

製品コード MK423/MK427  
MK428

研究用

---

# Takara

ラット白色脂肪細胞培養キット (製品コード MK427)

ラット褐色／白色脂肪細胞専用培地セット  
(製品コード MK423)

ラット白色脂肪前駆細胞 (製品コード MK428)

---

説明書

過食や食生活の変化さらには運動不足によってエネルギーが過剰摂取となり、脂肪細胞に脂肪として蓄積されて肥満を引き起こすことはよく知られています。この肥満を原因とする糖尿病や高脂血症、高血圧などの生活習慣病はさらに脳血管障害や虚血性疾患、動脈硬化など二次的な疾患へと繋がっています。肥満を解消することは現代の大きな課題でもあり、肥満という白色脂肪細胞の過剰な蓄積に至るまでの発生と分化についてのメカニズムの解明が急がれています。

脂肪組織は脂肪細胞を主な構成細胞とし皮膚の下のほとんどすべての場所に存在しています。

脂肪細胞には白色脂肪細胞と褐色脂肪細胞の全く働きの違う2種類の細胞がありますが、一般的に脂肪と呼んでいるのは白色脂肪のことで皮下や内臓周囲などに広く分布し体中の細胞のうちの1%をしめています。

この白色脂肪細胞の働きは過剰なエネルギーを中性脂肪として貯蔵し、エネルギー不足状態に応じてそれを脂肪酸に分解し、血中に放出する機能をもつだけでなく、体の働きに必要な化学物質も分泌しています。形態学的には成熟した白色脂肪細胞は単房性の大脂肪滴で満たされ、核や細胞質は細胞周辺へおしつけられており、多房性の脂肪滴と豊富なミトコンドリアで満たされている褐色脂肪細胞とは異なった様子をしています。脂肪細胞は前駆脂肪細胞が分化誘導因子の刺激をうけることによってクローン増殖し、その後特異的な遺伝子が発現し細胞質に脂肪滴を貯めて成熟脂肪細胞となります。

弊社では、SDラットの腹膜後部より白色脂肪前駆細胞を分離し、細胞と専用培地のキットを発売しました。キット中の前駆細胞を専用培地中で継代培養し、手順に従って分化させるだけで白色脂肪細胞を調製することができます。また、専用培地セットのみの販売も行っておりますので、組織に関わる生理活性の探索や、肥満や糖尿病に対する特効薬のスクリーニングなどにもご利用ください。

## I. 製品内容

### MK427；ラット白色脂肪細胞培養キット

- |   |             |
|---|-------------|
| 1. ラット白色脂肪前駆細胞（凍結細胞） $> 1.8 \times 10^6$ cells/vial | 1本          |
| マイコプラズマ検査済、継代保証回数1回                                 |             |
| 2. 基本培地（DMEM、高グルコース）                                | 500 ml × 1本 |

#### 【培地添加試薬】

- |                        |             |                            |                            |
|------------------------|-------------|----------------------------|----------------------------|
| 3. アスコルビン酸             | 1 ml × 1本   | 基本培地用添加試薬<br>(培地 500 ml 分) |                            |
| 4. ビオチン                | 1 ml × 1本   |                            |                            |
| 5. パントテン酸              | 1 ml × 1本   |                            |                            |
| 6. トリヨードチロニン           | 0.5 ml × 1本 |                            |                            |
| 7. オクタン酸               | 1 ml × 1本   |                            |                            |
| 8. 牛胎児血清               | 50 ml × 1本  |                            |                            |
| 9. 抗生物質                | 5 ml × 1本   |                            |                            |
| 10. インシュリン             | 1 ml × 2本   |                            | 維持培地用添加試薬<br>(培地 200 ml 分) |
| 10. インシュリン             | 1 ml × 1本   |                            | 分化培地用添加試薬<br>(培地 100 ml 分) |
| 11. デキサメタゾン            | 0.5 ml × 1本 |                            |                            |
| 12. 3-イソブチル-1-メチルキサンチン | 0.1 ml × 1本 |                            |                            |

