

ibidiポンプシステムおよび μ -Slide I^{0.6} Luerを使用した灌流（フロー）実験

1 概説

ibidiポンプシステムと μ -Slide I^{0.6} Luerを組み合わせた灌流アッセイの実施について示します。また、ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）の使用に関するいくつかの推奨事項も記載しました。このプロトコルは、特定の実験ニーズに合わせて変更することができます。

実験の設定には、以下の資材が必要となります。

- μ -Slide I^{0.6} Luer, ibiTreat
- ibidiポンプシステム
 - ・ ポンプ
 - ・ シリンジ固定ユニット (fluidic unit)
 - ・ パフュージョン（灌流）セット、15 cm、内径1.6 mm（赤のマーキング）
 - ・ ホースクリップ
- HUVEC
- 内皮細胞増殖培地

2 細胞培養

通常のプロトコルに従って細胞を培養します。HUVECの場合は、10%のウシ胎仔血清（FCS）が配合された内皮細胞増殖培地を推奨します。新たに実験を開始する際に、細胞がちょうどコンフルエントに到達するよう常に注意してください。長時間コンフルエント状態となった細胞は非常に強く凝集するため、細胞を均一に懸濁するのが困難なことがあります。もう1つ重要な要素は、細胞の適応度です。消耗した細胞はせん断応力に耐えられず、表面から流される可能性があります。HUVECは、4代以上継代（継代比率1:2）しないでください！

3 資材の準備

スライド、培地、チューブ（パフュージョン（灌流）セット）等の必要資材をすべて、培養器内に、温度37°C、CO₂濃度5%の条件で一晩均衡に保ちます。これは、時間とともに発生する気泡を避けるために不可欠な作業です。

ibidiポンプシステムのマニュアルに記載されているように、パフュージョン（灌流）セットをシリンジ固定ユニット (fluidic unit) の上に乗せ、前日CO₂インキュベータ内でなじませた約12mlの培地を注ぎます（スライドは接続しない）。両方のシリンジリザーバの水位は、チューブからすべての空気を抜いた後に5mlになるように調整する必要があります。チューブから気泡を抜くため、培地フローサイクルを開始します。この目的のため、予め決められた設定を「**Pump Control**」ソフトウェアにロードさせることができます。メニュー項目「**Tutorial**」から「**Load demo setups**」→「**Remove air bubbles**」を選択します。

