Sigma-Aldrich®
Lab & Production Materials

2020年10月
Vol.07

sigmania
シグマニア

Sigma-Aldrichを中心に、バイオロジー研究に
役立つ新製品と注目の試薬を一気に紹介！
すでに人気の製品から、隠れた人気製品まで。
ぜんぶ知っているあなたはシグマニア？

テーマ：
新時代を切り拓く クラシックと先端技術

CONTENTS

特集

エピジェネティクス

エピジェネティクス研究の新手法キット
ChIC/CUT&RUN (Chromatin Immuno-Cleavage) Kit NEW ... 3

いずれも 1,600 報を超える論文実績!
研究者に選ばれている エピジェネティクス研究用抗体 4

Roche × sigmania
高感度検出も 手軽さも どちらも実現
温故知新の核酸検出法
DIG システム 5

10x Genomics に適合した CRISPR スクリーニング
スクリーニング時間を短縮する シングルセル解析 6

ライブセルイメージング色素 NEW 7

アプリケーションノート
呼吸器疾患・肺疾患モデル 継代可能なヒト気管支細胞株 8

Millipore だけの特別な PES 膜
ミリポアエクスプレスプラス 10

ハンディ型自動セルカウンター
Scepter™ 3.0 11

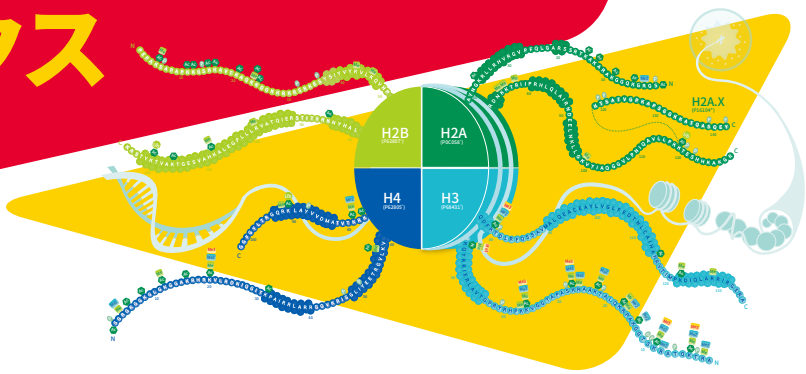
クロスワードでハカセと対決！ 12

The life science business of Merck operates as MilliporeSigma in the U.S. and Canada

MERCK

特集

エピジェネティクス



エピジェネティクスとは、DNA 配列の変化ではなく、非遺伝的メカニズムによって引き起こされる遺伝子発現の遺伝的変化のことです。これらの変化は、細胞または組織に特異的であり、複数の世代に受け継がれます。
エピジェネティックな制御により、DNA ベースの情報が豊富になり、細胞がさまざまな生物学的および環境的状況に対して応答を変化させることが可能になります。エピジェネティックなメカニズムは主に核に集中していますが、これらのメカニズムは、ホルモンや栄養素、ストレス、細胞の損傷などの環境シグナルによって誘発されるため、エピジェネティックな制御においての細胞質および細胞外の因子の関与が示唆されます。

既存のエピジェネティックな変化は、次のメカニズムを介して転写および転写後の調節に影響を与える可能性があります。

- **ヒストン修飾**
- **ヒストンバリアントの配置**
- **クロマチンとヌクレオソームのリモデリング**
- **DNA メチル化**
- **Small RNA および non-coding RNA が媒介するエピジェネティック制御**

これらのメカニズムは、転写制御因子やその他の核酸結合タンパク質と連携して、遺伝子発現を調節し、細胞の多様性をもたらしますが、DNA 配列は細胞間で実質的に同一です。

遺伝子調節のエピジェネティックなメカニズムは、農業から人間の健康まで、さまざまな研究分野に影響を与えています。 それによりエピジェネティクスの研究ツールは、次のような幅広い分野で研究されています。

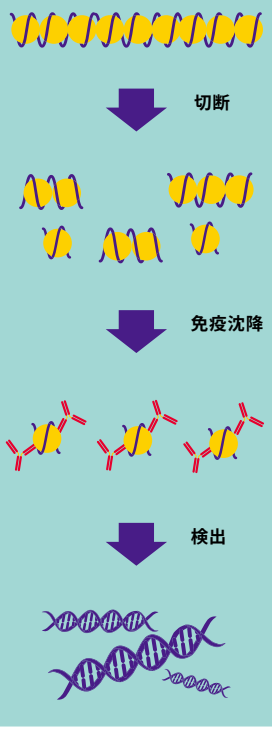
- ✓ **神経科学**
- ✓ **がん**
- ✓ **幹細胞**
- ✓ **細胞分化**
- ✓ **胚発生**
- ✓ **老化**

エピジェネティクスが複数の研究分野に及ぼす影響が大きくなるにつれて、その研究内容は、基本的なメカニズムから、これらのメカニズムが発達と病気に及ぼす影響に移行しています。

エピジェネティクス研究ではさまざまな手法が用いられていますが、その中の一つ、クロマチン免疫沈降（ChIP）は、染色体 DNA に関連するタンパク質の生体内での分布をマッピングするために古典的に使用されている手法です。 これらのタンパク質は、ヒストンサブユニットや転写制御因子、DNA に直接または間接的に結合されたその他の調節タンパク質もしくは構造タンパク質である可能性があります。

ChIP 法では、ホルムアルデヒドでタンパク質と DNA をクロスリンクし、クロマチンを切断・可溶化し、可溶化されたクロマチンを免疫沈降します。ChIP において DNA を読み出す方法は、エンドポイント PCR から高速シークエンシングへと数年で進化しましたが、ChIP の技術自体は基本的に変化していません。この技術には、感度が制限される高いバックグラウンド、多量の細胞を使用することによる課題、クロスリンクやタンパク質可溶化によるアーティファクトなどの問題が残っています。

クロマチン免疫沈降（ChIP）法の概要



隠れた名品シリーズ

実績豊富なアガロースビーズタイプ

製品名	カタログ番号
ChIP Assay Kit	17-295
EZ-ChIP Assay Kit*	17-371

遠心要らずで夾雑物低減　磁気ビーズタイプ

製品名	カタログ番号
Magna ChIP® A/G Kit	17-10085
EZ-Magna ChIP A/G Kit*	17-10086

* ポジティブ・ネガティブコントロール抗体、検出用 PCR プライマー付属

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。ご確認のうえ、各社へご注文くださいますようお願い申し上げます。

改変ミクロコッカス DNA ヌクレアーゼ（MNase）を用いた ChIC 法と deep sequencing を組み合わせた手法のキット

NEW

ChIC/CUT&RUN (Chromatin Immuno-Cleavage) Kit

不溶性タンパク質で ChIP 法を実施する際に直面する問題に対処するため、ChIP に代わるより洗練された手法として Chromatin Immuno-Cleavage（ChIC）と呼ばれる技術が開発されました[1]。ChIC 法では、改変ミクロコッカスヌクレアーゼ（MNase）とプロテイン A の結合体（pA-MN）を特異的抗体で捕捉することによって、ゲノム上の転写因子の結合部位を検出します。改変 MNase は、Ca^{2+} イオン存在下でのみ、対象タンパク質と相互作用する領域の DNA を特異的に切断するため、抗体が結合した部位の DNA の切断をコントロールすることができます。この方法によって、従来の ChIP 法より、優れた 100 ～ 200 bp の分解能と卓越した特異性で、タンパク質をマッピングすることが可能です[1]。