### MK423；ラット褐色／白色脂肪細胞専用培地セット（細胞は含まれておりません。）

- |                      |             |
|----------------------|-------------|
| 2. 基本培地（DMEM、高グルコース） | 500 ml × 1本 |
| 3～9、11、12. 培地添加試薬    | 各1本         |
| 10. 培地添加試薬           | 3本          |

### MK428；ラット白色脂肪前駆細胞（培地セットは含まれておりません。）

- |   |    |
|---|----|
| 1. ラット白色脂肪前駆細胞（凍結細胞） $> 1.8 \times 10^6$ cells/vial | 1本 |
| マイコプラズマ検査済、継代保証回数1回                                 |    |

---

## II. 保存

1. ラット白色脂肪前駆細胞：液体窒素保存\*
2. 基本培地：4℃保存
- 3～12. 培地添加試薬：－20℃保存

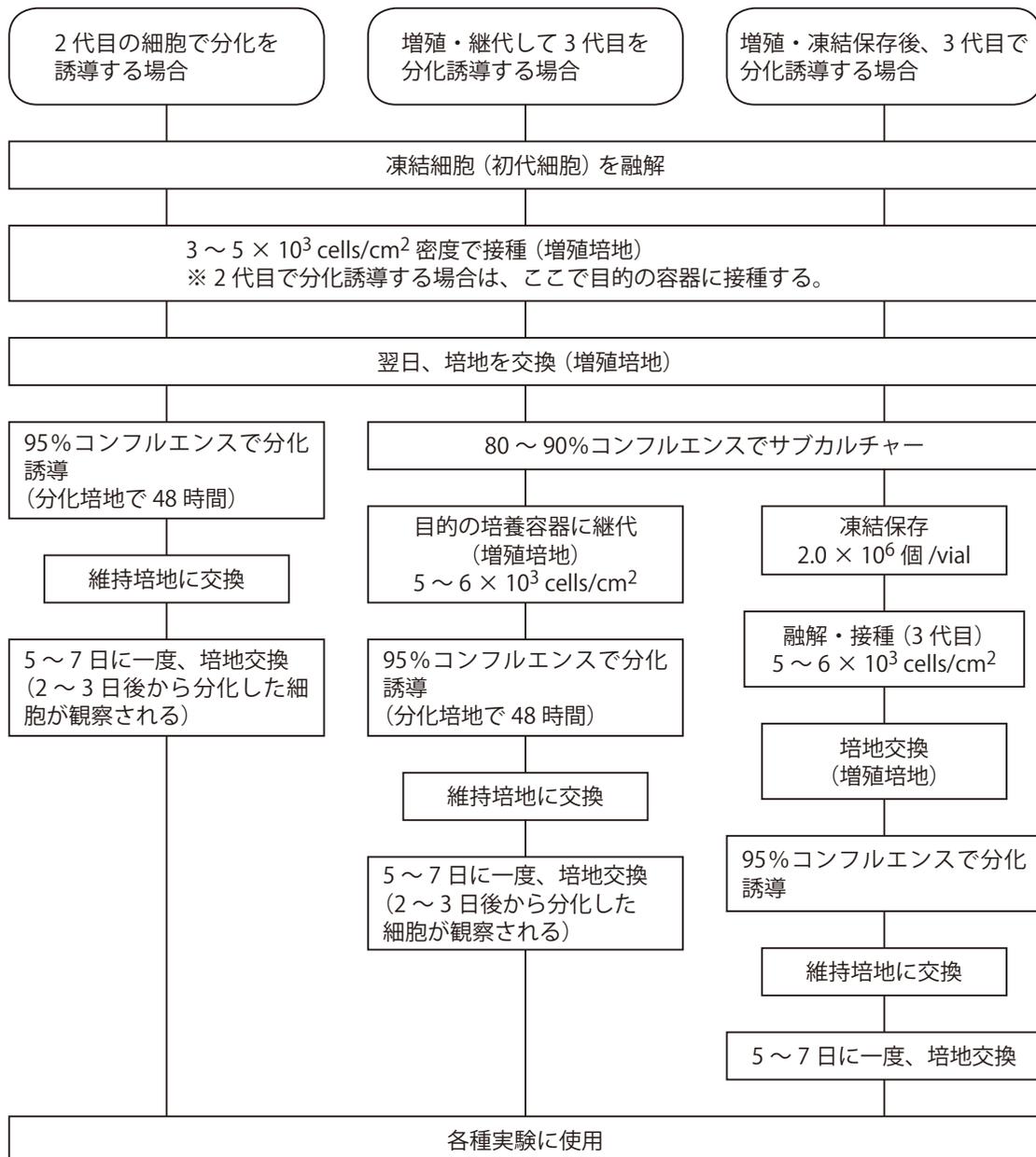
\*：製品到着後、ただちに液体窒素中で保存してください。  
適切に保存し、受取り後1年を目途にご使用ください。  
なお、液体窒素保存のできない場合は、ただちに細胞を融解し、培養を行ってください。