	圧力	せん断応力	流量	期間
1)	50.0 mbar	なし（スライドなし）	23.4 ml/分	無限

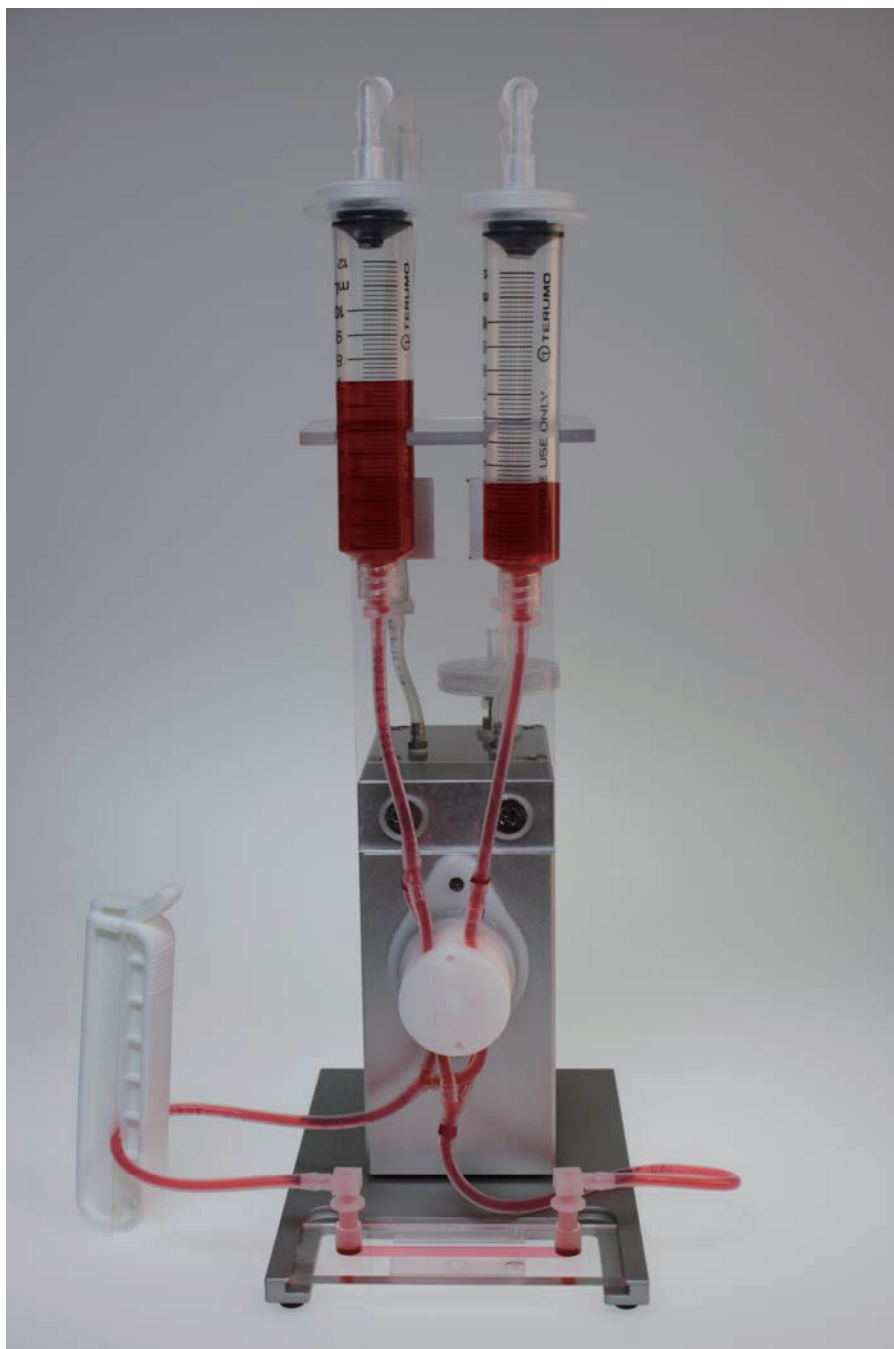
プログラムを稼働させながら、チューブおよびアダプタを軽くはじいて気泡を取り除きます。

注意：スライドをシリンジ固定ユニット (fluidic unit) に装着する前に、気泡をすべて抜くことが非常に重要です！システムに気体が残ると、流量が影響を受け、最悪の場合は流れが止まる恐れがあります。

重要！チューブの正しい挿入をテストしてください！

プログラムが稼動中に、チューブがシリンジ固定ユニットの弁に正しく挿入されていることを確認してください。チューブを手でつまんだ際に、シリンジリザーバ内の液体の動きが両方のシリンジの切り替え位置（弁の位置）で止まらなければなりません。

正しい固定位置は、下の写真の通りです。

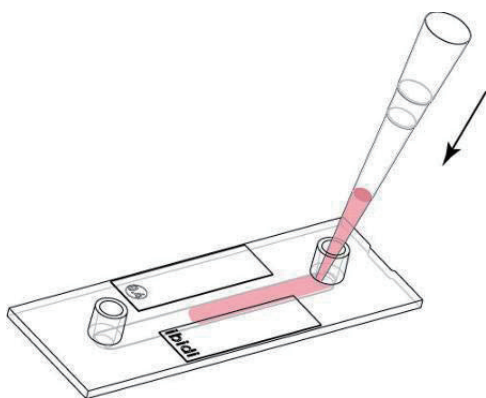


正しく挿入されたチューブのテスト実施：チューブをクランプで塞ぐと、片方のリザーバからもう一方のリザーバへの液体の流動は観察されないはずですが、この試験を両方の切り替え位置で行うことが非常に重要です。

