

# 試験報告書（見本）

## 初代脂肪細胞を用いた 脂肪代謝評価試験

試験番号:XXXXXXXXA01

委託者:△△△△株式会社 委託者 様

コスモ・バイオ株式会社  
札幌事業部  
試験責任者:○○ ○○

作成日:XXXX 年 XX 月 XX 日

## 試験の実施に関する記述

- **表題**

初代脂肪細胞を用いた脂肪代謝評価試験

- **試験番号**

XXXXXXXXA01

- **試験目的**

ラット初代褐色脂肪細胞に対する被験物質の影響を脂肪蓄積量で評価する。

- **試験実施施設**

施設名 : コスモ・バイオ株式会社 札幌事業部

所在地 : 小樽市銭函3丁目513番2

TEL;0134-61-2300 FAX;0134-61-2295

- **試験期間**

サンプル受取日 : XXXX年XX月XX日

試験実施日 : XXXX年XX月XX日及びXX月XX日

試験終了日(報告書作成日) : XXXX年XX月XX日

- **試験責任者その他の試験に従事した者の氏名及び業務分担**

試験責任者 : ○○ ○○

培養・脂肪量測定 : ○○ ○○・○○ ○○

報告書作成 : ○○ ○○

## 1 試験材料

### 1.1 使用試薬

#### 1.1.1 被験物質

品名 :XXXXXXXX  
保存条件 :冷凍  
送付量 or 濃度 :1g  
調製方法 :10mM になるように超純水に溶解し、フィルター滅菌して、使用直前まで冷凍保管。使用直前に融解し、培地を用いて既定の濃度に希釈。

#### 1.1.2 脂肪細胞

品名 :褐色脂肪細胞培養キット  
メーカー名 :コスモ・バイオ(株)  
コード No. :BAT02

#### 1.1.3 増殖用メディウム

品名 :増殖用メディウム  
メーカー名 :コスモ・バイオ(株)  
コード No. :BATGM

#### 1.1.4 分化誘導用メディウム

品名 :分化誘導用メディウム  
メーカー名 :コスモ・バイオ(株)  
コード No. :BATDM

#### 1.1.5 脂肪細胞維持メディウム

品名 :脂肪細胞維持メディウム  
メーカー名 :コスモ・バイオ(株)  
コード No. :BATMM

#### 1.1.6 脂肪染色試薬

品名 :リピットアッセイキット  
メーカー名 :コスモ・バイオ(株)  
コード No. :AK09F

### 1.2 使用機器

#### 1.2.1 マイクロプレートリーダー

製品名 :インフィニット M200 Pro  
メーカー名 :TECAN  
Product No. :INFINITE-M200PRO-FL-ABS

## 2 試験方法

### 2.1 脂肪細胞培養・被験物質添加

初代褐色脂肪細胞を調製後、24well プレート 1 枚に図 1 のプレート配置図(N=3well)に従って、 $3 \times 10^4$ cells/well で播種し、増殖用メディウムを用いて3日間培養した。3日後に分化誘導用メディウムに培地交換し、さらに2日後、脂肪細胞維持メディウムに培地交換した。脂肪細胞維持メディウムで2日間培養後、同培地で培地交換し、Controlとして超純水のみ、被験物質を低濃度、中濃度、高濃度になるよう、培地に添加した。24時間の暴露の後、脂肪染色を実施した。

プレート配置\_24well

|   | 1         | 2         | 3         | 4 | 5 | 6 |
|---|-----------|-----------|-----------|---|---|---|
| A | Control-1 | Control-2 | Control-3 |   |   |   |
| B | 被験物質低濃度-1 | 被験物質低濃度-2 | 被験物質低濃度-3 |   |   |   |
| C | 被験物質中濃度-1 | 被験物質中濃度-2 | 被験物質中濃度-3 |   |   |   |
| D | 被験物質高濃度-1 | 被験物質高濃度-2 | 被験物質高濃度-3 |   |   |   |

図 1 プレート配置

### 2.2 脂肪染色

脂肪細胞の染色はキット付属のプロトコル ([https://search.cosmobio.co.jp/cosmo\\_search\\_p/search\\_gate2/docs/PMC\\_/AK09F.20200415.pdf](https://search.cosmobio.co.jp/cosmo_search_p/search_gate2/docs/PMC_/AK09F.20200415.pdf)) に従って実施した。染色後、キット付属の抽出液を 0.5mL/well で添加して色素を抽出した。抽出液中の色素量をマイクロプレートリーダー(吸光度:540nm)で測定した。色素量は Control を 100%とし、各群の相対値として算出した。統計解析は Excel(Microsoft)を用いて Control との有差を t 検定(両側)で実施した。