## III. その他必要な試薬および器具 (主なもの)

- ・滅菌済み PBS (－)：PBS (Phosphate Buffered Salts) Tablets (製品コード T900)
- ・トリプシン溶液：0.25% トリプシン・0.02% EDTA を含む PBS (－)
- ・培養用のディッシュ、フラスコ、マルチプレート類
- ・滅菌済みピペット

#### IV. フローチャート

ラット白色脂肪細胞は継代を繰り返すと分化能が低下します。  
 ご購入いただいた凍結細胞（初代細胞）を培養した2代目細胞または1回だけ継代した3代目の細胞で分化を誘導してください。（3代目は分化能が落ちます。）



サブカルチャーや凍結保存する前の細胞が過剰に増殖している状態の場合、その後の細胞の増殖や分化能が落ちますのでご注意ください。

## V. 細胞培養方法の手順

ラット白色脂肪前駆細胞は、凍結保存培地（10% FCS、10% DMSO を添加した培地）中に凍結保存されたままドライアイス（-80℃）詰めに入れてお手元に届きます。商品が到着しましたら、ただちに液体窒素中で保存してください。液体窒素保存のできない場合は、ただちに細胞を融解し細胞培養を行ってください。

### A. 培地の準備

培養セットの中の添加試薬（3.～12.）を自然解凍または37℃のインキュベーターで解凍してください。解凍後の試薬に析出物がみられた場合は、さらに37℃に保温して完全に内容物を溶解してください。基本培地も37℃に一時保温してください。

1. 培地と添加試薬を37℃のインキュベーターから取り出し、チューブまたはボトルの表面を70%エタノールで拭くまたは噴霧して殺菌する。
2. クリーンベンチ内で培地500 mlに10. インシュリンと11. デキサメタゾン、12. 3-イソブチル-1-メチルキサンチンを除くすべての添加試薬（3.～9.）を添加して増殖培地をつくる。
3. そこから滅菌した100 ml容ボトル2本にそれぞれ増殖培地を100 mlずつ移しかえ、1本のボトルに分化培地用の添加試薬（10. インシュリン1本と11. デキサメタゾン、12. 3-イソブチル-1-メチルキサンチン）を添加し、もう1本のボトルには維持培地用の添加試薬（10. インシュリン1本）を添加しておく。

※ 冷えた培地に添加試薬を投入すると成分が析出する場合があります。  
万一、析出物がみられた場合は、混合物をいったん37℃に保温して完全に溶解してください。（完全融解後には析出はみられません。）

※ 分化培地、維持培地がそれぞれ100 mlずつ必要のない場合は、必要時に増殖培地10 ml当たり、分化用であれば10. インシュリン100  $\mu$ lと11. デキサメタゾン50  $\mu$ l、12. 3-イソブチル-1-メチルキサンチン10  $\mu$ lを添加し、維持用であれば10. インシュリン100  $\mu$ lのみを添加してください。

