



Application

HUVEC (ヒト臍帯静脈内皮細胞) の灌流 (perfusion) アッセイおよび免疫蛍光染色による細胞観察

製品名

ibidi Pump System (ibidiポンプシステム)

メーカー名

ibidi 社

はじめに

HUVEC (ヒト臍帯静脈内皮細胞) などの内皮細胞は、灌流 (perfusion) 培養によりシェアストレス (ずり応力/剪断応力) を与えると、一般的な静置培養と比較して、より生体内に近い細胞形態や細胞応答を示します。

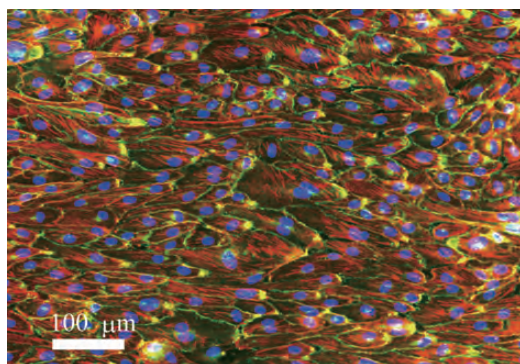
そこでibidi社では、よりin vivo に近い環境で長期間の灌流実験を可能とする独自のibidiポンプシステムを開発しました。

本システムは、ibidi社チャンネルスライド内の細胞にかかるシェアストレス (dyn/cm²) が付属の専用ソフトウェアで自動計算されるため、通常のポンプと異なり、流速値 (ml/分) ではなくシェアストレス値 (dyn/cm²) で条件設定することが可能です。

また、使用するibidi社チャンネルスライドは、そのまま免疫蛍光染色による高解像度細胞観察に使用することも可能です。

本アプリケーションノートのデータにつきましては、岡山大学大学院 医歯学総合研究科 システム生理学 森松 賢順様のご厚意により掲載させていただきました。

ここに深く感謝申し上げます。

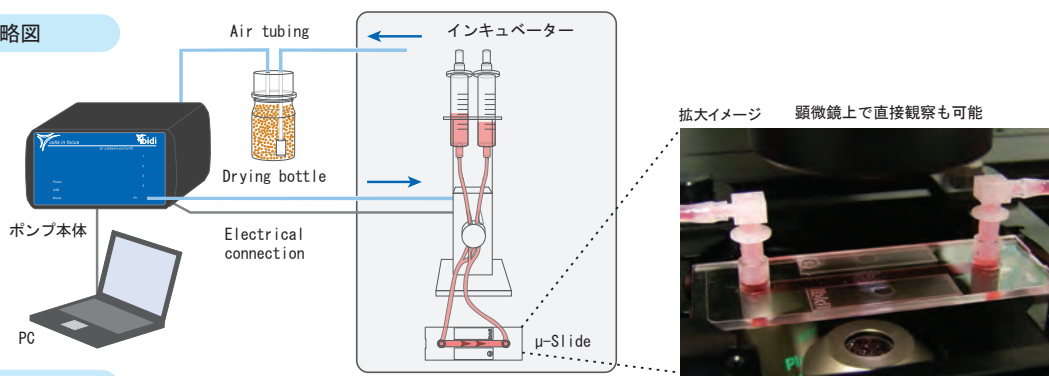


灌流培養により、シェアストレスをかけた細胞の免疫蛍光染色結果

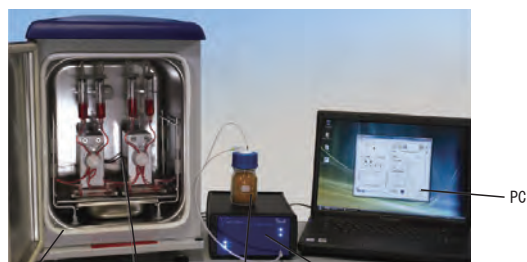
実験条件

- 細胞名 : HUVEC (ヒト臍帯静脈内皮細胞, Passage 5)
- 灌流培養システム : ibidiポンプシステム (ibidi社)
シェアストレス設定 : 2 dyn/cm² 30min → 5 dyn/cm² 30min → 10 dyn/cm² 48 hr.
- 培養容器 : μ -Slide I Luer 0.6, ibiTreat (ib80186 ibidi社)
- 培地 : HuMedia-EG2 (KURABO)
- 蛍光染色試薬 : (核) NucBlue[®] Fixed Cell ReadyProbes[®] (DAPI) (ThermoFisher)
(F-actin) ActinRed[™] 555 ReadyProbes[®] Reagent (ThermoFisher)
(VE-Cadherin) Mouse anti human CD144 (BD Pharmingen),
Anti mouse antibody (Alexa Fluor[®] 488) (ThermoFisher)
- 顕微鏡 : オールインワン蛍光顕微鏡 BZ-X700 (KEYENCE)

