

# 受託培養報告書

ダイジェスト版

「褐色脂肪細胞への薬物添加と脂肪評価」

培養期間：2011年8月10日～2011年8月19日



株式会社アステック

技術開発部 主任 坂井孝則

学術研究員 緒方貴宏 (技術士 生物工学)

<培養目的>

ラット褐色脂肪細胞を用いた細胞培養、サンプリング等の作業を行ないました。詳細は以下の通りです。

(1) 培養環境は以下の通りです。

- ① インキュベーター内二酸化炭素濃度：5.0%
- ② インキュベーター内酸素濃度：大気濃度＝約 20%
- ③ インキュベーター内温度：37.0[°C]

(2) コラーゲンコートタイプ1によるコーティング処理を行なった uClear 96well black plate に細胞を播種し、以下のような条件の培地での培養を行ないました。

- ① [A-1]：分化後に薬物添加・・・分化誘導培地+薬物 0[uM] → 脂肪細胞維持培地+薬物 15[uM]
- ② [A-2]：分化後に薬物添加・・・分化誘導培地+薬物 0[uM] → 脂肪細胞維持培地+薬物 150[uM]
- ③ [B-1]：分化中から薬物添加・・・分化誘導培地+薬物 15[uM] → 脂肪細胞維持培地+薬物 15[uM]
- ④ [B-2]：分化中から薬物添加・・・分化誘導培地+薬物 150[uM] → 脂肪細胞維持培地+薬物 150[uM]
- ⑤ [C]：薬物添加せずに培養・・・分化誘導培地+薬物 0[uM] → 脂肪細胞維持培地+薬物 0[uM]

(3) (2)に記載した条件で培養する細胞に対し、以下のタイミングでサンプリング作業を実施しました。

- ① 脂肪細胞維持メディウムへ交換 1[day]後
- ② 脂肪細胞維持メディウムへ交換 3[day]後
- ③ 脂肪細胞維持メディウムへ交換 5[day]後

サンプリングでは以下の作業を行ないました。

- ・位相差顕微鏡観察
- ・固定化処理後にナイルレッド（脂肪滴）、ヘキスト（細胞核）による蛍光顕微鏡観察
- ・固定化処理後にナイルレッド蛍光強度測定

**※本ダイジェスト報告書では「脂肪細胞維持メディウムへ交換 5[day]後」のみの結果を記載しています**

## &lt;結果&gt;

サンプリングで得たデータを基に以下の解析を行ないました。

- ・ヘキスト像による細胞数計数
- ・細胞数と脂肪滴量の棄却検定 (大きく外れた数値の除外)
- ・細胞数に対する脂肪滴量の比率を計算し、無添加条件「C」を基準 (=1) としたときの比較
- ・有意差検定 (F 検定の結果により Student's T 検定、あるいは Welch T 検定を選択)

～脂肪細胞維持メディアウムに交換し5日目での無添加条件「C」との比較と有意差 (F 検定と t 検定) ～

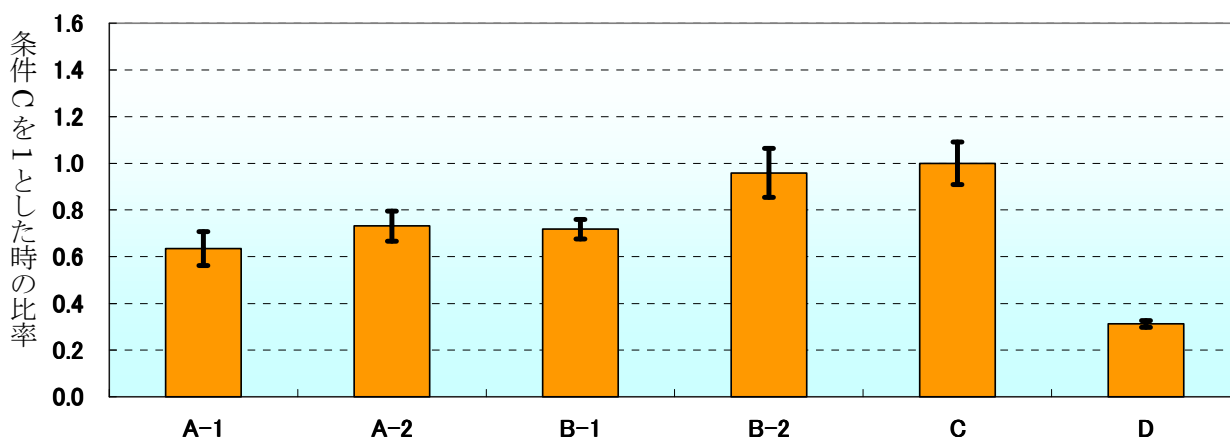


Fig.4-7-3 8/19 (→脂肪細胞維持メディアウムに交換し5日目 (通算培養9日目)) の比較  
(※:n=5~8、エラーバーは標準偏差)

## [F 検定]

Tab.4-7-5 8/19 (→脂肪細胞維持メディアウムに交換し5日目 (通算培養9日目)) の F 検定結果

¥ForReport¥2011-08-10start\_plate-reader¥2011-08-19\_arranged.xls 中の「2011-08-19\_F 検定」タブ