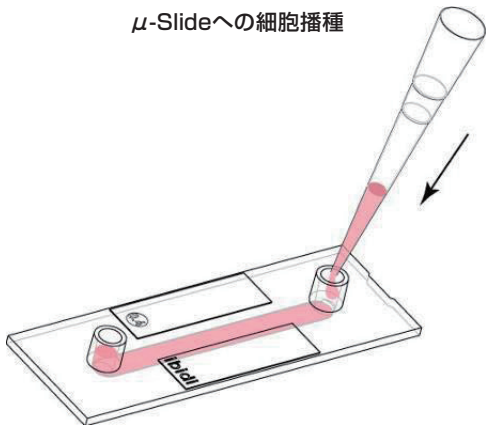
4 流量の測定

正しいせん断応力またはせん断速度を予測するには、細胞での作業を開始する前に、実験装置の流量を測定します。測定値は、例えば温度、培地の組成などにより、「PumpControl」計算の基になった値と異なることがあります。再校正については、「PumpControl」の詳細な手順を参照してください。

5 μ -Slide I^{0.6} Luerへの細胞播種

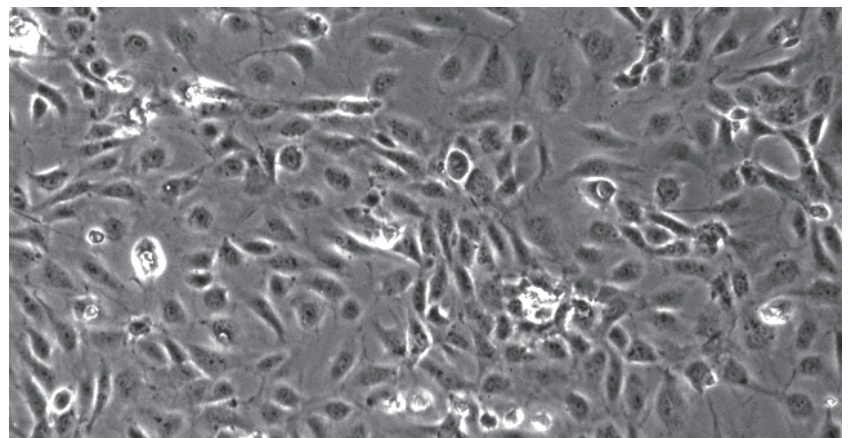


μ -Slideへの細胞播種



リザーバへの培地の充填

μ -Slideをパッケージから取り出して μ -Slideラックに乗せ、Luerアダプタにキャップをかぶせます。細胞懸濁液は最終的に 1×10^5 個/cm² (μ -Slide1枚あたり 2.5×10^5 個)となるよう、 1.6×10^6 個/mlの濃縮液を用意します。ピペットチップをチャンネルの入口に直接入れて、 150μ lの細胞懸濁液をチャンネル内に注ぎます。懸濁液がチャンネル内に流れやすくするため、スライドを少し傾けてもかまいません。Luerアダプタにキャップをかぶせ、温度 37°C 、CO₂濃度5%で30分間培養して細胞を接着させます。各リザーバに 60μ lの培地を入れます。ピペットチップを直接チャンネルの入口に突き刺さないように注意して下さい。続いて、リザーバを再び閉じて2時間培養します。すると、細胞が下図のようなコンフルエントな細胞層を形成するはずですが、コンフルエントの状態は、細胞のせん断応力に対する抵抗力の決定的な要素であるため、このことは重要な意味を持ちます。



HUVECのコンフルエントの状態 (μ -Slide I Luerへの播種から4時間後)