ChIC は、さらに手順を最適化し、また deep sequencing と組み合わせることによって、ゲノムワイドの転写因子結合部位やネイティブクロマチンのヒストン修飾を 5 bp 未満の分解能で検出できるようになりました。ChIC と deep sequencing を組み合わせたこの方法は、Cleavage Under Targets and Release Using Nuclease（CUT&RUN）と呼ばれます[2]。

ChIC/CUT&RUN 法では、標的フラグメントのみが溶液中に放出され、大半の DNA は拡散しないため、バックグラウンドレベルが極めて低くなります（図 1）。

結果として、ヒストン修飾解析ではわずか 100 個の細胞、転写因子結合部位解析では 1,000 個の細胞で、高品質なデータが得られます。また、ChIP とは対照的に、ChIC/CUT&RUN には溶解性の問題やクロスリンクが原因の DNA アクセシビリティの問題によるアーティファクトはありません。ChIC/CUT&RUN は、ChIP と比較して、分解能、シグナル／ノイズ比、必要なシークエンス深度など、さまざまな点で優れています。以下の表に X-ChIP-seq よりも優れている ChIC/CUT&RUN の特徴をまとめました（表 1）。

方法	ChIC/CUT&RUN	X-ChIP-seq
必要な細胞数	**約 100**	約 5 × 10^6
分解能	**< 5 bp**	～ 300 bp
必要なリード数	**約 3 × 10^6**	約 20 × 10^6
シグナル／ノイズ比	**高**	低
断片化バイアス	**なし**	あり
作業時間（細胞から DNA）	**1 日**	3 日
定量用スパイクイン	**シンプル**	可能

表 1：X-ChIP-seq と比較した ChIC/CUT&RUN の優れた特徴（Skene *et al.* 2018 より引用改変）
ChIP-seq と比較して、必要な細胞数・シークエンスリード数が非常に少ない、シグナル／ノイズ比が大幅に高い、断片化バイアスがない、速い、定量用スパイクインに適応していることが特徴です[2]。

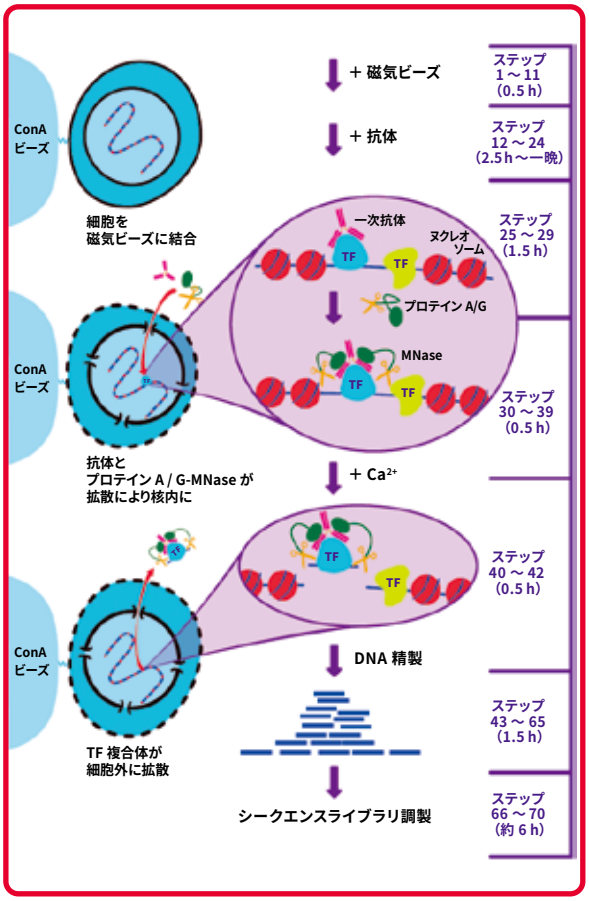


図 1：ChIC/CUT&RUN 法の概要
ChIC/CUT&RUN の手順としては、回収した細胞をコンカナバリン A コーティングした磁気ビーズに結合させます。ジギトニンで細胞膜を透過処理し、特異的抗体が標的を捕捉できるようにします。抗体用のインキュベーションの後、ビーズを軽く洗浄し、pA-MN を加えてインキュベーションします。細胞を 0°C に冷却し、Ca^{2+} を含有するインキュベーション緩衝液を追加すると切断が始まります。反応はキレートにより停止させます。切断された DNA 断片は溶液中に放出されるので、上清から抽出します。

ChIC/CUT&RUN Kit について

ChIC/CUT&RUN 技術をベースに、使用する抗体に応じて付属の pA-MN、pG-MN または pA-MN/pG-MN タンパク質カクテルで選べる 3 種類の ChIC/CUT&RUN Kit（カタログ番号 CHR100 ～ 102）を開発しました。pA-MN はウサギ IgG を含むほとんどの抗体との親和性が高く、pG-MN はプロテイン A との親和性が低いマウス IgG1 などの抗体に適しています。ChIC/CUT&RUN Kit は、クロマチン－タンパク質相互作用のゲノムワイドプロファイリングにおいて右のようなメリットがあります。
また、キットご購入の際には得られたデータの解析をお客様ご自身で行える ChIC/CUT&RUN データ解析ツールをご用意しました。このツールは、広く使われ検証されたアルゴリズム、例えばピークコールには MACS2 などを使用し、反復やバーコードがある場合・ない場合を考慮して開発されました。このツールは使用が簡単で、バイオインフォマティクスの経験は必要なく、ChIC/CUT&RUN Kit ご購入のお客様には無料でご提供しています。

ChIC/CUT&RUN Kit のメリット

- クロスリンク ChIP-seq に比べてシグナル／ノイズ比が極めて低い
- クロスリンク、ソニケーション、高速遠心分離のステップがない
- 必要な細胞数が少ない
  （必要な最少細胞数はヒストン修飾で 100 個、転写因子では 1,000 個）
- 作業時間の大幅な短縮 – 細胞から DNA 精製まで 1 日（最短 3 時間）
- 特別な機器は不要

製品名	カタログ番号
ChIC/CUT&RUN (Chromatin Immuno-Cleavage) Kit (pA-MN)	CHR100
ChIC/CUT&RUN (Chromatin Immuno-Cleavage) Kit (pG-MN)	CHR101
ChIC/CUT&RUN (Chromatin Immuno-Cleavage) Kit (pA-MN/pG-MN)	CHR102

製品の詳細やシークエンスの結果例などは下記の URL でご覧ください

https://bit.ly/ChIC-jp

参考文献

1. Schmid, M., Durussel,T., Laemmli, U.K. ChIC and ChEC: genomic mapping of chromatin proteins. Molecular Cell. 16, 147-157 (2004).
2. Skene, P. J., Henikoff J. G., Henikoff, S. Targeted in situ genome-wide profiling with high efficiency for low cell numbers. Nature Protocols. 13, 1006-1019 (2018).

