



細胞解析アプリケーション事例集 VOL.4

細胞透過性アッセイ

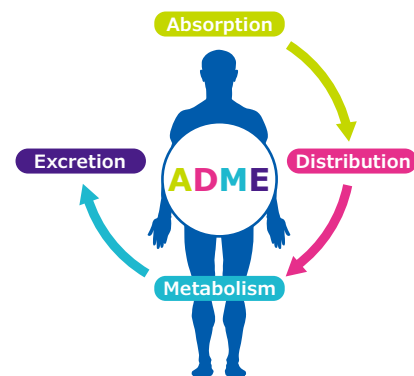
目次

化合物の膜透過性試験.....	p2
細胞透過性アッセイの原理	p2
無細胞系化合物透過試験 PAMPA	p3
皮膚透過性試験	p4
血管透過性アッセイ.....	p5
血液脳関門細胞 (BBB 細胞)	p6



化合物の膜透過性試験

創薬開発において候補化合物の透過性試験は、薬剤候補の生体内での挙動を理解するために重要です。透過性試験は、吸収 (absorption)、分布 (distribution)、代謝 (metabolism)、排泄 (excretion) の頭文字を表す ADME (薬物動態) を評価する上で不可欠になっています。腸上皮細胞に由来する Caco-2 細胞や、腎臓の上皮細胞に由来する MDCK 細胞から成る細胞層を透過する量を測定する方法、あるいは細胞を使用せずに人工膜を用いた透過性試験により化合物の物理化学的特性に基づく透過性を評価する方法が行われています。



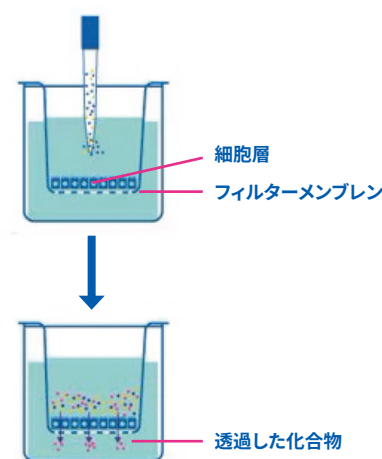
種類	試験原理と特長	使用されるツール
生細胞を用いた透過性試験	単層細胞を培養し、小腸などの吸収系モデルを構築する。Caco-2 細胞などを用いた排出、トランスポーター解析が行われる。	Millicell® セルカルチャーインサート (カタログをダウンロード)
無細胞系の透過性試験	リン脂質などを添加することで人工膜を構築し、化合物の透過度から吸収予測を行う。細胞を使用しないため、アッセイの準備が容易。短時間で低コストなアッセイを実現。	MultiScreen®-IP (3 ページを参照)
人工膜を用いた皮膚透過性試験	物理化学的にヒト皮膚と類似した三層構造をもつ人工膜を用いて、経皮吸収を予測するアッセイ。	Strat-M® (4 ページを参照)

細胞透過性アッセイの原理

細胞透過性アッセイ (Permeability assay) はインサートプレートとレシーバープレートから構成されるマルチウェルのフィルタープレートでおもに行われます。まず、インサートプレート底面の多孔膜 (フィルターメンブレン) に細胞を播種し、単層を形成するまで培養します。ここから先の手順や最終的に検出する物質は、目的によってやや異なります。

創薬研究など、ある化合物の細胞透過性を評価したいときは、インサートプレートに化合物などを添加し、一定時間後にレシーバープレートに移動した化合物の濃度を測定し、透過性を評価します。

一方、バリア機能を評価するときには、インサートプレートに毒物やシグナル分子などを添加し、単層を形成する細胞に処理を行います。その後、リンスして FITC- デキストランなどの標識分子を添加し、一定時間後にレシーバープレートにおける標識分子を調べます。レシーバープレートにおける標識分子が多いほど透過性が高い、つまり毒物やシグナル分子による細胞への刺激によって細胞のバリア機能が損傷したことを意味します。バリア機能の評価では、併せて経上皮電気抵抗 (TEER) を測定することもあります。



