

初代細胞製品（培養細胞）

褐色脂肪細胞培養キット F-1, F-8(ラット)

【Brown Adipocyte Culture kit, 品番：BAT01,BAT02】

2024年7月1日改訂

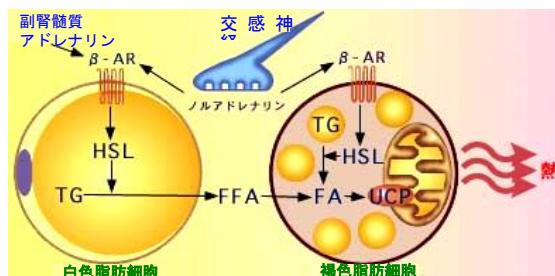
本製品は研究目的にのみご使用になれます。

I. 製品概要

褐色脂肪組織は、過剰に摂取したエネルギーを脂肪として蓄えると同時に、脂肪のエネルギーを直接熱として体外に放出する特殊な働きを持っています。また、交感神経から分泌されるノルアドレナリンのβ作用により、エネルギー消費の自動調節にも寄与しています。

本培養キットは、ラット褐色脂肪組織より褐色脂肪前駆細胞を初代培養（Primary Culture）し、Semi-Confluent まで増殖したところで発送しております。入荷時の初代培養細胞、あるいは適当な培養皿もしくはマルチプレートに継代した細胞を培養方法に沿って培養しますと、徐々に褐色脂肪細胞へと分化いたします。

本培養系を用いて、褐色脂肪細胞の脂質代謝実験、熱エネルギー放出実験、褐色脂肪細胞の機能解明あるいは新規β³作動薬のスクリーニング等が可能です。



II. 使用前注意事項

本マニュアルを使用前に必ずご確認ください。

本製品はすべて【無菌操作】で実施して下さい。バイオセーフティーレベルは【レベル1】です。

本製品の培養には付属の専用メディウムをご使用下さい。

III. 製品の保証について

製品は培養された状態で納品されます。到着後すぐに CO₂ インキュベーターに入れて培養を開始してください。

製品は保存できません。到着後速やかに実験にご使用ください。

製品は到着時又は翌日に細胞の状態を確認して下さい。

専用メディウム及び試薬を用いてマニュアル通りに培養された場合のみ、製品到着後の生育不良に関して保証いたします。保証期限は【製品お受け取りから翌日まで】です。

また、増殖不良や分化不良に関しては、製品サポートまでお問い合わせ下さい。

メディウムや使用方法に変更を加えられた場合は、保証の対象になりませんのでご注意ください。

IV. 製品構成

キット構成	F-1 キット	F-8 キット
褐色脂肪前駆細胞	25cm ² フラスコ×1 本	25cm ² フラスコ×8 本
増殖用メディウム	125ml ×1 本	250ml ×1 本
分化誘導用メディウム	100ml ×1 本	250ml ×1 本
脂肪細胞維持メディウム	125ml ×1 本	500ml ×1 本

※専用メディウムは単品販売もごさいます。

使用動物組織 : SD ラット・新生児 (2~4 日齢)
 細胞採取日 : XXXX 年 XX 月 XX 日
 発送日 : XXXX 年 XX 月 XX 日
 Lot No. : XXX-X-XXX