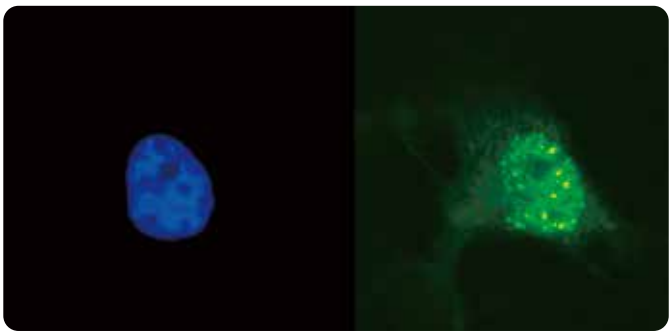
【製品の技術的なお問い合わせ（テクニカルサービス）】 ＜メルク製品＞ TEL：03-4531-1140 Email：jpts@merckgroup.com
＜シグマ製品＞ TEL：03-6756-8245 Email：jpts@merckgroup.com

いずれも 1,600 報を超える論文実績！

研究者に選ばれているエピジェネティクス研究用抗体

メルク／シグマ アルドリッチは、Upstate® や Chemicon® ブランドに代表されるエピジェネティクス研究用製品のラインナップの充実に力をいれており、多くの研究者の皆様に選ばれています。ここでは長年の実績と高い品質管理技術による安定の品質で多くの論文に掲載されている代表的なエピジェネティクス研究用抗体をご紹介します。

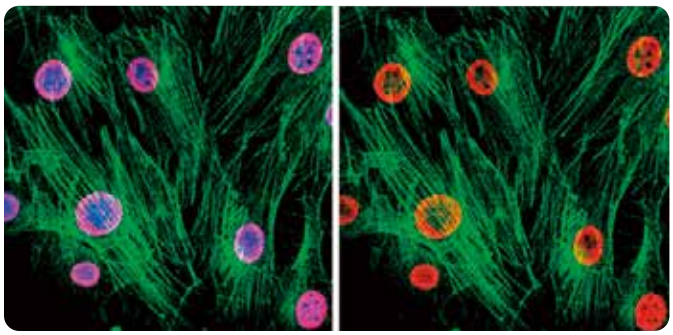
Anti-phospho-Histone H2A.X (Ser139) Antibody, clone JBW301 (カタログ番号 : 05-636)



免疫蛍光細胞染色：
Jurkat 細胞をエトポシドで処理し、Anti-phospho-Histone H2A.X (Ser139) Antibody, clone JBW301 で染色した (緑色；右側)。DNA は DAPI で染色 (左)。

交差種	アプリケーション	免疫動物	ポリ / モノ
Vrt	WB, IHC, ICC, IF, ChIP	M	Mono

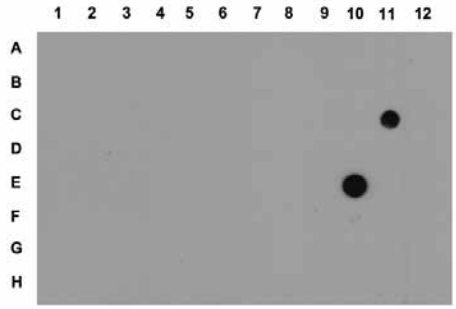
Anti-acetyl-Histone H3 Antibody (カタログ番号 : 06-599)



免疫蛍光細胞染色：
NIH/3T3 細胞を Anti-acetyl-Histone H3 Antibody (赤色) で染色した。アクチン・フィラメントは Alexa Fluor®488 - ファロイジン (緑色) で、核は DAPI (青色) で染色した。

交差種	アプリケーション	免疫動物	ポリ / モノ
H, M, R	WB, ICC, ChIP, ChIP-seq	Rb	Poly

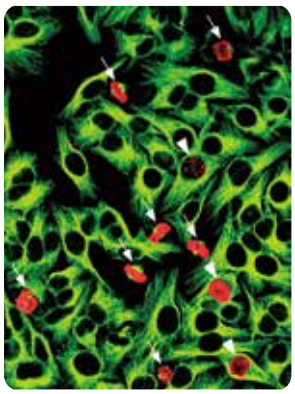
Anti-trimethyl-Histone H3 (Lys27) Antibody (カタログ番号 : 07-449)



ドットブロット：
さまざまな修飾をされたヒストン・ペプチドを Anti-trimethyl-Histone H3 (Lys27) Antibody で反応させた (500 倍希釈)。ペプチドは HRP 標識済み Donkey Anti-Rabbit IgG 二次抗体と化学発光検出システムを用いて可視化した。
C11: KAAR[trimethyl-K]SAPA-C
E10: KAAR[trimethyl-K]SAPSTGGVKKC

交差種	アプリケーション	免疫動物	ポリ / モノ
H, M	WB, IHC, ICC, IP, Mplex	Rb	Poly

Anti-phospho-Histone H3 (Ser10) Antibody, Mitosis Marker (カタログ番号 : 06-570)



免疫蛍光細胞染色：
HeLa 細胞を Anti-phospho-Histone H3 (Ser10) Antibody, Mitosis Marker (赤色) と Anti-tubulin Antibody (緑色) で染色した。

交差種	アプリケーション	免疫動物	ポリ / モノ
H, M	WB, ICC, IP	Rb	Poly

他にも多くの研究者に選ばれている製品が多数あります。詳細は下記の URL でご確認ください

http://bit.ly/epinucabs

略語	アプリケーション
ChIP	Chromatin immunoprecipitation
ChIP-seq	Chromatin immunoprecipitation sequencing
ICC	Immunocytochemistry
IF	Immunofluorescence

略語	アプリケーション
IHC	Immunohistochemistry
IP	Immunoprecipitation
Mplex	Multiplexing
WB	Western Blotting

略語	免疫動物・交差種
H	Human
M	Mouse
R	Rat

略語	免疫動物・交差種
Rb	Rabbit
Vrt	Vertebrates

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。ご確認のうえ、各社へご注文くださいますようお願い申し上げます。

高感度検出も 手軽さも どちらも実現
温故知新の核酸検出法

DIG システム

近年、核酸検出の場面で PCR 等の増幅技術を利用する場面が増えてきましたが、中には標識法（ラベリング）の方が適しているケースもあります。今回はそんな時に試していただきたい標識法「DIG システム」をご紹介します。

RI と DIG システムの比較

標識プローブを用いた核酸の検出法は、ラジオアイソトープ（RI）による検出方法が主流でしたが、環境汚染のリスクや取扱・廃棄処理の煩雑さから non-RI の標識法が増えてきました。その 1 つが DIG システムです。

DIG システムは、RI 法と比べて感度が高いことが論文でも報告されており、その他にも露光時間が短く済む、安全、プローブの再使用が可能で少なくとも 1 年は安定、といった特長があります。

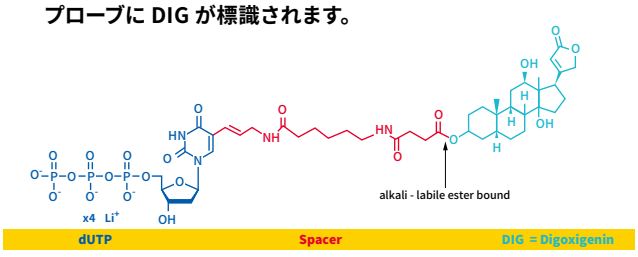
DIG システムを利用できるアプリケーション例

- サザンブロット
- ノーザンブロット
- ドットブロット
- サウスウェスタン
- *In situ* hybridization（ISH）
- Fluorescence *in situ* hybridization（FISH）
- ゲルシフトアッセイ
- コロニーハイブリダイゼーション

DIG システムの検出原理

DIG システムは、DIG 標識した核酸プローブを抗 DIG 抗体で検出する方法で、検出にはアルカリホスファターゼ（AP）標識抗体や蛍光標識抗体などを用います。

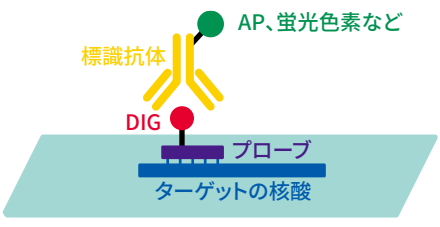
1 dUTP にジゴキシゲニン（DIG）と呼ばれるステロイド化合物を標識します。この DIG-dUTP を用いて核酸を合成することで、プローブに DIG が標識されます。