細胞株とプレート選択が重要

細胞透過性アッセイでは、細胞株の選択とプレートの選択が重要になります。

創薬研究で、腸管吸収を評価するためによく用いられている細胞株が Caco-2 細胞です。Caco-2 細胞はヒト結腸癌由来の細胞株で、複数のトランスポーターを発現し、タイトジャンクションを形成する均質な単層で増殖する性質があります。米国食品医薬品局 (FDA) と欧州医薬品庁 (EMA) のガイダンス文書では、治験薬が臨床的に関連するトランスポーターの基質または阻害剤となる可能性を同定する必要性が述べられているため、創薬研究では特定のトランスポーターをゲノム編集などでノックアウトできる Caco-2 細胞が適しています。また、脳疾患をターゲットとする場合には血液脳関門 (BBB) 透過性も課題になります。その場合には BBB モデル細胞を用いる必要があります。

一方、心血管疾患においては、血管内皮のバリア機能に影響を及ぼす分子や微生物の評価を行うことがあります。その場合には細胞株としてヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) がよく用いられます。

細胞株の種類や実験目的に合わせて、プレートを含めた細胞透過性アッセイツールを選択します。多くの場合、細胞株ごとに適したプレートやキットが市販されており、プレートの素材やメンブレンのポアサイズが最適化されています。例えば、Caco-2 細胞を用いた化合物の透過性評価では一般的に 0.4 μm のポアサイズのメンブレンが使用されますが、血管内皮の透過性アッセイでは 1 μm のポアサイズを使用する場合もあります。

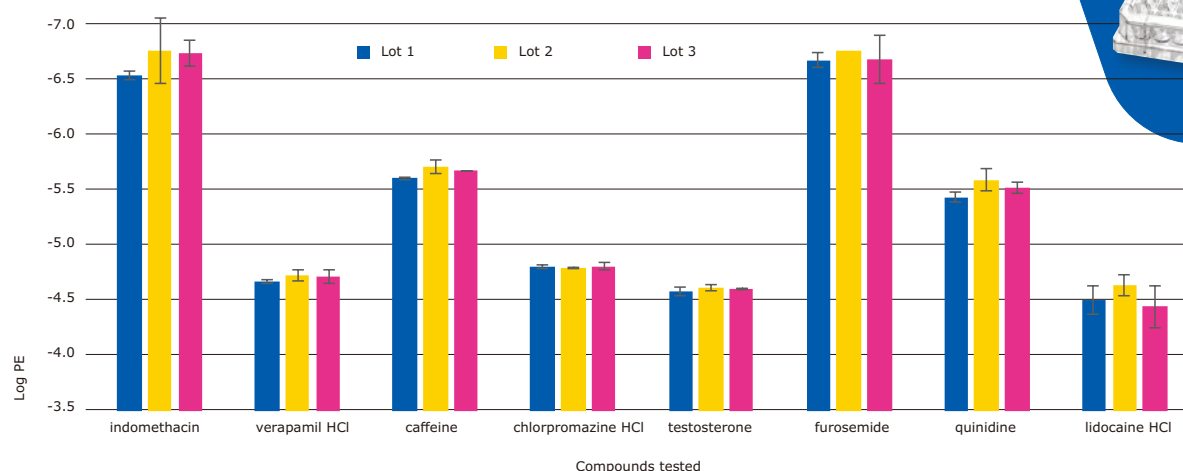
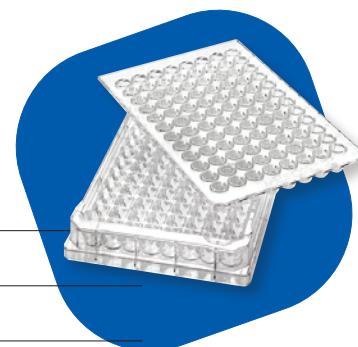
論文やメーカーウェブページなどを参考に条件検討を重ね、化合物濃度や処理時間も含めて自身の実験に最適な条件を選択する必要があります。