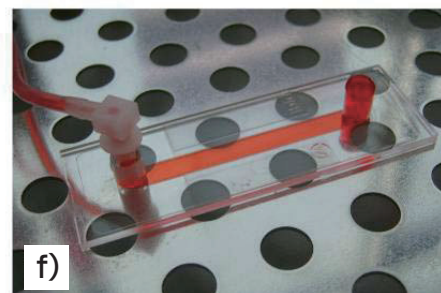
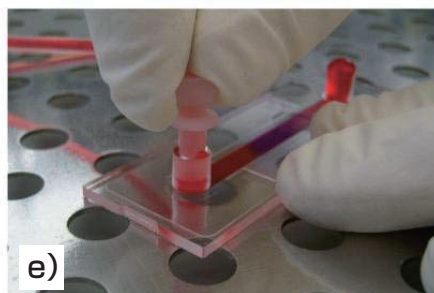
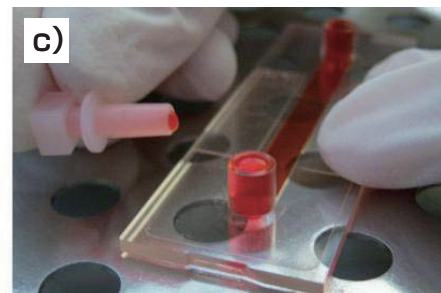
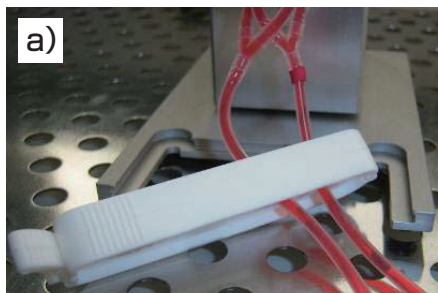
静置状態で1日以上細胞を培養する場合は、24時間ごとに培地を完全に交換する必要があります！

μ -Slide I Luerでの細胞培養に関する詳細については、マニュアルおよびアプリケーションノート3 (μ チャンネル内での細胞増殖)を参照してください。

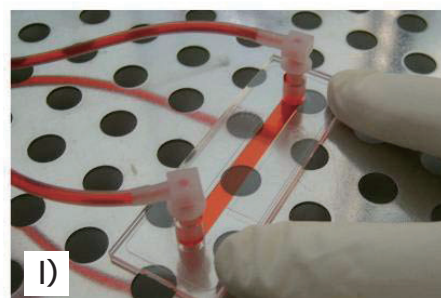
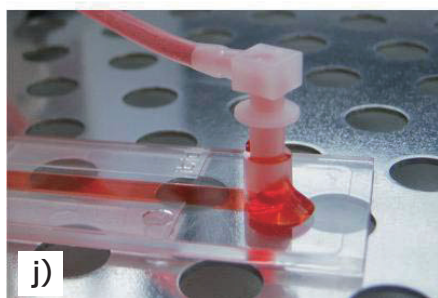
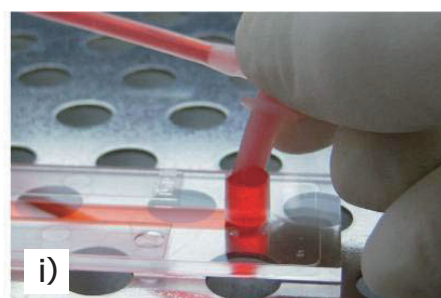
6 スライドとパフュージョン（灌流）セットとの接続



パフュージョン（灌流）セットが装着されたシリンジ固定ユニット（fluidic unit）を滅菌した作業台の下に置き、プラスチック製クリップを使用してチューブを弁の近くで締め付けます（a）。 μ -Slide I Luerを作業面の上に置き、キャップを外して、表面張力でわずかに盛り上がるまで培地をリザーバに注ぎます（a）-1, a）-2）。中央のコネクタから、1つ目のオス型Luerアダプタを上を持ち上げて引き抜き（b）、中に気泡が残らないようにします。引き抜いたアダプタを、写真（c~f）のように、慎重にスライド上のメス型Luerに接続します。



この作業を2つ目のLuerアダプタでも繰り返します。続いて、こぼれた液をティッシュ等で拭き取ります（写真g~l参照）。



重要：作業はできるだけ素早くかつ慎重に行ってください。細胞は、わずかな刺激にもストレスを受け、攪拌しすぎると剥離することがあります。
チューブへの接続後、顕微鏡で細胞の状態を確認してください！