2 プローブを mRNA や DNA などのターゲットの核酸にハイブリダイズします。

3 ターゲットにプローブが結合したら、DIG を特異的に認識するアルカリホスファターゼ標識抗体、もしくは蛍光標識抗体を反応させます。すると、下の模式図のように、核酸 - プローブ -DIG- 標識抗 DIG 特異的抗体という複合体ができます。

4 この複合体を抗体の標識に合わせた手法で検出します。



DIG と標識抗体による複合体のイメージ

高感度検出なら発光法、手軽さなら発色法を

アルカリフォスファターゼ標識の場合は、発色法と発光法のどちらかを目的に合わせて選択できます。感度を重視するなら 0.03 pg の DNA も検出可能な発光法、手軽さを求めるなら検出用機材が不要な発色法を選ぶのがおすすめです。

多重染色では蛍光標識抗体を

In situ hybridization（ISH）法では、他にもさまざまな検出法を利用することができます。

標本を微細に観察したい場合には、金コロイドを結合させた DIG 抗体を用いて、電子顕微鏡による観察が可能になります。

多重染色を行うのであれば、蛍光標識抗体を用いるのがおすすめです。DIG 抗体に直接蛍光標識が施されているため、蛍光顕微鏡を用いて観察することができます。

また、DIG 標識されたプローブと併用してビオチン標識されたプローブを使用することで、一度にさまざまな染色体領域や RNA 配列を同定することも可能です。

まとめ

DIG システムは、高感度検出、手軽さ等の特長により希望のプロトコールを選択でき、抗体や発色試薬を変えるだけで異なる実験に対応できるよう設計されています。長年にわたる経験から確立されたプロトコールもありますので、興味を持たれた方はぜひ試してみてください。

参考文献

DIG 説明書集「日本語版」8th ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社
https://m-hub.jp/biology/1548/77

豆知識 1　ロシュ社の DIG システム

ロシュ社は non-RI テクノロジーを最初に提供した会社の 1 つで、DIG システムは広く普及している技術の 1 つです。

豆知識 2　なぜ DIG が選ばれたのか？

ロシュ社は、心臓病の治療薬として用いられる強心配糖体ジゴキシンの研究を古くから行っている経験から、ジゴキシゲニン（DIG）を人工的抗原（ハプテン）として利用できることを見出しました。

ジゴキシゲニンと 3 分子のジギトキソースよりなるジゴキシンは、ジキタリスという植物から得られる物質で、この植物以外には存在しません。また、ジゴキシゲニンは融点が 222 ℃と、熱などに強い抵抗性を示します。これらのことから、核酸のハイブリダイゼーション反応に採用されることになりました。

製品詳細はウェブをご覧ください
https://bit.ly/dig-system

【製品の技術的なお問い合わせ（テクニカルサービス）】
＜メルク製品＞　TEL：03-4531-1140　Email：jpts@merckgroup.com
＜シグマ製品＞　TEL：03-6756-8245　Email：jpts@merckgroup.com

スクリーニング時間を短縮するシングルセル解析

10x GENOMICS Compatible Products

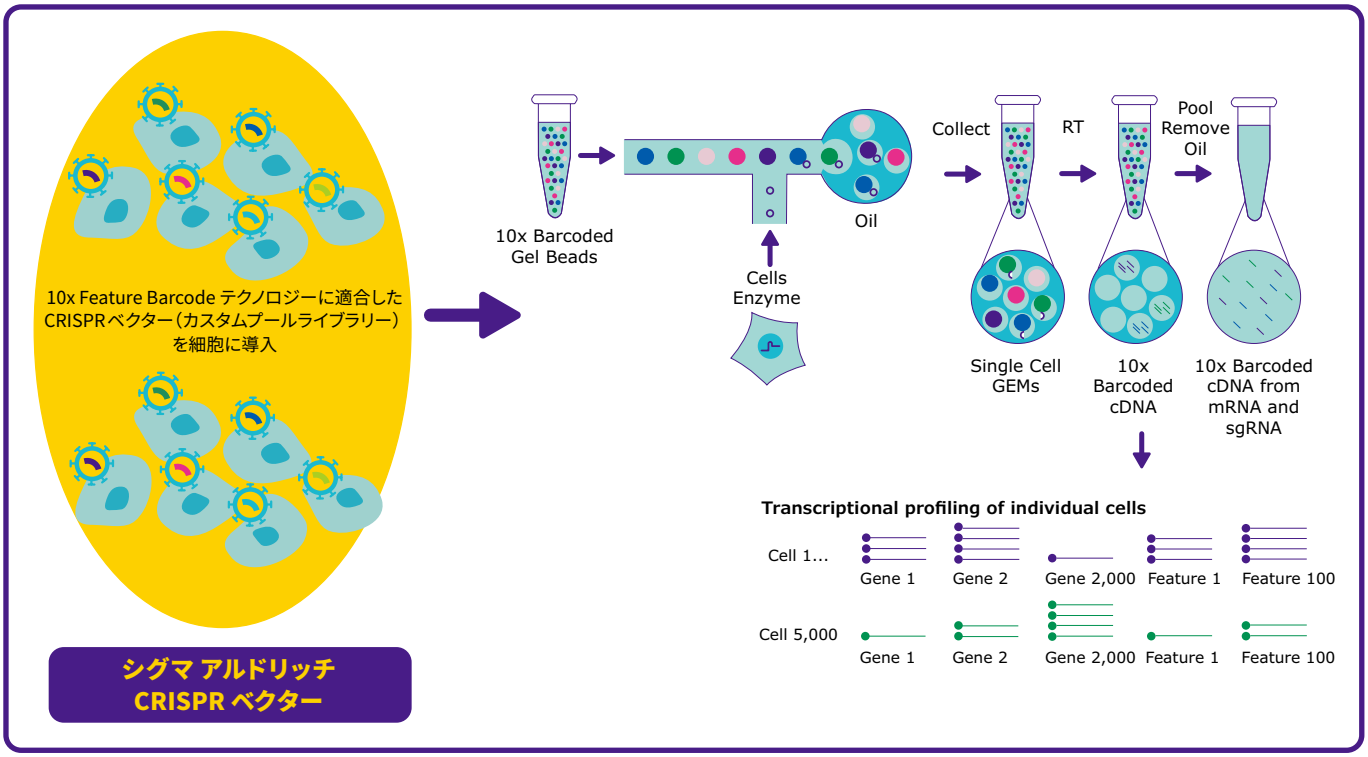
10x Genomics に適合した CRISPR スクリーニング

シグマ アルドリッチの CRISPR レンチウイルス製品は、ヒトの健康と疾患の理解に不可欠な、新たな遺伝子や情報伝達経路を発見するための有力な研究ツールです。レンチウイルスライブラリー作成における世界的なリーダーとして、弊社はさまざまな規格のカスタムプールライブラリーを設計・構築しています。この能力とともに、10x Genomics 社との提携により、シングルセルレベルでの解析を実現するための革新的プール型スクリーニング製品を生み出しています。

特長

- **シングルセルで表現型と発現系を同時に評価**
- **Feature Barcode テクノロジーに適合した CRISPR ベクター**
- **カスタムのプール型ライブラリーおよび個別のクローン、最適化用のキットをご提供**

CRISPR ベースの機能遺伝子スクリーニングでは、測定可能な表現型への遺伝子の寄与に関する概要を知ることができます。しかし、大規模スクリーニングでは、選択可能な表現型以外には限られた機能情報しか得られません。一方、シングルセル解析では、候補遺伝子のゲノムワイドなトランスクリプトームプロファイリングを中心とした、ハイコンテンツな情報が得られます。弊社は、Feature Barcode テクノロジーを利用する Chromium Single Cell Gene Expression v3.1 (Next GEM) ソリューションに適合した、最適にカスタマイズされたレンチウイルスベクターをご提供しています。