※ 添加因子を加えた培地は4℃で約2ヶ月保存可能です。

※ ラット白色脂肪細胞は温度変化の影響を受けやすいため、培地は必ず室温または37℃に保温してから使用してください。

### B. 2代目の細胞で分化を誘導する場合

#### 1. 培養容器の準備

ラット白色脂肪前駆細胞の培養にはコラーゲンコートされたディッシュ、フラスコ、プレートが適している。

- 1-1. 細胞接種密度は3～5 × 10<sup>3</sup> cells/cm<sup>2</sup>が望ましいため凍結バイアルに記載されている細胞数（> 1.8 × 10<sup>6</sup> cells/vial）をもとに、培養したい容器を準備する。10 cm ディッシュであれば5～10枚、60 mm ディッシュまたはT-25 フラスコであれば12～24枚（個）、24 well プレートであれば6～12枚用意する。上記以外の容器を分化誘導に使用する場合は面積に応じて必要な枚数を準備する。

[参考] 10 cm ディッシュ（約55 cm<sup>2</sup>）、60 mm ディッシュ（約21 cm<sup>2</sup>）、6 well プレート（9.5 cm<sup>2</sup>/well）、12 well プレート（3.8 cm<sup>2</sup>/well）、24 well プレート（1.9 cm<sup>2</sup>/well）、96 well プレート（0.32 cm<sup>2</sup>/well）

- 
- 1-2. 無菌的に培地のボトルを開けて培養面積 4 cm<sup>2</sup> に対して 1 ml の割合で増殖培地を加える。60 mm ディッシュまたは T-25 フラスコであれば約 5 ml の培地を、10 cm ディッシュであれば約 15 ml の増殖培地を加える。
  - 1-3. 培地を加えた培養容器を 37℃、5% CO<sub>2</sub> インキュベーターに入れ、使用時までインキュベートすることが望ましい。

## 2. 推奨する細胞の融解方法

細胞は非常にデリケートなので、細胞を融解してから新しい培地に接種するまでの時間はできるだけ短くするようにしなければなりません。  
融解した細胞は遠心を避けてください。

- 2-1. 凍結細胞バイアルを液体窒素から取り出す。バイアル表面を 70% エタノールで拭くか、または噴霧するかして滅菌する。クリーンベンチ内でバイアルの蓋を少しまわして内圧を抜き再び閉める。
- 2-2. 37℃ の恒温槽に細胞バイアルの 3/4 を浸し、中身が融解するまでバイアルを約 1 ~ 2 分ゆっくりまわして混ぜる (バイアルの口は浸さないこと)。最後の氷の固まりが溶ける直前で恒温槽から取り出す (細胞が融解した状態で恒温槽の中に放置すると細胞は死んでしまう)。
- 2-3. バイアルを出したらすぐに周囲の水を拭き取り 70% エタノールで拭くか、または噴霧で滅菌しクリーンベンチ内に移す。

## 3. 細胞の接種

- 3-1. バイアルの蓋をとる。バイアルの口に触れないこと。
- 3-2. 2 ml 容の細い滅菌ピペットでバイアルの中に入れて、なるべくゆっくりと 1 ~ 2 回ピペッティングして吸い上げる。ピペッティングし過ぎたり泡立ってないよう気をつける。
- 3-3. 37℃、5% CO<sub>2</sub> インキュベーターであらかじめ温めておいた増殖培地の入った培養容器に細胞を等量ずつ加える。
- 3-4. 37℃、5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで再び培養する。

## 4. 培地の交換

細胞を培地に接種した次の日は、DMSO および未接着の細胞をのぞくために培地を交換し、その後は細胞の状態をチェックしながら培地を交換する。  
90 ~ 95% コンフルエンス注の状態になるまで培養する。  
注意：過剰に増殖させてしまうと分化能が落ちますので、注意してください。

## 5. 分化誘導

- 5-1. 分化培地を用意する。増殖培地 10 ml に対してインシュリン 100 μl とデキサメタゾン 50 μl、3- イソブチル-1- メチルキサンチン 10 μl を添加しておく。
- 5-2. 90 ~ 95% コンフルエンス状態になった細胞の培地を除去する。
- 5-3. 分化培地を入れ、2 日 (48 時間) 培養する。
- 5-4. 分化培地を除去した後、維持培地に交換して 5 ~ 10 日間培養する。5 ~ 7 日に一度培地交換する。徐々に細胞内に脂肪が蓄積されていくのが観察できる。

