

受託培養

作業手順仕様書

褐色脂肪細胞への薬物添加と脂肪評価

培養期間（予定）：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 生物学）

<1.目的と培養期間など>

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す。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す。(詳細な培養スケジュールを後述しております)

- 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す。

- 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

作業期間およびサンプル納期、データ納期は以下のとおりとします。

- ・ 培養期間：2011年8月10日～2011年8月19日
- ・ データ（報告書以外の生データ、まとめたデータ含む）納期：2011年8月24日
- ・ 報告書納期：2011年8月31日

<2.実験方法>

～2-1.使用細胞と培養容器～

他社様より販売されている褐色脂肪細胞培養キット（ラット）を使用します。
弊社で使用する培養容器は、以下の通りです。

- ・ グライナーバイオ社 uClear 96 well black plate（滅菌品）
- ※ 事前に各ウェルへコラーゲンタイプ1を9.5[ug]コートします。
- ※ 1つのウェルに 1.0×10^4 [cells]播種します（播種密度= 3.0×10^4 [cells/cm²]

～2-2.作業スケジュール～

作業スケジュールを Tab.1 に記します。

Tab.1 培養作業スケジュール

day	date	action	使用培地
0	2011/8/10	(X X III) 増殖用メディウムに交換	増殖用メディウム
1	2011/8/11	(X X IV) 各培養容器に継代	増殖用メディウム
2	2011/8/12	(X X V) 分化誘導用メディウムに交換	分化誘導メディウム(+薬物)
3	2011/8/13		↓
4	2011/8/14	(X X VI) 脂肪細胞維持メディウムに交換	脂肪細胞維持メディウム(+薬物)
5	2011/8/15	(X X VII) 脂肪評価サンプリング	↓
6	2011/8/16		↓
7	2011/8/17	(X X VII) 脂肪評価サンプリング	↓
8	2011/8/18		↓
9	2011/8/19	(X X VII) 脂肪評価サンプリング	↓

～2-3.サンプリング作業と必要細胞数～

○細胞核と脂肪滴の蛍光観察

(X X VII) 脂肪評価サンプリングでは、以下のような作業を行ないます。

- ① 位相差顕微鏡像を各培養条件から1枚ずつ撮影します。
- ② その後、細胞を「10%ホルムアルデヒド中性緩衝液」で固定化します。
- ③ 「Hoechst33342」で核を染色します。
- ④ D-PBS(-)で細胞を洗浄した後、「ナイルレッド」で脂肪滴を染色します。
- ⑤ D-PBS(-)で細胞を洗浄した後、脂肪滴の蛍光強度をマイクロプレートリーダー（青色励起→緑色検出：トリグリセリド結合型ナイルレッドをより鋭敏に捉えるための設定です）で定量します。
- ⑥ 「Hoechst33342」で染色された核を、蛍光顕微鏡（UV 励起→青色波長以上検出）で撮影します。
- ⑦ 各培養条件から1枚ずつ「位相差像」「Hoechst33342 蛍光像」「ナイルレッド蛍光像」を撮影します。
- ⑧ ⑤および⑥の結果から、細胞1個あたりのナイルレッド蛍光強度を計算し、評価を行ないます。

以上です