10x シングルセル CRISPR アッセイを実行する際は、各標的 gRNA につき細胞 100 ～200 個が回収され、非標的 gRNA を含む細胞 500 ～1,000 個が回収されるように、カスタムプールを構築することをおすすめします。例えば、回収される 10,000 個の細胞を標的にしたい場合は、ガイドプールの 10%を非標的 gRNA で構成し、それ以外の 90%を標的 gRNA にします。この例における標的 gRNA は、それぞれがガイドプール全体の 2%以上を占めていることが推奨されます。実行される細胞が多いほど、プールにおいて非標的 gRNA が占める割合は小さくなります。

詳細のお問い合わせは jpts@merckgroup.com へ
お見積・ご請求につきましては、弊社製品取扱販売店にお問い合わせください。

詳細はこちら
https://bit.ly/10xsinglecell

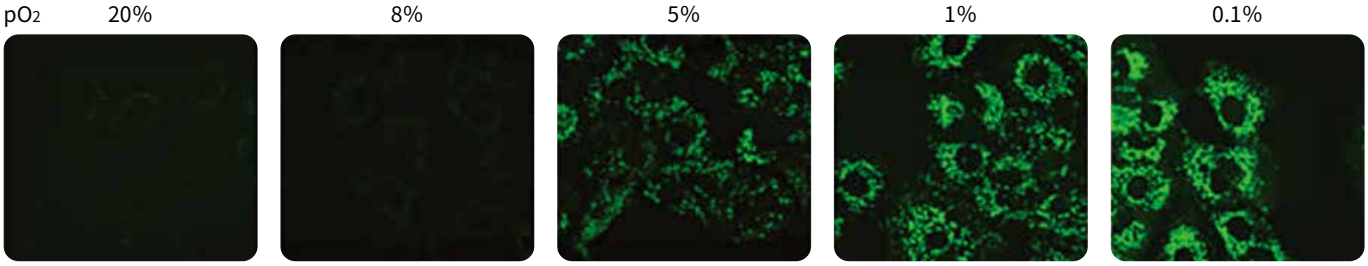
販売取扱について：カタログ番号を青で表記している製品の取扱いはメルク株式会社、赤で表記している製品の取扱いはシグマ アルドリッチジャパン合同会社となります。ご確認のうえ、各社へご注文くださいますようお願い申し上げます。

ライブセルイメージング色素

がん微小環境の研究に低酸素状態をイメージング

臓器、組織、または細胞における酸素の減少または欠如は低酸素状態として定義されます。生体組織の低酸素状態は、がんや虚血などのさまざまな病態と密接に関連しています。低酸素状態を測定するための従来法の低酸素検出プローブ（ピモニダゾールなど）は、染色するために細胞を固定する必要があり、リアルタイムで状態を把握することができませんでした。

BioTracker 520 Green Hypoxia Dye（カタログ番号：SCT033）は、生細胞の低酸素状態を検出するための蛍光イメージングプローブです。このプローブは、酸素レベルの低下に伴って緑色の蛍光強度が増加します。生細胞の蛍光イメージングや、フローサイトメトリーアプリケーションに使用できます。



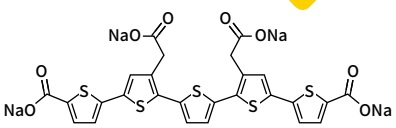
がん細胞における低酸素状態の測定
BioTracker 520 Green Hypoxia Dye を使用した、各酸素濃度での生細胞 A549 の蛍光イメージング。
酸素濃度の低下に伴い、本プローブによる蛍光強度の増加が確認されました。

製品名	ターゲット	励起 Ex（nm）	蛍光 Em（nm）	内容量	カタログ番号
BioTracker 520 Green Hypoxia Dye	低酸素	498	520	5 x 25 µg	SCT033
BioTracker ATP-Red Live Cell Dye	ATP（生細胞）	510	570	1 mg	SCT045
BioTracker Cystine-FITC Live Cell Dye	グルタチオン合成	450	525	1 mg	SCT047
BioTracker Green Sulfane Sulfur live cell dye	サルフェン硫黄	495	525	3 x 60 nmol	SCT211

タウ繊維、Aβプラークを生きた神経細胞で染色できる蛍光プローブ

BioTracker Tau filaments pFTAA Live Cell Dye は、アミロイドβ（Aβ）プラークとタウ神経原線維変化（NFT）に結合する新しい蛍光プローブです。アルツハイマー病（AD）のマウスの脳組織切片で Aβと NFT の染色に利用されます。

- 励起　405 nm
- 蛍光　550 nm



pFTAA

製品名	内容量	カタログ番号
BioTracker Tau filaments pFTAA Live Cell Dye	1 mg	SCT066

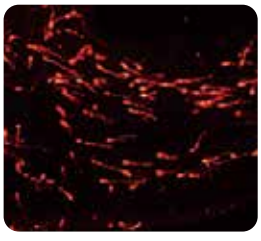
実績多数

長期間の生細胞トラッキングは使用実績多数の PKH 色素

PKH 色素は強い蛍光発色部位と結合した脂質親和性の長い尾部を持っています。PKH 色素を細胞に短時間（1～5 分）処理するだけで、この尾部が細胞膜に侵入し、蛍光発色部位は細胞の外表面に留まります。非特異的に細胞を鮮明な蛍光で標識することが可能なため、多くの種類の細胞で使用されています。

製品名	色・波長	半減期※	内容量	カタログ番号
PKH26 Red	励起 551nm 蛍光 567nm（赤）	100 日以上	色素 25 回分、希釈液 5 回分	MINI26-1KT
			色素 125 回分、希釈液 30 回分	PKH26GL-1KT
PKH67 Green	励起 490nm 蛍光 504nm（緑）	10-12 日	色素 25 回分、希釈液 5 回分	MINI67-1KT
			色素 50 回分、希釈液 30 回分	MIDI67-1KT
			色素 125 回分、希釈液 30 回分	PKH67GL-1KT

※ *in vivo* 非分裂細胞における蛍光半減期



PKH26 で標識した初期遊走性ニューロン

ライブセルイメージング試薬の詳細はこちら
https://bit.ly/pkh_cellvue

【製品の技術的なお問い合わせ（テクニカルサービス）】 ＜メルク製品＞ TEL：03-4531-1140 Email：jpts@merckgroup.com
＜シグマ製品＞ TEL：03-6756-8245 Email：jpts@merckgroup.com

アプリケーションノート

呼吸器疾患・肺疾患モデル
継代可能なヒト気管支細胞株

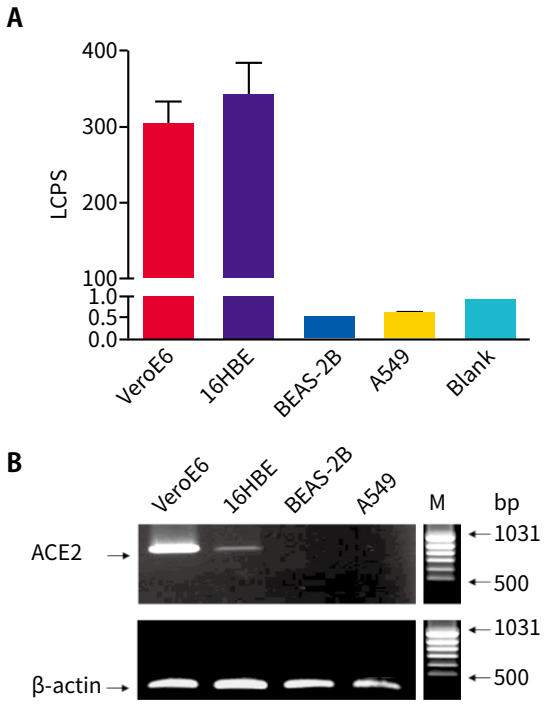
気管支上皮細胞は、肺への主要な気道に沿って機能的なバリアを構成し、呼吸器病原体に対する防御の重要なラインとなっています。呼吸器疾患と上皮細胞の間の相互作用を理解するために生理学的モデルは不可欠です。