無細胞系化合物透過試験 PAMPA

創薬プロセスの初期では、候補化合物の透過性を評価するために非細胞ベースのアッセイを用いることもあります。PAMPA とは無細胞系化合物透過試験 (Parallel Artificial Membrane Permeability Assay) の略称で、人工的に脂質膜を構成して薬物膜透過性を測定する手法です。細胞を用いた吸収性評価試験に代わる迅速スクリーニングツールとして、多くの製薬会社で採用されています。腸管吸収性の予測に特に有効ですが、腸管吸収モデル以外にも適用されています。

MultiScreen®-IP

MultiScreen®-IP は疎水性 PVDF メンブレンを装着しています。これに任意のリン脂質を添加することで人工膜を形成し、簡便かつ短時間に再現性の高い化合物透過試験を行うことができます。



MultiScreen®-IP を使用した8種類の薬剤に対する PAMPA アッセイの結果

アクセプタープレート各ウェルに、200 μ L の 5% DMSO (PBS 溶液) を分注した。5% DMSO 溶液に溶解した各薬剤の最終濃度が 500 μ M または 250 μ M になるよう、ドナープレートのウェルに各薬剤 150 μ L を添加した。5 時間のインキュベーション後、ドナー溶液とアクセプター溶液をそれぞれ 100 μ L ずつ回収して UV 対応プレートに移し、260 nm の吸光度を測定した。ドナーおよびアクセプタープレート中の薬剤濃度は標準曲線を用いて計算した。

製品名	フィルター		ハウジング		ウェル数	入数	カタログ番号
	材質	孔径	材質	色			
MultiScreen®-IP (アンダードレイン付)	疎水性 PVDF	0.45 μ m	アクリル	透明	96	50	MAIPN4550
MultiScreen®-IP (アンダードレイン無)	疎水性 PVDF	0.45 μ m	アクリル	透明	96	10	MAIPNTR10
MultiScreen® アクセプタープレート	—	—	PTFE	—	96	1	MSSACCEPTOR

Ⓒ：クラシックプレート Ⓖ：非滅菌

脂質

メルクは Avanti Research™ の独占供給パートナーとして、米国を除く世界中の研究者に高純度脂質を提供しています。Avanti Research™ は、50 年以上の経験と豊富な製品ラインナップを背景に、高純度・高品質な研究用試薬を提供しているブランドです。

製品名	製品情報	容量	カタログ番号
PAMPA Lipid Blend I	PAMPA 用の人工膜調整に使用されている、DOPC とステアリン酸の混合溶液です	3 mL	888787D-150MG
DOPC (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine)	クロロホルム溶液	2.5 mL	850375C-25MG
	粉	25 mg	850375P-25MG

脂質についてのカタログはこちら <https://bit.ly/47WNQkY>



販売取扱について：カタログ番号を青で表記している製品の取扱いはメルク株式会社、赤で表記している製品の取扱いはシグマ アルドリッチ ジャパン合同会社となります。製品の技術的なお問い合わせはテクニカルサービスへ

お問い合わせフォーム : www.sigmaaldrich.com/contactTS <メルク製品> TEL : 03-4531-1140 <シグマ製品> TEL : 03-6756-8245

皮膚透過性試験

Strat-M®

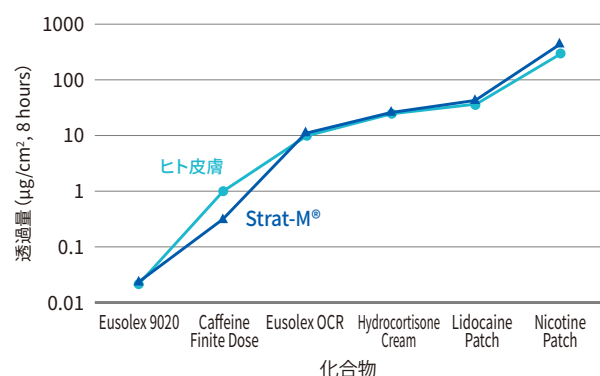
Strat-M® は皮膚透過性試験 (transdermal diffusion test) のために設計された新しいコンセプトの人工膜です。物質の透過においてヒト皮膚との高い相関を持ちながら、動物由来原料を使わず合成化合物のみから製造されているため、ヒト皮膚の使用時に問題視される 1 ロット間のばらつき、保存条件および安全性の問題が解決されています。ヒト皮膚で透過性の異なる複数の層が重なっているのと同様、物質の透過性が低いポリエーテルスルホン (PES) の 2 層が開口的で物質透過性の高いポリオレフィンに重層しているため、ヒト皮膚に似た性質を発揮します。化粧品あるいは外用薬の製剤研究や透過性試験に利用することが可能です。