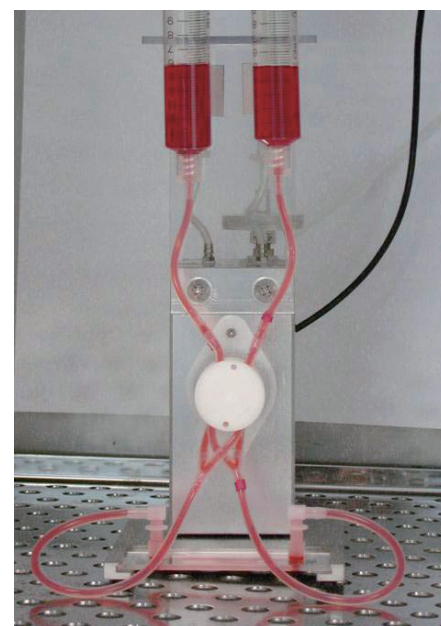
7 ポンプの起動

スライドをチューブに接続したら、顕微鏡で細胞の状態を確認します。細胞層がコンフルエントとなり、細胞がせん断応力を受けた場合に伸びることが非常に重要です。細胞がストレスを受けた場合は、自然に回復するまでしばらく待ってから流動を開始するのがいいでしょう。ibidiポンプシステム全体をインキュベータに戻し、シリンジ固定ユニット (fluidic unit) をポンプに接続します (チューブおよびケーブル)。

ibidi 「Pump Control」ソフトウェアを使用して、ポンプのスイッチを入れて流動を開始します。

この特別な作業のために、「Pump Control」ソフトウェア (バージョン1.5) にはデモファイルが用意されています。メニュー項目「Tutorial」から、「Load demo setups」→「Demo experiment」を選択します。

適度なせん断応力が加えられた流動実験のパラメータがロードされます。このプログラムは3つのサイクルで構成され、最終せん断応力10 dyn/cm²まで段階的に応力を増加させて細胞を応力慣れさせるようになっています。



パフュージョン（灌流）セット付きのシリンジ固定ユニット (fluidic unit) と、培養器に入った μ -Slide I Luer

	圧力	せん断応力	流量	期間
1)	6.1 mbar	2 dyn/cm ²	3.3 ml/min	30 min
2)	15.8 mbar	5 dyn/cm ²	8.3 ml/min	30 min
3)	33.9 mbar	10 dyn/cm ²	16.6 ml/min	無限

一方向の流動は、シリンジ固定ユニット (fluidic unit) の2つの弁を切り替えることで維持されます。Negative Pressureを加える（推奨）と、流動源は弁の下のカラー表示されたチューブになります。シリンジ固定ユニット (fluidic unit) とポンプの間に、乾燥ピンを設置します。

各種スライドでのせん断応力およびせん断速度の詳細な説明については、アプリケーションノート11 (せん断応力およびせん断速度) を参照してください。ibidiポンプシステムの詳細については、ポンプのマニュアルを参照してください。

8 顕微鏡による細胞の観察

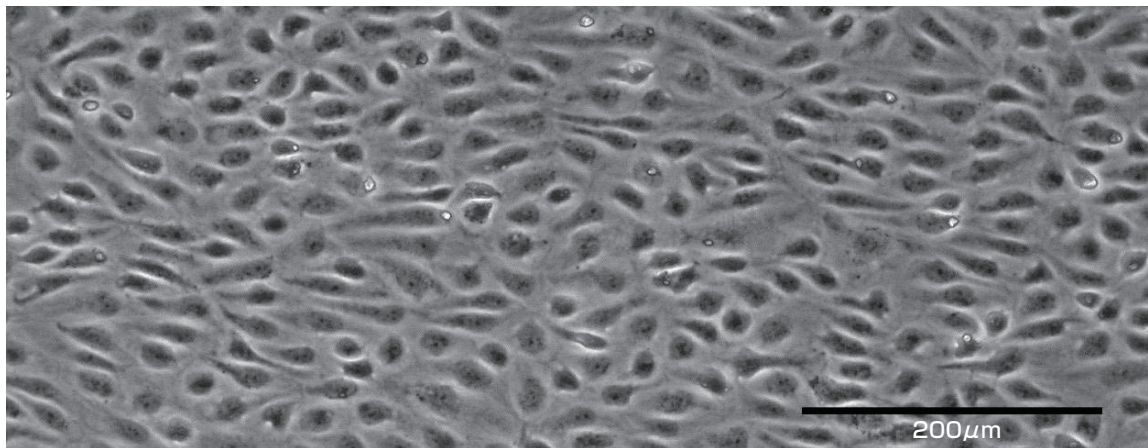
顕微鏡で細胞を観察するには、リザーバ内のレベルが均衡に保たれた瞬間にポンプのスイッチを切ります。続いて、チューブとシリンジ固定ユニット (fluidic unit) のケーブルを外します。 μ -Slideとシリンジ固定ユニット (fluidic unit) を顕微鏡に持っていく、細胞観察中はアダプタを接続したままにします。