## C. 増殖、継代して3代目を分化誘導する場合

1. [B. 2代目の細胞で分化を誘導する場合]の1.～3.の手順に従い、細胞を融解、接種する。

2. 培地の交換

細胞を培地に接種した次の日は、DMSO および未接着の細胞をのぞくために培地を交換する。その後は細胞の状態をチェックしながら培地を交換する。細胞を維持するには、80～90%コンフルエンスの状態植え継ぐ必要がある。細胞が過剰に増殖すると接着阻害が起こり培養容器から細胞が剥がれてしまったり、トリプシンが作用しにくくなる。

3. 細胞の植え継ぎ：サブカルチャー

10 cm ディッシュを使用する場合の例を示します。他のサイズの容器を使用する場合は適宜変更してください。

- 3-1. 試薬の準備をする（室温に戻しておく）。

トリプシン溶液 (0.25%トリプシン / 0.02% EDTA in PBS)

滅菌 PBS

増殖培地

- 3-2. クリーンベンチ内でコンフルエンス (80～90% コンフルエンス) になった培養容器を取り出し培地を吸引除去する。

- 3-3. 室温に戻した滅菌済み PBS 5～10 ml で細胞の表面を洗浄する。

- 3-4. 洗浄した PBS を吸引除去する。

- 3-5. 室温に戻したトリプシン溶液をすべての細胞が覆われるように入れる (10 cm のディッシュの場合は2～3 ml 程度)。トリプシンが全体に行き渡ったら、できるだけ余分なトリプシンは吸引除去しておく。(シャーレを傾けたとき剥がれた細胞が流れる程度)

- 3-6. 細胞が丸くなっていく様子を顕微鏡で観察して90%以上が丸くなったことを確認してディッシュを手のひら、または固いものに打ちつけて細胞の剥がれ具合を見る。ディッシュを少し斜めにして表面から大部分の細胞が剥がれて流れ落ちるまでトリプシン処理をつづける。剥がれない場合は再び手のひら、または固いものに打ちつけてみる。

- 3-7. 細胞が剥がれたのを確認できたら直ちに増殖培地 5 ml をディッシュに加えてトリプシンを中和する。

- 3-8. 15 ml の滅菌遠心チューブに細胞をすばやく移し、ディッシュに残っている細胞を滅菌 PBS 5 ml で洗って遠心チューブに加えて1,000～1,500 rpm で5分間遠心する。上清を除去して増殖培地 5 ml を入れて静かにピペッティングする。

- 3-9. 細胞懸濁液の一部をとり、ヘマトメーターで細胞数をカウントする。

- 3-10. 実験に必要な培養容器 (ディッシュ・プレート) に細胞を希釈して播く。細胞接種密度は  $5 \sim 6 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> が望ましい。この場合、2～3日でコンフルエンスに近い状態となる。

播いた翌日にコンフルエンスに近い状態にする必要がある場合には、 $2.5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> で播くことも可能である。

[参考] 10 cm ディッシュ (約 55 cm<sup>2</sup>)、60 mm ディッシュ (約 21 cm<sup>2</sup>)、6 well プレート (9.5 cm<sup>2</sup>/well)、12 well プレート (3.8 cm<sup>2</sup>/well)、96 well プレート (0.32 cm<sup>2</sup>/well)