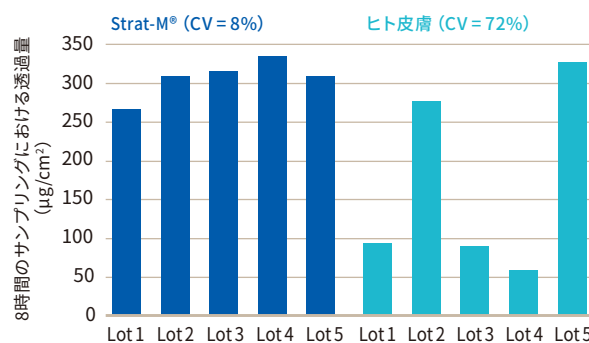
特長

- 室温で長期間の保存が可能
- ヒト皮膚との相関が高い透過性能
- プレウェットングや調製の手間なく使える利便性

ヒト皮膚とStrat-M®の透過性類似度



ロットごとのばらつきの確認



透過性試験データ

ゆっくりと浸透する日焼け止め活性成分の安全性試験や、すみやかに吸収される痛み止め用製剤の最適化を行うときにも、Strat-M® メンブレンは有用です。上の左側のグラフは、Strat-M® メンブレンとヒト皮膚における複数の製剤の透過性を示したものです。各製剤にはフランツセルを 6 つ使用し、そのうち 3 つに Strat-M® メンブレンを、残りの 3 つにヒト皮膚をセットして透過性試験を行いました。500 μL の製剤にドナーチャンバーをセットし、1 時間ごとにサンプルを HPLC で解析した結果、Strat-M® とヒト皮膚の透過性能には高い相関性があることが確認できました。右側のグラフは、複数ロットにおけるカフェイン透過性能のばらつきを示したものです。ヒト皮膚を用いた実験系では大きなばらつきがあるのに対して、Strat-M® はロット間での差が小さいことがわかります。

製品名	材質	フィルター			入数	カタログ番号
		直径	厚み	色		
☞ Strat-M®	ポリエーテルスルホンおよび ポリオレフィン (合成脂質処理)	25 mm	300 μm	白	60	SKBM02560
		47 mm	300 μm	白	60	SKBM04760

☞ : 非滅菌

販売取扱について: カタログ番号を青で表記している製品の取扱いはメルク株式会社、赤で表記している製品の取扱いはシグマ アルドリッチ ジャパン合同会社となります。製品の技術的なお問い合わせはテクニカルサービスへ

お問い合わせフォーム : www.sigmaaldrich.com/contactTS <メルク製品> TEL : 03-4531-1140 <シグマ製品> TEL : 03-6756-8245

血管透過性アッセイ

体内の血管系を覆う内皮細胞は、血液と組織区画の間に半透性のバリアとして、適切な生理学的性能と恒常性維持に重要な機能を果たしています。様々な血管作動性サイトカイン、成長因子、シグナル調節因子が内皮細胞接合複合体の変化を誘導し、イオンや栄養素、高分子および薬剤の通過を調節しています。血管透過性の障害は、糖尿病、高血圧、脳卒中、がんなど広範な疾患と関連していることが知られています。そのため血管内皮細胞の輸送や透過性の測定は、薬物の影響を評価する際に重要なアッセイとなっています。

in vitro 血管透過性アッセイキット

メルクの *in vitro* 血管透過性アッセイキットは、多孔性の膜をコラーゲンでコーティングしたセルカルチャーインサートを用いており、内皮単層を形成するための効率的なモデルを作成することができます。これにより、化合物や薬剤に対する内皮細胞の吸着、輸送および透過性の影響を評価することができます。これらの透過性アッセイキットは、標準的な 24 ウェルフォーマットと、より高いスループット実験用の 96 ウェルフォーマットのキットがあります。キットには FITC- デキストラン溶液が付属し、内皮細胞と膜を通過した蛍光分子を蛍光プレートリーダーで定量することで、細胞の透過性を評価することができます。さらに、膜上の細胞を染色することで、簡便に細胞を可視化することもできます。