9 細胞の形態

内皮細胞は、その生理環境内でせん断応力にさらに曝されます。そのため、循環培地による培養は、静置培養よりも生理学的条件との相関関係が強いことになります。

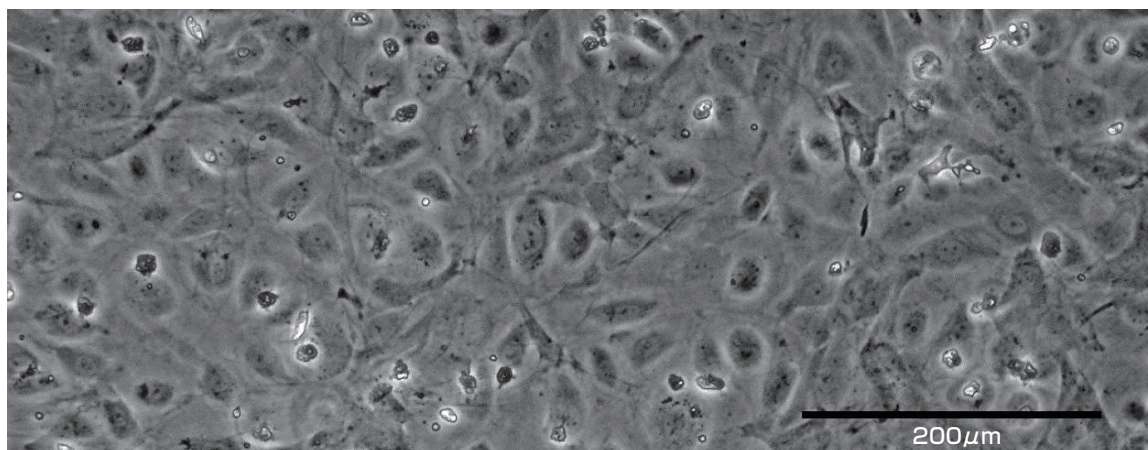
この実験計画では、流動実験の開始後最初の2日間で敷石状の細胞層を観察しました。2日後、細胞が流動方向に伸び始めました（写真1）。以下の2枚の写真で、流動状態で培養されたHUVECと静置状態で培養されたものを比較することができます（写真1, 2）。せん断応力を除くすべてのパラメータが同一であり、どちらの細胞も、 μ -Slide I^{0.6} Luer (ibiTreat) 内で1週間培養された同じ継代のものです。静置培養の培地は、毎日交換されています。

写真1. 流動培養



μ -Slide I^{0.6} Luer内で、1週間流量22 ml/分 (20 dyn/cm²) で培養されたHUVEC。
細胞が流動方向にきれいに並んでいます。