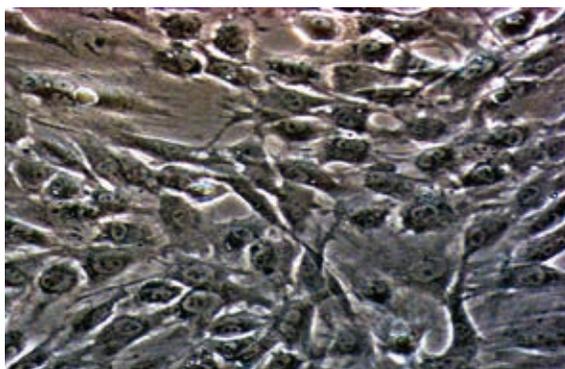
---

#### 4. 分化誘導

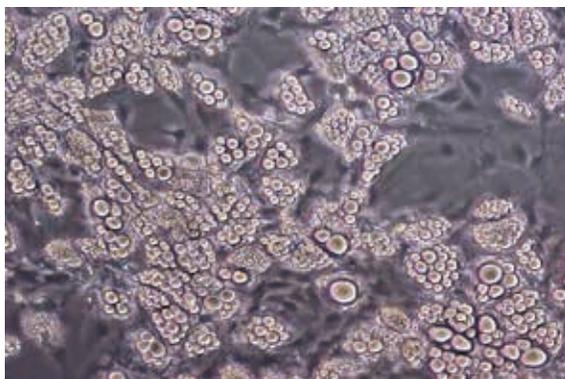
- 4-1. 分化培地を用意する。増殖培地 10 ml に対してインシュリン 100  $\mu$ l とデキサメタゾン 50  $\mu$ l、3- イソブチル -1- メチルキサンチン 10  $\mu$ l を添加しておく。
- 4-2. 90 ~ 95%コンフルエンス状態になった細胞の培地を除去する。
- 4-3. 分化培地を入れ、2 日 (48 時間) 培養する。
- 4-4. 分化培地を除去した後、維持培地に交換して 5 ~ 10 日間培養する。5 ~ 7 日に一度培地交換する。徐々に細胞内に脂肪が蓄積されていくのが観察できる。

#### D. 増殖、凍結保存後、3 代目で分化誘導する場合

1. [B. 2 代目の細胞で分化を誘導する場合] の 1. ~ 3. の手順に従い、細胞を融解、接種する。細胞接種密度は  $3 \sim 5 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> にする。
2. [C. 増殖継代して 3 代目を分化誘導する場合] の 2. ~ 3-9. の手順に従い、細胞を剥がし、細胞数を計測する。
3. 細胞の凍結保存
  - 3-1. 細胞数を計測したら、再び 1,000 ~ 1,500 rpm で 5 分間遠心し、上清を除去する。
  - 3-2. 凍結培地 (増殖培地に 10% DMSO を添加したもの) を、凍結バイアルあたり約  $2.0 \times 10^6$  cells (約 2 ml) になるように加え、細胞を懸濁する。
  - 3-3. 細胞懸濁液を凍結バイアルに入れ、さらにバイアルをスチロールの箱に入れて - 80°C のフリーザー中に一晩置き凍結させる。
  - 3-4. 翌日、凍結バイアルを液体窒素中に移して保存する。
4. [B. 2 代目の細胞で分化を誘導する場合] の手順に従い、細胞を融解、接種、分化させる。  
ただし、細胞接種密度は  $5 \sim 6 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> にする。



↓ 分化



分化培地に交換して約1週間後

分化により白色脂肪前駆細胞がはじめは小さな油滴で満たされるが、やがて単房性構造をもつ成熟した白色脂肪細胞になることが、顕微鏡で確認できる。

## VI. 参考文献

- 1) 関谷敬三、奥田拓道 (1992) 代謝 **299**, 459-469.
- 2) Yukiko Irie, Atsushi Asano, Xavier Canas, Hideki Nikami, Shin-ichi Aizawa, and Masayuki Saito (1999) *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **255**, 221-225
- 3) Valur Emlsson, Roger J. Summers, Stephanie Hamilton, Yong-Ling Liu, and Michael A. Cawthorne (1998) *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **252**, 450-454
- 4) 入江由希子、斉藤昌之 (2001) 「肥満研究」 Vol.7, No.1, 63-65
- 5) 斉藤昌之 (2003) 第 124 回 日本医学会シンポジウム
- 6) 斉藤昌之、佐々木典康 (1996) 実験医学 Vol.14, No.16 (10月号)
- 7) 入江由希子、斉藤昌之 (1999) *Molecular Medicine*. Vol.36, No.3

## VII. 関連製品

AdipolInducer Reagent (for animal cell) (製品コード MK429)

## VIII. 注意

- 本製品は研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- 本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先

**テクニカルサポートライン**

Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995

ウェブサイト <http://www.takara-bio.co.jp>

---

**タカラバイオ株式会社**