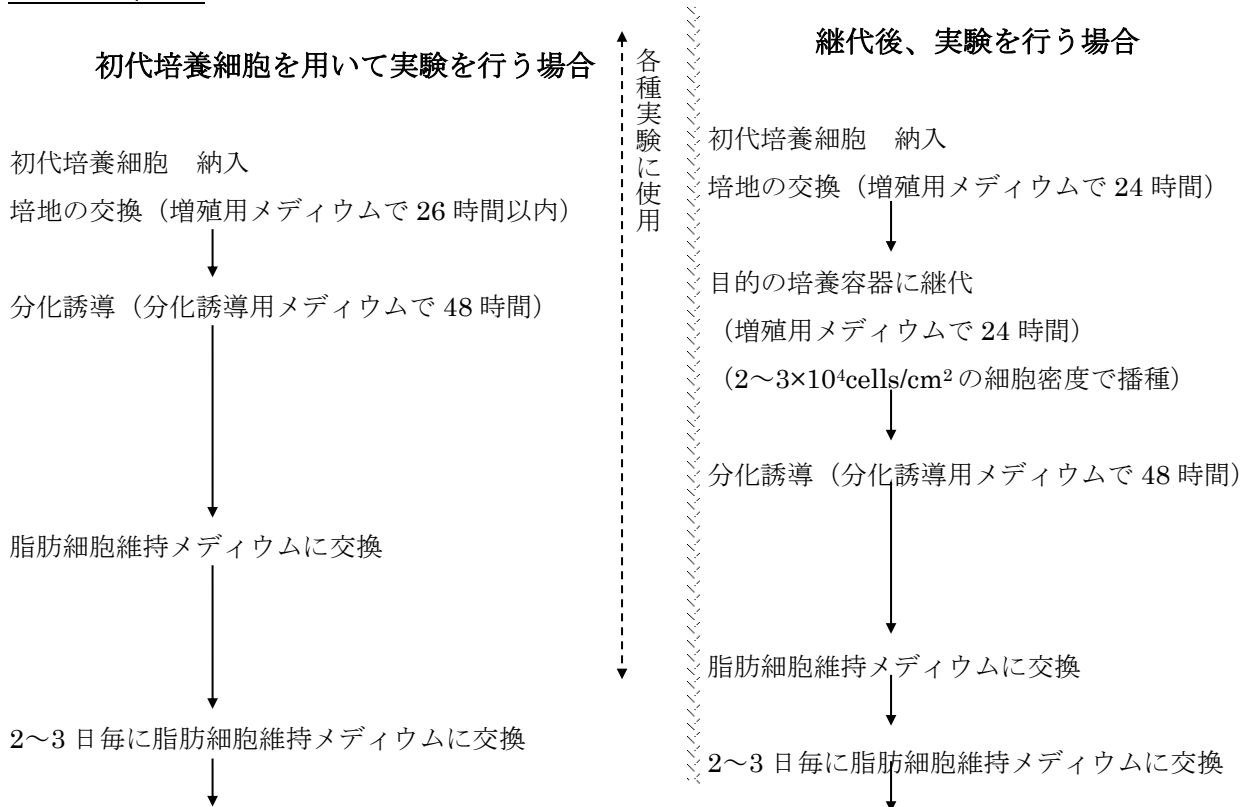
V. 各メディウムの組成

品名	主成分
増殖用メディウム	D-MEM (high glucose)、血清、その他
分化誘導用メディウム	D-MEM (high glucose)、血清、Dexamethasone、Insulin、その他
脂肪細胞維持メディウム	D-MEM (high glucose)、血清、Insulin、その他

VI. 操作方法

※本製品は【1回継代可能】です。

フローチャート



ラット褐色脂肪前駆細胞は、出荷時にフラスコ内を増殖用メディウムで満たした状態で禁冷凍発送しております。商品がお手元に届きましたら、直ちに位相差顕微鏡にて細胞を観察し細胞が剥離していないかご確認下さい。

またラット褐色脂肪細胞は、継代を繰り返すことによりその分化能が低下します。各種実験は、商品到着時の初代培養細胞、もしくは1度だけ継代した細胞を用いて行って下さい。

初代培養細胞を用いて培養を行う場合

1. 輸送用に加えてあるメディウムを無菌的に吸引除去し、室温に戻した増殖用メディウムを各フラスコに5mlずつ加える。
2. 翌日、細胞がほぼコンフルエントに達したのを確認後、増殖用メディウムを吸引除去し、室温に戻した分化誘導用メディウムに交換する（分化誘導用メディウムで48時間）。

注1) 細胞がフルコンフルエントに達した後に分化誘導を行いますと、細胞が剥離し易くなったり、その後の分化能が低下することがあります。分化誘導は、商品が到着して増殖用メディウムに交換した後26時間以内に行ってください。

3. 脂肪細胞維持メディウムに交換し、5~7日間培養する。徐々に脂肪滴が蓄積していく様子が観察できる。脂肪細胞維持メディウムに交換後、5~7日間培養以内に実験されることをお勧めいたします。

注2) これ以上培養日数を延ばしたい場合はメディウム交換しさらに培養を継続することができませんが、細胞が剥離しやすくなりますので取り扱いには慎重にしてください。

継代後、実験を行う場合

【準備するもの】

- ・滅菌済みPBS(-)；Ca、Mgを含まない生理的リン酸緩衝溶液
- ・トリプシン溶液；Trypsin-EDTA (0.05%)
- ・実験に使用する培養用フラスコ、マルチプレート等。（コラーゲンコーティング済みのもの）

1. 輸送用に加えてあるメディウムを無菌的に吸引除去し、室温に戻した増殖用メディウムを各フラスコに5mlずつ加えた後、フラスコのキャップをゆるめた状態で5%CO₂存在下37℃インキュベーターで培養してください。
2. 翌日、細胞がほぼコンフルエントに達したのを確認後、増殖用メディウムを吸引除去し、室温に戻した滅菌済みPBS(-)5mlでフラスコ内を洗浄する。

注3) 細胞がフルコンフルエントに達した後に継代を行いますと、細胞が接着しにくくなったり、その後の分化能が低下することがあります。

3. 洗浄に用いたPBS(-)を吸引除去する。
4. 室温に戻したトリプシン溶液3mlを加えてフラスコ底面全体に行き渡らせ、すぐさま余分なトリプシン溶液を抜き取る。細胞が丸くなったのを位相差顕微鏡で確認後、軽く手のひらでフラスコをたたき、細胞がフラスコから剥がれて流動する様子が観察されるまでトリプシン処理を行う。