ibidiポンプシステムの概略図

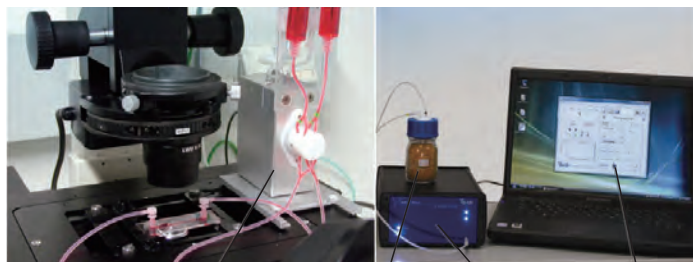


ibidi ポンプシステムの使用例



インキュベーター ibidiポンプ Drying bottle ポンプ本体

例1: インキュベーター内で灌流培養した後で顕微鏡観察



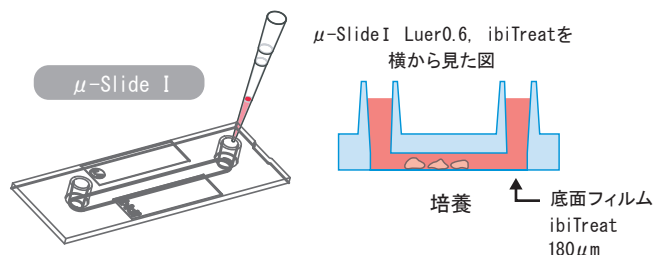
ibidiポンプ Drying bottle ポンプ本体 PC

例2: 灌流培養しながら顕微鏡観察

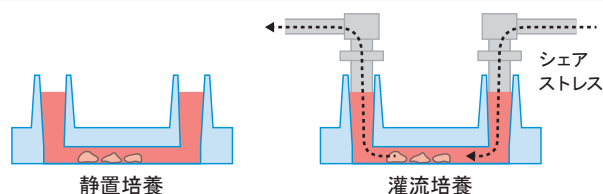
アッセイプロトコル

- 1) 2枚のibidi社チャンネルスライドチャンバーμ-Slide I Luer 0.6を1mg/ml のファイブロネクチンでコート（室温30分）
PBSで洗浄後、HUVE0をそれぞれ最終密度 1×10^5 cells/cm²になるよう播種

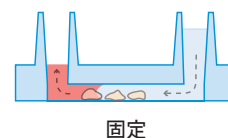
- 2) CO₂インキュベーター内でオーバーナイトで静置して細胞を接着



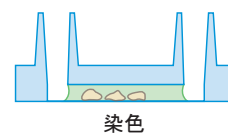
- 3) 培地の交換後、チャンネルスライド1枚はそのまま静置培養を継続し、もう一方はibidiポンプシステムを用いてシェアストレス条件下で灌流培養



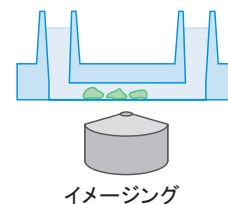
- 4) 培養48時間後（24時間ごとに培地交換）、PBSで洗浄後4% PFA で細胞を固定



- 5) PBS洗浄後に0.2%Triton® X-100で浸透処理、10% BSA in PBS でブロッキング処理してから、免疫蛍光染色を実施（一次抗体反応：4℃一晩、二次抗体反応：室温1 時間）。