16HBE14o- ヒト気管支上皮細胞株（カタログ番号：SCC150）は、心肺疾患患者から単離した細胞を株化した細胞株で、複製起点に欠陥を有する SV40 プラスミド（pSVori-）により不死化されています。この細胞株は分子メカニズムの研究に適したモデル細胞として有用で、嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子（CFTR）の mRNA およびタンパク質を高レベルで発現しています。16HBE14o- は分化した正常気管支上皮細胞に認められる以下の特徴を保持しています。

- **玉石状形態**
- **サイトケラチン発現**
- **タイトジャンクション（TJ）を形成する能力**
- **指向性イオン輸送**
- **経上皮電気抵抗（TEER）を形成する能力**
- **ALI 培養で機能性繊毛の形成**

弊社は、カリフォルニア州立大学サンフランシスコ校、NIH Cystic Fibrosis Research Center の Gruenert 研究室からライセンス供与された肺上皮細胞株の全コレクションを、呼吸器疾患研究用に提供しています。これらの細胞株に関する多くの論文が発表されており、嚢胞性線維症、喘息、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、肺がん、大気汚染への曝露、紙巻きたばこや電子たばこ喫煙の影響、さらにはインフルエンザ H1N1、SARS-CoV、MERS-CoV、SARS-CoV-2 による感染症など、*in vitro* における肺のさまざまな疾患モデルとして有用であり、貴重なモデル細胞です。

SARS-CoV-1 ウイルスの細胞内侵入に関する研究に使用された 16HBE 細胞株



ヒト気管支上皮細胞の SARS-CoV ウイルスに対する感受性試験。RT-PCR により、16HBE 細胞株における ACE2 発現が検出可能であることを示しています。

参考文献

PLoS One. 2009;4（11）:e7870. Published 2009 Nov 17. doi:10.1371/journal.pone.0007870
Curr Microbiol. 2013 Oct;67（4）:431-6. doi: 10.1007/s00284-013-0381-y
PLoS One. 2014 Jul 3;9（7）:e101469. doi: 10.1371/journal.pone.0101469

製品名	製品情報	内容量	カタログ番号
16HBE14o- Human Epithelial Cell Line	Bronchi Wt/Wt	≥ 1X10^6	SCC150

ライセンスについて

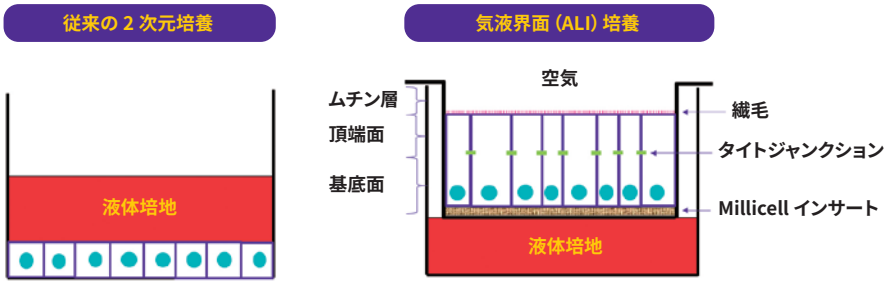
学術使用契約（Academic Use Agreement）

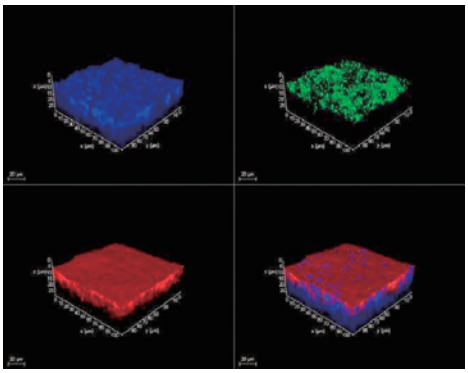
大学などの非営利組織のお客様は基礎研究用途の場合、ライセンス契約は不要です。
応用研究以降はライセンス契約が必要になります。
企業など営利組織のお客様は、基礎研究用、応用研究以降を問わず、ご購入前のライセンス契約が必須です。

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。ご確認のうえ、各社へご注文くださいますようお願い申し上げます。

気液界面（ALI）培養

16HBE14o- 細胞株などヒト気管支上皮細胞は、3 次元 気液界面（Air-Liquid Interface, ALI）培養技術を用いることにより成熟細胞表現型を有する肺細胞へと分化します。ALI 培養で生育した気管支上皮細胞では、極性（頂端面と基底面）、多様な分化細胞型（杯細胞、クラブ細胞、繊毛細胞、基底細胞など）、密着結合性および繊毛運動が認められます。気液界面細胞培養系では、ミリセルやトランスウェルインサートを用いて物理的バリアーを設けることで、疑似的な多層の気道上皮を構築することができます。





16HBE14o- ヒト気管支上皮細胞の気液界面（ALI）培養
16HBE 細胞は気液界面（ALI）培養によって、タイトジャンクション（ZO-1）と上皮バリア機構のある極性を示します。

上皮細胞の培養

Millicell®（ミリセル）セルカルチャーインサートによって、培養細胞をバソラテラル側ならびにアピカル側の両側から培地に接することが可能になります。このことで、気液界面（ALI）培養に使用され、*in vivo* の細胞により近い状態で形態と機能を調べることができます。

ミリセルセルカルチャーインサート、24 ウェル、12 ウェル、6 ウェルプレート用をご用意しています。

製品名	カタログ番号
Millicell ERS-2 Voltohmmeter	MERS00002
Millicell Hanging Cell Culture Insert, PET 0.4 µm, 6-well, 48/pk	MCHT06H48
Millicell Hanging Cell Culture Insert, PET 0.4 µm, 12-well, 48/pk	MCHT12H48
Millicell Hanging Cell Culture Insert, PET 0.4 µm, 24-well, 48/pk	MCHT24H48
Millicell Hanging Cell Culture Insert, PET 1 µm, 6-well, 48/pk	MCRP06H48
Millicell Hanging Cell Culture Insert, PET 1 µm, 12-well, 48/pk	MCRP12H48
Millicell Hanging Cell Culture Insert, PET 1 µm, 24-well, 48/pk	MCRP24H48

日々さまざまなお問い合わせを受けるテクニカルサービスより

Millicell セルカルチャーインサートについてよくあるご質問にお答えします。

Millipore®
Preparation, Separation,
Filtration & Monitoring Products

Q：孔径 1.0 µm と 0.4 µm では、どちらが細胞培養に適していますか？

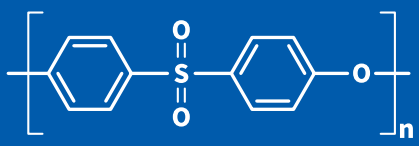
A：細胞の大きさは、数 µm ～です。1.0 µm と 0.4 µm いずれも細胞より十分小さく、タンパク等の透過には十分大きい孔径ですので、どちらでも細胞培養には問題ありません。孔径 1.0 µm のものは孔密度が低いことから、顕微鏡観察がしやすくなっています。顕微鏡観察するのであれば 1.0 µm を推奨します。孔径が 3 µm まで大きくなると、孔に細胞がおちこみ均一な単層になっていない場合などが確認されることがあります。