写真2. 静置培養



μ -Slide I^{0.6} Luer内で、1週間静置状態で培養されたHUVEC。
培地は毎日交換されています。

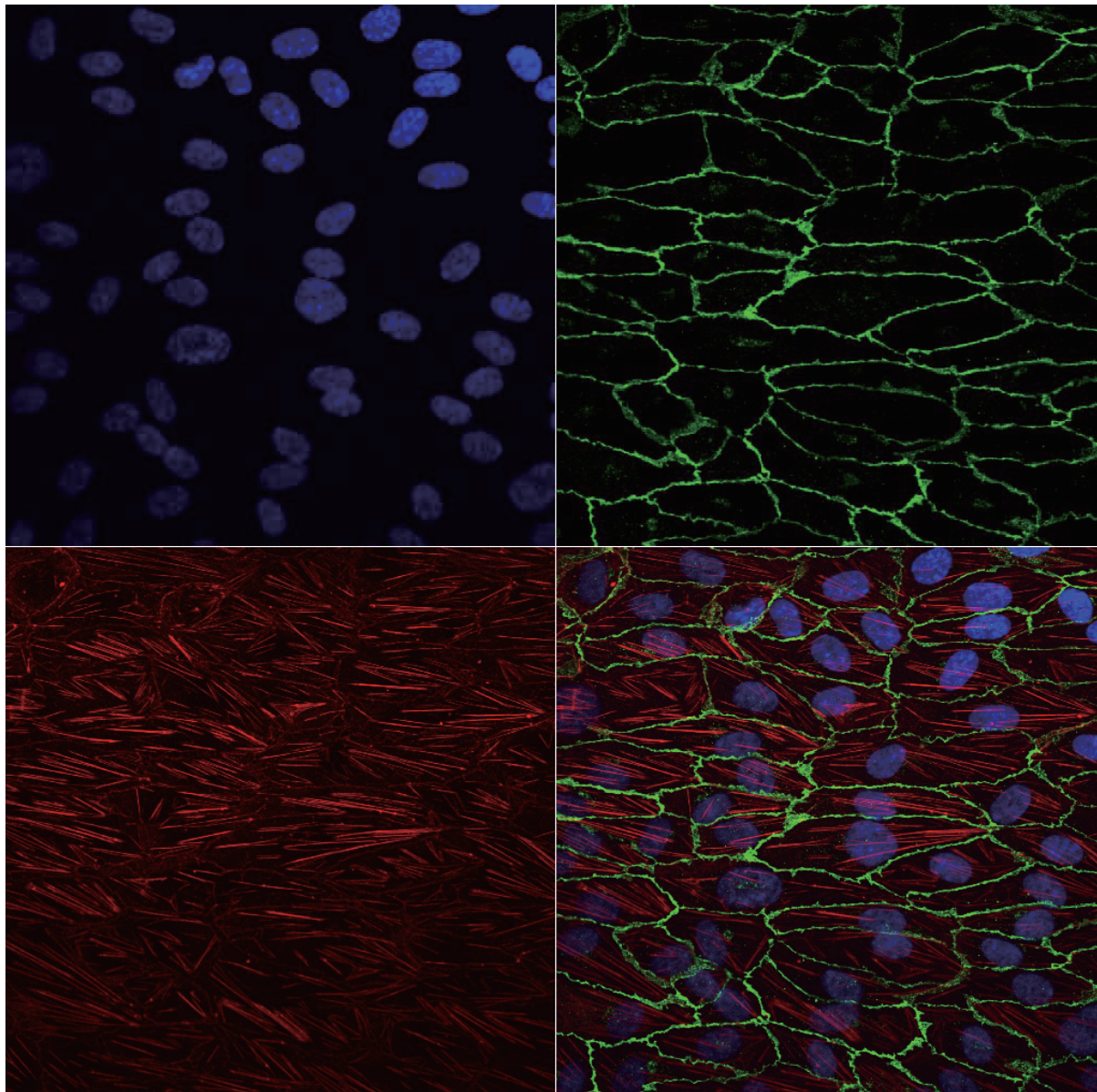
10 免疫蛍光

通常と同じ手順で、細胞を固定し染色します。流体を変更するため、最初に両方のリザーバを吸引します。チャンネルを、140 μ lの新しい溶液で2度洗い流します。必ず新しい溶液を片方から注入し、反対側から吸引します。

チャンネルが常に流体で満たされるように注意してください!