製品名	製品情報	容量	カタログ番号
<i>in vitro</i> 血管透過性アッセイ (24-well)	セルカルチャーインサートおよびレシーバープレート (24 ウェル) 1 セット、FITC- デキストラン溶液、細胞染色試薬が含まれています。	24 アッセイ	ECM644
<i>in vitro</i> 血管透過性アッセイ (96-well)	セルカルチャーインサートおよびレシーバープレート (96 ウェル) 1 セット、FITC- デキストラン溶液、細胞染色試薬が含まれています。	96 アッセイ	ECM642

卵巣刺激ホルモンの性腺外機能： 内皮の生理と機能不全における役割のエビデンス

卵巣刺激ホルモン（FSH）は卵巣における卵胞形成および精巣における精子形成を刺激することにより、両性の生殖に関して基本的な役割を果たす。FSH 受容体は性腺特異的に発現すると以前は考えられていたため、他の組織における FSH の生物学的機能の可能性については長年無視されてきた。しかしながら近年、性腺以外の組織においても FSH 受容体の発現が報告されており、FSH の活性は生殖機能の調節に限定されない可能性が示唆されている。

FSH 受容体は G タンパク質共役型受容体に属し、ステロイド生成や細胞増殖、アポトーシス、生存シグナルなどに関与することが報告されている。FSH 受容体の転写産物およびタンパク質が検出された例にヒト臍静脈内皮細胞（HUVEC）がある。加えて、血漿中の FSH レベルが高い性腺機能障害は血管内皮機能障害と心血管疾患の危険因子であることが知られている。

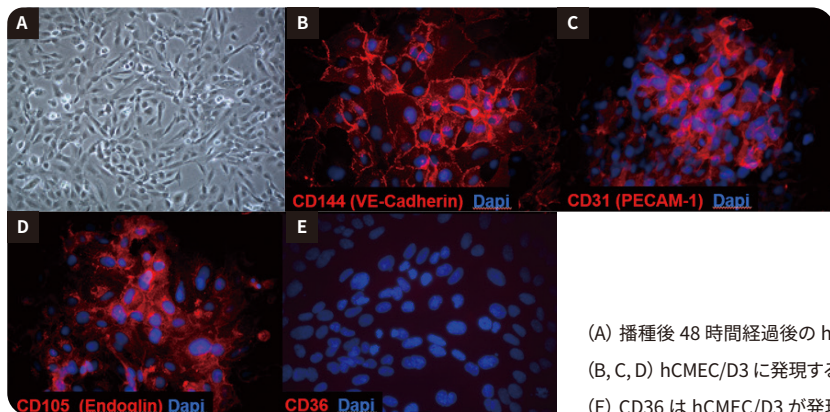
そこで HUVEC の内皮機能に対する FSH の役割をの調査が行われた。組換えヒト FSH（rhFSH）で HUVEC を刺激したところ、細胞内貯蔵カルシウムの放出量が増加し、内皮型一酸化窒素合成酵素（eNOS）の発現、eNOS のリン酸化、一酸化窒素（NO）の産生が亢進された。さらに、rhFSH による刺激は細胞透過性を亢進させ、非典型的な血管内皮カドヘリン分布と線維状アクチンの形成を促進した。これらの結果から、高濃度の FSH は内皮膜を損なうシグナルを誘発することが示唆された。NO は重要な血管拡張因子ではあるものの、過剰な産生は内皮機能に影響を及ぼし、更年期の女性や性腺機能低下症の男性における心血管リスクの上昇に寄与している可能性がある。