さらに詳しく知りたい方は ››

「マルチウェルツールカタログ MultiScreen® & Millicell」の P21「フィルター材質と特長」や、P22 の「フィルター材質と孔径選択ガイド」をご覧ください。
https://www.sigmaaldrich-jp.com/catalog/?freeword=wam001

【製品の技術的なお問い合わせ（テクニカルサービス）】 <メルク製品> TEL：03-4531-1140 Email：jpts@merckgroup.com
<シグマ製品> TEL：03-6756-8245 Email：jpts@merckgroup.com

Millipore®
Preparation, Separation,
Filtration & Monitoring Products



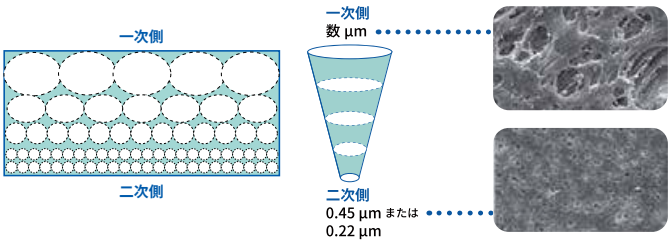
Millipore だけの特別な PES 膜
ミリポアエクスプレスプラス

ミリポアの数あるメンブレンの中でもイチオシの材質が親水性 PES 膜のミリポアエクスプレスプラスです。PES（ポリエーテルスルホン）を材質としてつくられるメンブレンは他のメーカーでもありますが、ミリポアの PES 膜の優れた点は何処にあるのでしょうか。

毎日のろ過作業をより楽に、より速くするフィルター構造

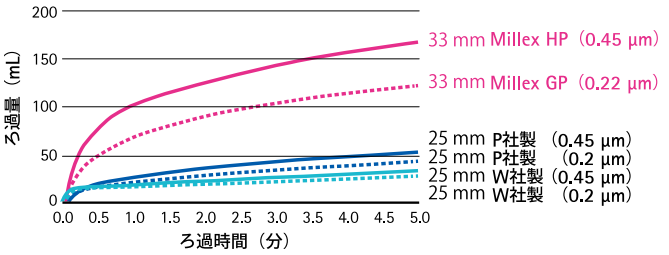
一般的に「**目詰まりしにくい**」「**高スループット**」「**高流量**」「**低タンパク質吸着**」といった項目が PES 膜の特長として挙げられ、粘性のあるサンプルや夾雑の多い溶液をろ過する際に用いられます。
これらの特長は、より大きな孔径を有するメンブレンの一次（上流）側と小さな孔径を持つ二次（下流）側が存在する**非対称構造**によって生みだされます。
ミリポアの親水性 PES メンブレン（ミリポアエクスプレスプラス）はこの非対称構造の精度が高く、一次側が効率的にプレフィルターとしての機能を発揮することで、より目詰まりが起きにくく、低圧力で軽快なろ過を行うことを実現します。
これにより、シリンジフィルターでは「**押す親指が痛くならない、スッと押せる**」、ボトルトップフィルターでは「**流速が落ちにくく大容量でもスムーズなろ過ができる**」のです。

ミリポアエクスプレスプラスの構造模式図



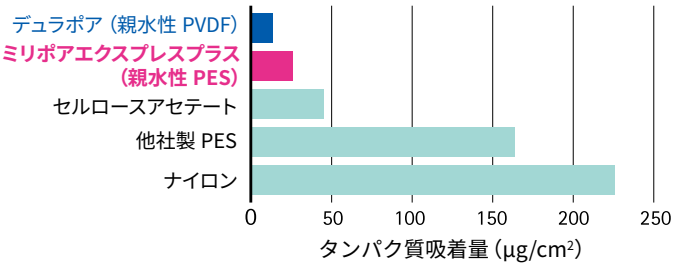
上から下にろ過が進むにつれて孔径が小さくなる特殊な膜構造が目詰まりしにくい効率的なろ過を実現します。

経過時間によるろ過流量比較



マイレクスGPとHPは同じ孔径の他社製フィルターと比較して2.5倍以上のろ過流量が得られました。

他のメンブレンに比べて低いタンパク質吸着



セルロースアセテート（CA）膜や他社 PES 膜と比較し非常に高いタンパク質低吸着性能であることが分かります。

ミリポアエクスプレスプラスが採用されている製品例

NEW

最適なフィルターを簡単に見つけられます！

マイレクスファインダー

マイレクスファインダー　検索

- モバイル対応
- サンプル依頼可能
- 発注書作成可能

**いくつかの質問に答えるだけで、
用途にぴったりのシリンジフィルターを簡単に選べる
「マイレクスファインダー」ができました。お気軽におためしください！**

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。ご確認のうえ、各社へご注文くださいますようお願い申し上げます。

ハンディ型自動セルカウンター
Scepter 3.0

NEW

細胞カウントをもっと手軽に！

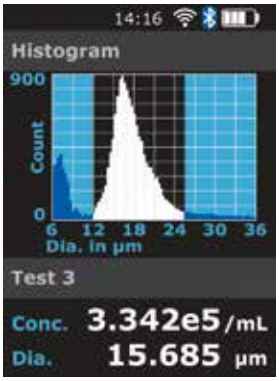
Scepter 3.0 はフローサイトメーターなどでも採用されているコールター法を採用した小型ハンディタイプのセルカウンターです。
これまで時間のかかっていたセルカウント作業が 30 秒未満で行えるようになります。

セルカウントの自動化により個人差の低減だけでなく、データの管理や測定データを活用したレポートの作成なども容易になります。

Scepter 3.0 の特長

- **高精度の測定解析機能をピペットサイズに凝縮**
- **計数方式には電気的検知帯法（コールター法）を採用**
- **測定結果をパソコンにダウンロードすれば、専用解析ソフトウェアでの解析が可能**
- **本体は USB 充電式**
- **USB/Wi-Fi/Bluetooth でのデータエクスポートが可能**
- **ディスポーザブルチップによりお手入れも簡単**

Scepter 3.0 ソフトウェア



本体モニタに表示される項目

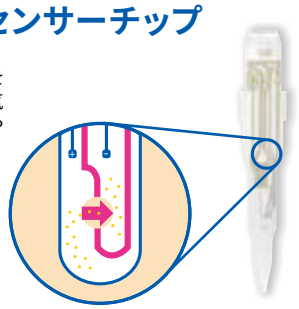
- **細胞濃度**
- **平均細胞径**
- **平均細胞体積**
- **細胞のサイズまたは体積分布のヒストグラム**

ソフトウェアでできること

- **最大 999 件のヒストグラムを保存可能**
- **Microsoft Excel へのデータエクスポートによりデータの加工が可能**
- **Bluetooth接続により直接プリントアウト可能**

Scepter 3.0 センサーチップ

矢印の部分（アパチャー）を細胞や粒子が通る際の電気抵抗の変化を捉え、数や体積を測定します。



アパチャー径	測定可能細胞数 (cells/mL)	有効測定細胞直径
40 µm	5×10^4 ～ 1.5×10^6	5 ～ 15 µm
60 µm	1×10^4 ～ 5×10^5	8 ～ 25 µm

ヒストグラムの活用方法

Scepter3.0 で作成されるサイズ分布のヒストグラムにより目的の細胞のポピュレーションに関する情報を得ることができ、ゲーティング機能を使いカウント数から外れ値やデブリを除外することが可能です。また、ヒストグラムにおける変化は培養条件の変化を反映している場合があり、これらの変化をモニターすることで培養細胞の品質や一貫性を評価することができます。