基準(条件C)		比較対象		F値	自由度		F α (0.05)	判定	t検定手法
n数	分散s <sup>2</sup>	実験条件	n数		分散s <sup>2</sup>	df1			
7	0.00833	A1	7	0.00531	0.64	6	6	4.28	等分散 Student
7	0.00833	A2	5	0.00411	0.49	6	4	6.16	等分散 Student
7	0.00833	B1	5	0.00175	0.21	6	4	6.16	等分散 Student
7	0.00833	B2	6	0.0109	1.31	5	6	4.39	等分散 Student

## [t 検定]

Tab.4-7-6 8/19 (→脂肪細胞維持メディアウムに交換し5日目 (通算培養9日目)) の t 検定結果

t検定手法	基準(条件C)			比較対象			t検定数値					
	n数	分散s <sup>2</sup>	平均値	実験条件	n数	分散s <sup>2</sup>	平均値	自由度df	合成分散値s	t値	t α 値(0.05)	判定
Student	7	0.00833	1.00	A1	7	0.00531	0.64	12	0.0826	8.27	2.18	有意差あり
Student	7	0.00833	1.00	A2	5	0.00411	0.73	10	0.0815	5.63	2.23	有意差あり
Student	7	0.00833	1.00	B1	5	0.00175	0.72	10	0.0755	6.37	2.23	有意差あり
Student	7	0.00833	1.00	B2	6	0.0109	0.96	11	0.0974	0.758	2.20	有意差なし

## [条件 C との比較結果まとめ]

- ・ C vs A-1 (分化後から 15[uM]薬物) → 有意水準 0.05 で有意差あり
- ・ C vs A-2 (分化後から 150[uM]薬物) → 有意水準 0.05 で有意差あり
- ・ C vs B-1 (分化中から 15[uM]薬物) → 有意水準 0.05 で有意差あり
- ・ C vs B-2 (分化中から 150[uM]薬物) → 有意差なし

## <結論>

今回の培養の結果から以下の事象が明らかとなりました。

- ① 分化誘導を行っていない条件「D」であっても脂肪滴の形成は見受けられますが、分化誘導を行なった他条件と比較すると圧倒的に量が低いことが確認されました。
- ② 脂肪細胞維持メディアムに交換して1日目での細胞当たりの脂肪量は、未添加条件「C」とほぼ変わりません。唯一、条件B-2(分化中から150[uM]薬物)において細胞当たりの脂肪量が、未添加よりも有意に高いという結果を得ておりますが、不等分散での検定(Welchのt検定)であるため、やや信頼性に欠ける(n数を増やしたら等分散となる可能性があります)とも言えます。
- ③ 脂肪細胞維持メディアムに交換して3日目での細胞当たりの脂肪量は、未添加条件「C」とほぼ変わりません。有意差も認められませんでした。
- ④ 脂肪細胞維持メディアムに交換して5日目での細胞当たりの脂肪量は、未添加条件「C」と比較すると条件A-1(分化後から15[uM]薬物)、A-2(分化後から150[uM]薬物)、B-1(分化中から15[uM]薬物)において、有意に低いという結果を得ております。比較する数値群は等分散であるため、信頼性も高いものと思われま
- ⑤ 上記④において、細胞当たりの脂肪量が最も低い条件はA-1(分化後から15[uM]薬物)でした。
- ⑥ 上記④において、条件B-2(分化中から150[uM]薬物)では有意差を得られませんでした。推定細胞数を確認すると、条件B-2ではこれが少ないことがわかります。このことが細胞当りの脂肪量に影響しているものと思われま
- ⑦ 薬物を添加した各培養条件では、程度の差はあれど薬物無添加の条件Cと比較して、脂肪細胞維持メディアムでの培養日数が経過するにつれて減少傾向にあることがわかります。

## <返却データ一覧>

### ～印刷物～

#### ○ファイル

- ・ 本報告書「褐色脂肪細胞への薬物添加と脂肪評価」1部
- ・ 作業手順報告書・23：(XXIII) 増殖用メディアムに交換 の複写1部
- ・ 作業手順報告書・24：(XXIV) 各培養容器に継代 の複写1部
- ・ 作業手順報告書・25：(XXV) 分化誘導用メディアムに交換 の複写1部
- ・ 作業手順報告書・26：(XXVI) 脂肪細胞維持メディアムに交換 の複写1部
- ・ 作業手順報告書・27：(XXVII) 脂肪評価サンプリング の複写1部

### ～電子媒体～

#### ○CD「2011年8月10日開始 Report & DATA1」

- ・ 本報告書のwordファイル：培養報告書\_2011-08-10start.doc
- ・ 本報告書作成に使用したデータ一式を格納したフォルダ：「ForReport」フォルダ
- ・ 位相差顕微鏡の画像生データ格納フォルダ：「PhaseContrast-rawDATA」フォルダ
- ・ ホルマリン固定後の対物10倍顕微鏡画像生データ格納フォルダ：「Fixed-rawDATA」フォルダ

#### ○CD「2011年8月10日開始 DATA2」

- ・ ホルマリン固定後の細胞数計数用ヘキスト画像生データ格納フォルダ：「For-counting-rawDATA」フォルダ
- ・ ImageJによる個数解析データ格納フォルダ：「countingDATA」フォルダ
- ・ プレートリーダーによる計測生データ格納フォルダ：「platereaderDATA」フォルダ

以上です