本研究では、細胞透過性を評価するためにメルク社の *in vitro* 血管透過性アッセイキット（ECM644）が使用された。コラーゲンでコーティングされたインサートプレートに細胞を播種し、単層が形成されるまで 37°C でインキュベートした。HBSS で血清を除去した後に rhFSH で 30 分処理し、各インサートに FITC- デキストランを添加した。20 分後、ボトムチャンバー内の溶液を黒色 96 ウェル不透明プレートに移し、485 nm と 535 nm の吸光度を測定した。その結果、rhFSH で処理すると細胞透過性は亢進し、細胞を siRNA によって FSH 受容体の発現を抑制した場合には細胞透過性に変化は見られなかったことから、FSH 受容体を介した細胞内シグナリングが細胞透過性に影響を与えることが明らかになった。

参考文献
Rocca MS, et al. Mol Cell Endocrinol. 2024 Dec 1;594:112378.
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2024.112378>

血液脳関門細胞（BBB 細胞）

血液脳関門（BBB）は中枢神経系において、脳の細胞外液から循環血液を分離する、高度に選択的な透過性バリアの役割を果たしています。血液脳関門は毛細血管内皮細胞によって形成され、これらの細胞は極めて高い電気抵抗率を持つタイトジャンクションによって結合しています。血液脳関門は、水、一部の気体、脂溶性分子を受動拡散によって通過させるだけでなく、グルコースやアミノ酸のような神経機能に重要な分子を選択的に輸送する働きがあります。血液脳関門によって、開発した候補薬が脳に到達しないなど、医薬品や治療法の開発を困難にしています。



hCMEC/D3 細胞株は、ヒト側頭葉微小血管に由来する一次細胞を不死化し、脳内皮細胞（CEC）を選択的に単離してクローン化した細胞株です。このヒト由来の脳微小血管内皮細胞は BBB のモデル細胞として、中枢神経系や薬物輸送の研究に多く用いられています。

- (A) 播種後 48 時間経過後の hCMEC/D3 の明視野像。
(B, C, D) hCMEC/D3 に発現する代表的なマーカーの免疫染色像（赤）。核は DAPI により対比染色（青）。
(E) CD36 は hCMEC/D3 が発現しないマーカーである（赤）。核は DAPI により対比染色（青）。

製品名	製品情報	容量	カタログ番号
Blood-Brain Barrier hCMEC/D3 Cell Line	ヒト由来の脳微小血管内皮細胞。商業利用ではない場合、ライセンスは不要です。	≥ 1X10 ⁶ cells/vial	SCC066

ADME/Tox - *in vitro* 薬物動態学スクリーニング向け製品カタログはこちら
<https://bit.ly/3V33ZOi>



販売取扱について：カタログ番号を青で表記している製品の取扱いはメルク株式会社、赤で表記している製品の取扱いはシグマ アルドリッチ ジャパン合同会社となります。製品の技術的なお問い合わせはテクニカルサービスへ

お問い合わせフォーム：www.sigmaaldrich.com/contactTS <メルク製品> TEL：03-4531-1140 <シグマ製品> TEL：03-6756-8245



本紙記載の製品は試験・研究用です。ヒト、動物への治療、もしくは診断目的として使用しないようご注意ください。掲載価格は希望販売価格（税別）です。実際の価格は弊社製品取扱販売店へご確認ください。なお、品目、製品情報、価格等は予告なく変更される場合がございます。予めご了承ください。記載内容は2025年9月時点の情報です。Merck, the vibrant M, and Millipore and Sigma-Aldrich are trademarks of Merck KGaA, Darmstadt, Germany or its affiliates. All other trademarks are the property of their respective owners. Detailed information on trademarks is available via publicly accessible resources. ©2025 Merck KGaA, Darmstadt, Germany. All rights reserved.

メルク株式会社

ライフサイエンス リサーチソリューションズ事業部
〒106-0041 東京都港区麻布台1-3-1 麻布台ヒルズ 森JPタワー 26階
製品の最新情報はこちら www.merckmillipore.com/bio

製品に関するお問い合わせは、テクニカルサービスへ
お問い合わせフォーム：www.sigmaaldrich.com/contactTS Tel: 03-4531-1140
在庫照会・ご注文に関するお問い合わせは、カスタマーサービスへ
お問い合わせフォーム：www.sigmaaldrich.com/contactCS-M Tel: 03-4531-1141