製品名	入数	カタログ番号
Scepter 3.0 セルカウンター一式（40 µm センサー）*1	1	PHCC340KIT
Scepter 3.0 セルカウンター一式（60 µm センサー）*1	1	PHCC360KIT
Scepter 3.0 セルカウンター	1	PHCC30000
Scepter 3.0 40 µm センサー	50	PHCC340050
	250	PHCC340250
	500	PHCC340500
Scepter 3.0 60 µm センサー	50	PHCC360050
	250	PHCC360250
	500	PHCC360500
Scepter 3.0 テストビーズ、5 mL	1	PHCC3BEADS
Scepter 3.0 充電ステーション	1	PHCC3CHARG
Scepter 3.0 充電ステーション用マウントキット	1	PHCC3WKIT

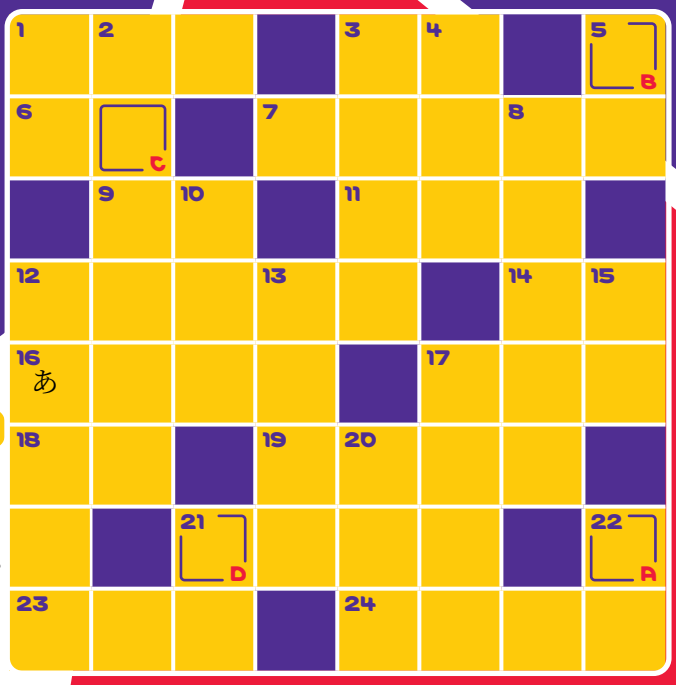
*1　構成：本体、センサー 50 本、テストビーズ、充電ステーション

【製品の技術的なお問い合わせ（テクニカルサービス）】
<メルク製品>　TEL：03-4531-1140　Email：jpts@merckgroup.com
<シグマ製品>　TEL：03-6756-8245　Email：jpts@merckgroup.com

クロスワードで ハカセと対決！

A～Dをならべて、できることばは？

A	B	C	D



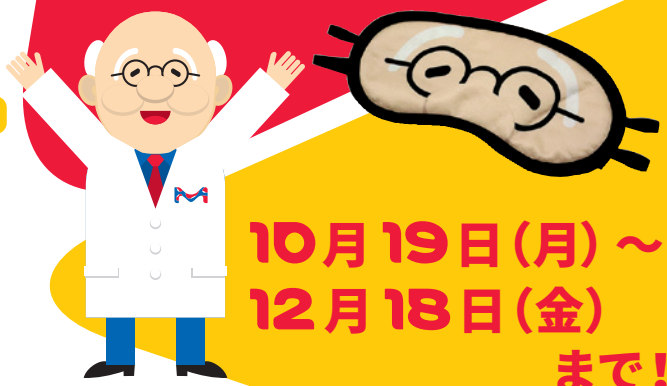
タテのキー

1 回らない寿司屋では、価格表にこう書かれていることが……。
2 ミリポアエクスプレスプラスは目詰まりしにくく、高○○○○○○です。
3 ハンディタイプのセルカウンター。新製品として 3.0 が登場。
4 霊長類の科のひとつ。ヒト亜科とオランウータン亜科で構成される分類。
5 マクスウェルは、電○○学において多大な功績を残しました。
8 長い論文には、それを要約したこれを付加したものもあります。
10 科学者になる人は、○○○系の大学を出た人が大半です。
12 複数の楽曲から成る音楽。スイートとも言います。
13 初期のコンピュータでよく用いられたデータエラーの検出技術。○○○○チェック。
15 ソビエト連邦の月探査計画の名前にもなった、ローマ神話の月の女神の名前は？
17 実際の物理量を正確に○○○○するのは、科学にとって大事なことです。
20 板状に加工した木材には、柾目（まさめ）板と、○○○板があります。
21 ○○から抽出した放線菌で新薬を開発する方法は、今も盛んに行われています。
22 原子番号４７。導電率がもっとも良い金属としても知られています。

ヨコのキー

1 教授の門下生から○○○し、自分の研究室を持つことになりました。
3 土壌にチッ素、リン、カリウムなどの肥料を施して植物の生育を促すこと。
6 主として米を、水を多くして炊いた食物。胃が弱ったときにお勧め。
7 勾配の急な鉄道で、レールの間に複数列のラックを設けた駆動方式。
9 スイカ、カボチャ、キュウリ、ヘチマ、トウガンなどは、この仲間です。
11 江戸時代後期の有名な医者・蘭学者といえば、○○○長英。
12 ゲノム編集で利用される、反復配列を含む DNA の部位。
14 オーディオアンプなどで出力段によく用いられる、プッシュ・○○回路。
16 科学の分野で勲章を受けるとは、学者○○○○につきます。
17 「アンケートに回答いただいた方には○○○を差し上げます。」
18 心の持ち方。心の広さ。人間たるもの、○○壮大でありたいですね。
19 DNA 配列によらない遺伝的な変化とその研究分野。エピジェネ○○○○。
21 ソーシャルディスタンスを保つため、各人の机の間にこれを設けました。
23 周囲よりもくぼんだ土地。一般的には盆地よりも狭い範囲の呼び方。
24 その道で特に秀でた人。将棋のタイトルのひとつ。釣り○○○○。

正解者の中から抽選で計 5 名様に、メルクオリジナル「ハカセになれるアイマスク」をプレゼントいたします。ぜひご応募ください。



10月19日（月）～12月18日（金）まで！

応募待ってるぞ！

ご応募はこちらから
https://bit.ly/SigMania07

※ 当選者は厳正な抽選の上決定し、発表は賞品の発送をもって代えさせていただきます。
※ 住所・転居先不明などにより賞品をお届けできない場合には、当選を無効とさせていただきます。
※ 当選賞品の交換、換金、返品はできませんので予めご了承ください。

Sigmania Vol.06 の正解：「スクリーニング」

個人情報の保護について:ご提供いただきました情報につきましては、賞品の発送や、弊社の製品やサービスに関しての情報をお客様に提供する以外の目的では利用いたしません。お客様からお預かりした個人情報はメルク株式会社で管理し、弊社 Web サイトにて公表している個人情報保護方針に従い取り扱いをいたします。（http://www.merck.co.jp/ja/privacy_statement/privacystatement.html）

サイエンス系お役立ちメディア M-hub
かんたんカタログ検索 カタログファインダー
メルク ライフサイエンス - メールニュース www.merckmillipore.com/wm
メルク ライフサイエンス公式 SNS、動画コンテンツをご覧ください。

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2020年10月時点の情報です。Merck, the vibrant M, Sigma-Aldrich and Millipore 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. ©2020 Merck KGaA, Darmstadt, Germany. All rights reserved.

メルク株式会社
ライフサイエンス リサーチ事業部
〒 153-8927 東京都目黒区下目黒 1-8-1 アルコタワー 5F
製品の最新情報はこちら www.merckmillipore.com/bio
E-mail: jpts@merckgroup.com Tel: 03-4531-1140

RBM182B-2204-PDF-H