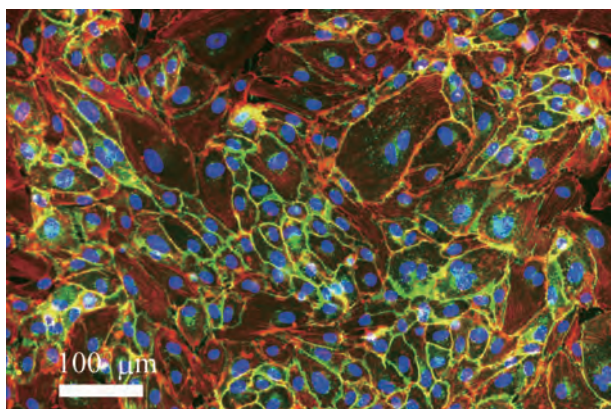


- 6) 「静置培養」および「灌流培養」それぞれ細胞形態を比較



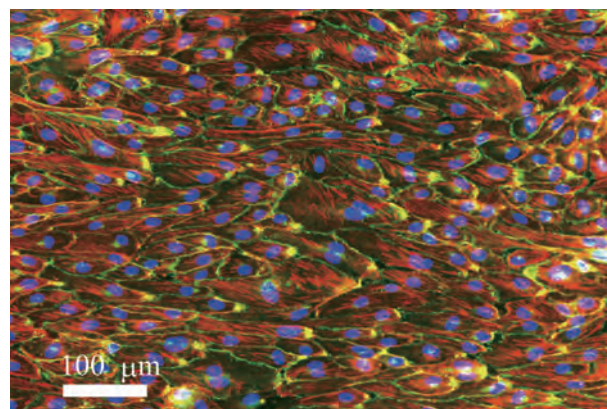
結果

静置培養の結果



灌流培養の結果

灌流の方向は→



●まとめ

内皮細胞並びに、細胞骨格であるアクチンフィラメントが流動方向に対し平行に並ぶ。
これらは、内皮細胞がShear Stressを感受することを示唆する結果である。



お客様のコメント

ibidi 社のポンプシステムはインキュベーター内に設置できるため、灌流下での細胞培養が可能である。また、従来の灌流システムに比べ、培地量が少ないこと、流量制御が正確であることが本システムの優れた点である。複数台のポンプシステムを使用することで、網羅的な計測システムの構築が可能と考える。



製品のご紹介

灌流（フロースルー）条件下の細胞観察システム

イビディ

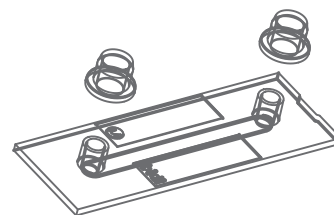
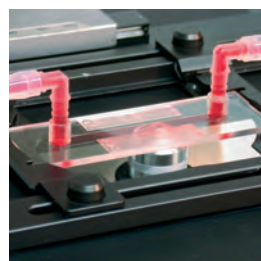
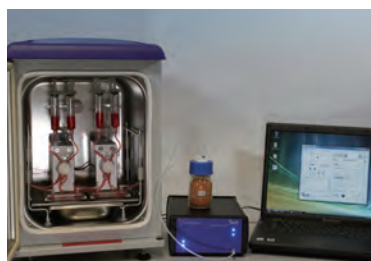
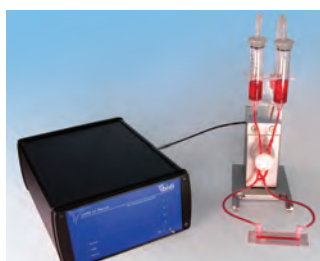
ポンプシステム

ibidi PumpSystem



HUVECなどの内皮細胞(endothelial cell)をより生体内に近い条件で培養して観察が可能！

- ・ 灌流（フロースルー）条件下の細胞観察に最適です。
- ・ 左右シリンジのチャンネル切り換えで、途切れることなく長期間一定方向の還流が可能です。
- ・ ibidi社の様々なタイプのフロー培養用スライドから選択できます。
- ・ 専用ソフトにより、簡単にフロー条件のプログラムが可能です。
- ・ シェアストレスの強さや、定流速／脈動など自由自在です。



マイクロスライドILアー

通常の静置培養にも有効なチャンネルスライドを用いた細胞免疫蛍光染色法

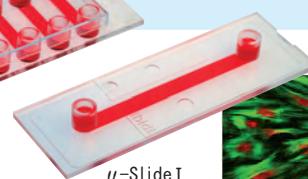
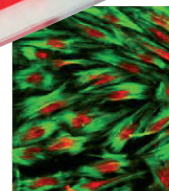
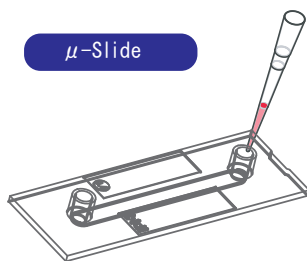
イビディ

マイクロスライド

ibidi μ -Slide VI & I チャンネル

ibidi チャンネルスライド 5つのメリット

- ① 細胞の接着性が良く、様々な細胞イメージングが可能です。
- ② 細胞が均一に分布するため、視野ごとのバラつきが少ない条件比較が可能です。
- ③ チャンネル内の溶液量が少なく、高価な試薬のコストダウンが可能です。
- ④ メニスカスの影響を受けずに位相差画像が撮影できます。
- ⑤ チャンネルなので溶液の交換が容易で、細胞培養～免疫蛍光染色操作～観察まで“オールインワン”で可能です。

 μ -Slide VI μ -Slide I μ -Slide

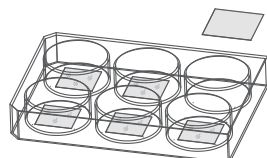
1. 培養

2. 固定

3. 染色

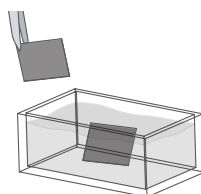
4. イメージング

従来品



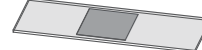
1. コーティング

2. 培養



3. 固定

4. 染色



5. イメージング