注4) 細胞がフラスコから剥がれにくい時は、数分インキュベーターに入れて加温して下さい。長時間（15分以上）のトリプシン処理は、その後の分化能が低下することがあるので避けて下さい。

5. 細胞が剥がれたのを確認後増殖用メディウムで細胞を回収し、2100rpmで10分間遠心して上清を吸引除去する。
6. 増殖用メディウムを加えて細胞懸濁液を調製し、細胞数をカウントする。
7. 細胞懸濁液を翌日細胞がコンフルエントになる細胞密度に増殖用メディウムを用いて希釈し、コラーゲンコート済みの培養容器（フラスコ、マルチプレート等）に播種する。
2~3×10⁴cells/cm²の細胞密度で播種すると、ほぼ1日でコンフルエントに達する。

目安として1フラスコから25cm²フラスコを使用する場合3フラスコ、24Wellプレートの場合1.5プレート分に継代可能です。

8. 継代翌日、細胞がほぼコンフルエントに達したのを確認後、増殖用メディウムを吸引除去し、室温に戻した分化誘導用メディウムに交換する（分化誘導用メディウムで48時間）。
9. 脂肪細胞維持メディウムに交換し、5~7日間培養する。徐々に脂肪滴が蓄積していく様子が観察できる。

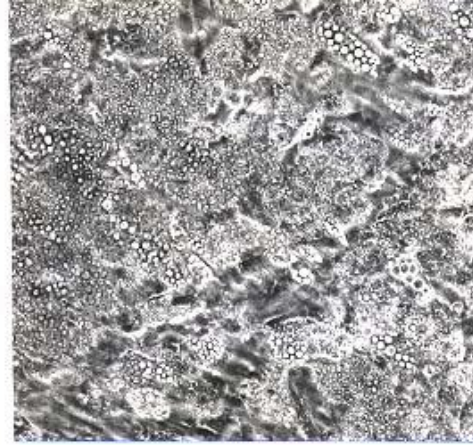
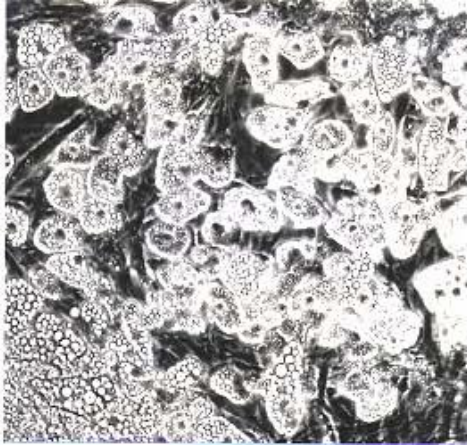
10. 脂肪細胞維持メディウムに交換後、5~7日間培養以内に実験されることをお勧めいたします。

注意：本培養キットは、1キット毎 Primary Culture しておりますので、Lot により褐色脂肪細胞の分化率が若干異なる場合があります。

VII. 技術情報

【実験例】成熟した褐色脂肪細胞

$2 \times 10^{-6} \text{M}$ ノルアドレナリン添加 18 時間後の褐色脂肪細胞



VIII. 参考文献

- 1) Rehnmark S., Kopecky J., Jacobsson A., Nechad M., Herron D., et al. Brown adipocytes differentiated in vitro can express the gene for the uncoupling protein thermogenin effects of hypothyroidism and norepinephrine. *Exp. Cell Res.*, (1989) 182:75-83
- 2) G.Ailhaud, P. Grimaldi, and R. Negrel, Cellular and molecular aspects of adipose tissue development. *Annu. Rev. Nutr.*, (1992) 12:207-233
- 3) 吉田 俊秀、褐色脂肪と β_3 -adrenoceptor agonist. *医学のあゆみ* (1991) 156:707-710
- 4) Yasutake Shimizu and Takashi Shimazu, Effects of wortmannin on increased glucose transport by insulin and norepinephrine in primary culture of brown adipocytes. *B.B.R.C.*, (1994) 202 No.2 July 29 660-665
- 5) Yasutake Shimizu, Danuta Kielar, Yasuhiko Minokoshi and Takashi Shimazu, Noradrenaline increases glucose transport into brown adipocytes in culture by a mechanism different from that of insulin. *Biochem. J.*, (1996) 314:485-490
- 6) Hideki Nikami, Yasutake Shimizu, Michihiro Sumida, Yasuhiko Minokoshi, Toshihide Yosida, Masayuki Saito, and Takashi Shimazu. Expression of β_3 -adrenoceptor and stimulation of glucose transport by β_3 -agonists in brown adipocyte primary culture. *J. Biochem.* (1996) 119:120-125