免疫蛍光染色に関する明解なプロトコルが、**アプリケーションノート2 (μ -Slide Iでの免疫蛍光)** に示されています。

灌流実験：以下の写真の細胞は、流動状態で培養されたものです。アクチン骨格が流動方向に並んでいます。

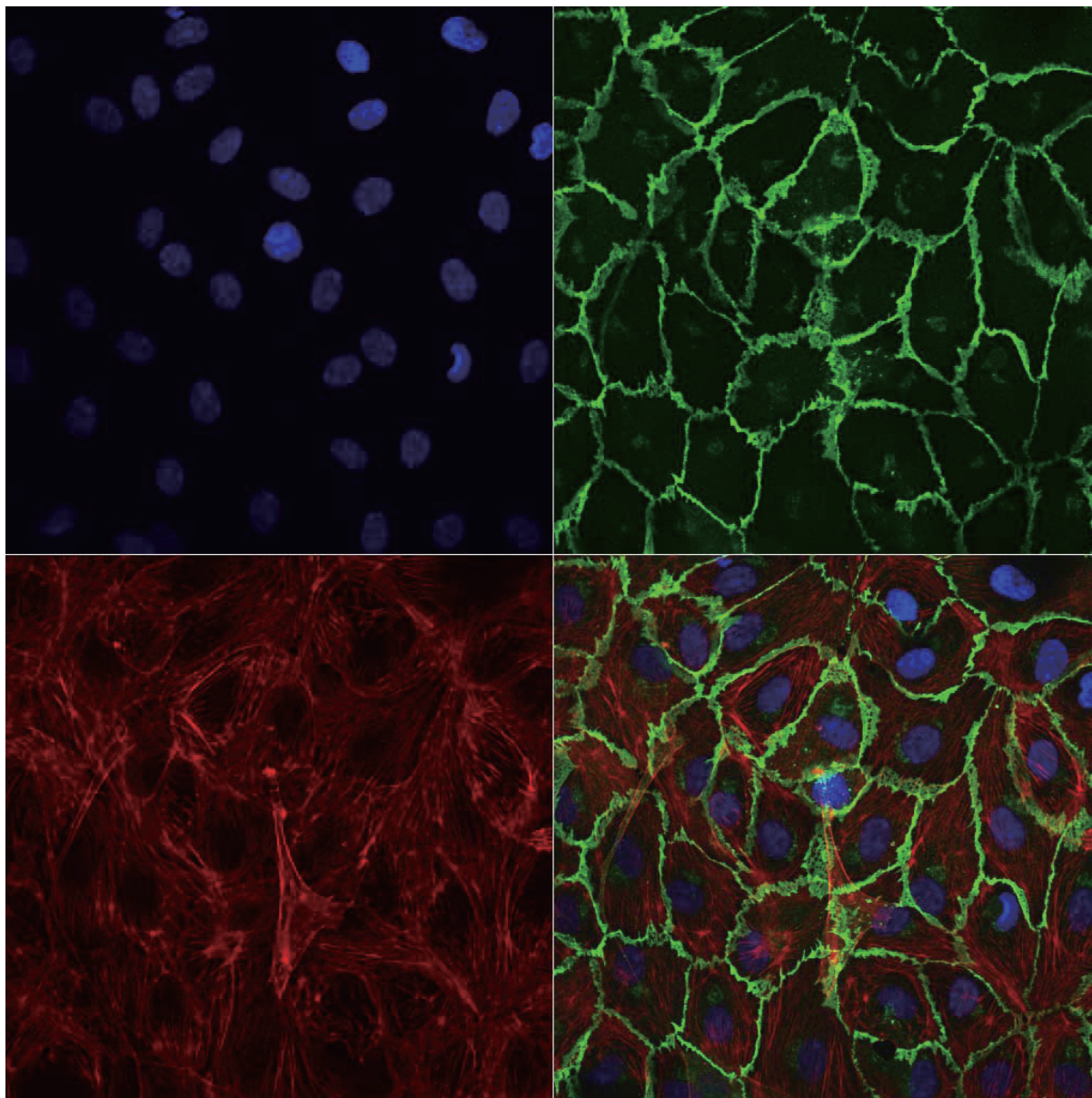


μ -Slide I^{0.6} Luer内で染色されたHUVEC。HUVECを、流量22 ml/分 (20 dyn/cm²) で7日間培養させたもの。
青：細胞核、緑：VE-カドヘリン、赤：アクチンフィラメント

μ-Slide I^{0.6} Luer内での静置管理：

このページに示された細胞は、静置状態で同じ期間（1週間）培養されたものです。VE-カドヘリンははっきりと見えますが、アクチン骨格と細胞全体は流動方向に並んでいません。

静置培養



μ-Slide I^{0.6} Luer内で染色されたHUVEC。HUVECを、培地を24時間ごとに交換しながら静置状態で1週間培養させたもの。
青：細胞核、緑：VE-カドヘリン、赤：アクチンフィラメント