間静置することでコラーゲンコートを行う
3. コンパニオンプレートに培地を 750μL 加える
4. 必要な細胞数が獲得できるまで事前に培養しておいた HUVEC を PBS で 2 倍希釈した TrypLE Express Enzyme で細胞が剥がれるまで処理し、細胞を回収する
5. 培地を用いて、細胞の濃度を 6.0×10^4 cells/125μL に調製し、カルチャーインサートに加える
6. reference 用のカルチャーインサートには培地のみを 125μL 加える
7. インキュベーター（37℃、5% CO_2）内で 3 時間培養し、細胞が接着しているのを確認した後、カルチャーインサートの培地を交換する (この段階でほぼ confluent である)
8. インキュベーターで一晩培養する

Day 2

9. **cellZscope™** のセルモジュール本体に下部電極（ポット）をセットし、リッドに上部電極（スタンプ）がついたバーをセットする Ⓐ
10. ポットに培地を 800μL 加える
11. カルチャーインサートの培地を交換し（新しい培地は 400 μ L 加える）ポットにセットするⒷ
12. リッドをセルモジュールに被せ、test run を行うⓒ
13. **cellZscope™** をインキュベーターに静置し、48 時間以上培養する
14. 測定を 1 時間ごとに行い、波形が安定するのを確認する（HUVEC は confluent 後 48 – 72 時間でタイトジャンクションを形成し、TER 値が最大となる）1

ここがポイント!

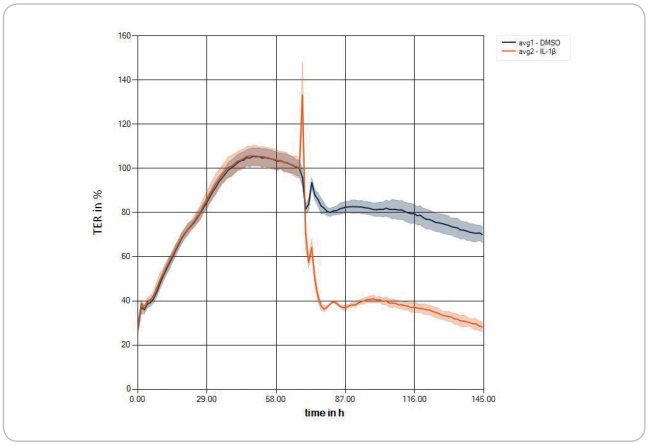
Ⓐスタンプが緩んでいないかを確認する
また、バーがリッドにきちっとはまっているかを確認する
Ⓑカルチャーインサートとポットの間に泡が入っていないかを確認する
ⓒ test run を行うことで、予め全てのカルチャーインサートで抵抗値が測定できているかを確認できる
スタンプの締めが緩いと、抵抗値が上手く測定できないことがある

Day 4

15. 薬剤が評価曝露濃度の 1000 倍の濃度になるよう DMSO で溶解し、培地に DMSO の終濃度が 0.1% になるように添加する（陽性対照である IL-1β は 20ng/mL になるように培地に添加する）
16. 0.1%DMSO 含有培地も調製する
17. ポットにセットされていたカルチャーインサートをコンパニオンプレートに移動させる
18. ポットの培地をアスピレーターで取り除き、0.1% DMSO 含有培地を 800µL 加える
19. 処理群のカルチャーインサートに薬剤もしくは IL-1β 含有培地を、溶媒対照と reference 群のインサートには 0.1% DMSO 含有培地を 400µL ずつ加える
20. カルチャーインサートをポットへ戻し、リッドをセルモジュールに被せ、test run を行う
    インキュベーターで 24-72 時間培養しながら測定を 1 時間ごとに行う

結果と考察

上記の方法に従って培養を行い、カルチャーインサート内に IL-1β 含有培地を添加しTER の測定を行った
その結果、IL-1β 処理群では溶媒対照群と比較て、HUVECの TER 値が顕著に低下することが認められた
IL-1β は炎症性サイトカインの 1 つであり、炎症反応は血管内皮の透過性を亢進することが報告されている 2
この結果は、IL-1β が HUVEC のタイトジャンクション構造に作用することで、その透過性を亢進させたことを示唆しており、同様の作用を有する薬剤の評価に**cellZscope™** による HUVEC を用いた TER 測定が有用であることを示している



【謝辞】
今回、第一三共株式会社　安全性研究所　第IVグループ　藤本和則様、長谷川智子様、山下ゆかり様より、ご寄稿頂きました。

参考文献

1. Kluger MS et al., *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33(3):489-500.
2. Fahey E and Doyle SL, *Front Immunol*. 2019;10:1426

第一三共株式会社
安全性研究所　第IVグループ
藤本 和則（右）
長谷川 智子（左）
山下 ゆかり（中央）

販売代理店

販売代理店

CellSeed
Regenerate the Future

株式会社セルシード
〒135-0064　東京都江東区青海 2-5-10　テレコムセンタービル東棟 15F
Email：sales.ccw@cellseed.com　URL：www.cellseed.com

OIC19-004-02

本紙内容は予告なしに変更される場合がございますのでご了承ください。