### 3 試験結果

#### 3.1 脂肪染色結果

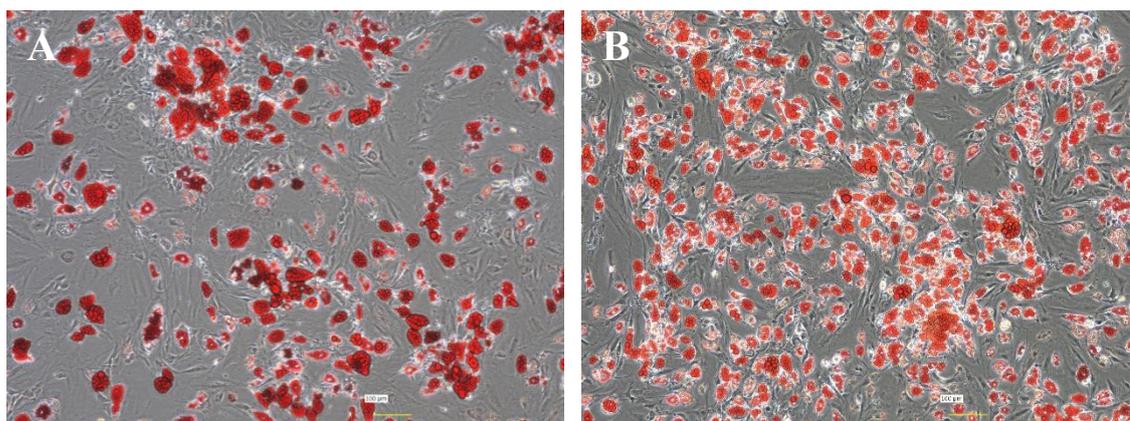


図 2 脂肪染色画像 (代表例抜粋)

A: Control, B: 被験物質中濃度

Control では、大きい脂肪滴が散見されたのと比較して、被験物質中濃度では、脂肪滴が小さくなり、脂肪の蓄積が抑制されたと考えられた。

表 1 各サンプル及び各群の OD 値及び統計解析結果

| 群名          | サンプル名     | OD(540nm) | 平均     | 標準誤差   | 相対比較(%) | 有意差    |
|-------------|-----------|-----------|--------|--------|---------|--------|
| Control     | Control-1 | 0.7636    | 0.7697 | 0.0094 | 100.0%  | -      |
|             | Control-2 | 0.7536    |        |        |         |        |
|             | Control-3 | 0.7919    |        |        |         |        |
| 被験物質<br>低濃度 | 被験物質低濃度-1 | 0.7544    | 0.7585 | 0.0134 | 98.5%   | -      |
|             | 被験物質低濃度-2 | 0.7322    |        |        |         |        |
|             | 被験物質低濃度-3 | 0.7888    |        |        |         |        |
| 被験物質<br>中濃度 | 被験物質中濃度-1 | 0.6542    | 0.6524 | 0.0181 | 84.8%   | P<0.01 |
|             | 被験物質中濃度-2 | 0.6132    |        |        |         |        |
|             | 被験物質中濃度-3 | 0.6899    |        |        |         |        |
| 被験物質<br>高濃度 | 被験物質高濃度-1 | 0.4565    | 0.4828 | 0.0286 | 62.7%   | P<0.05 |
|             | 被験物質高濃度-2 | 0.5521    |        |        |         |        |
|             | 被験物質高濃度-3 | 0.4398    |        |        |         |        |

注\*: 相対比較は% of Control で算出。有意差は t 検定(両側)で実施。

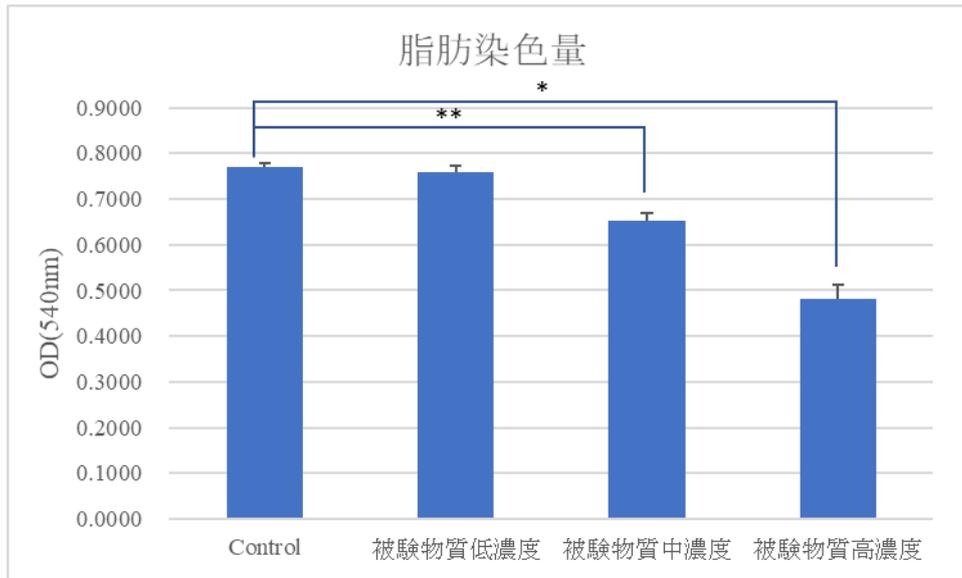


図 3 脂肪染色量

結果は、Scale Bar を各群の平均値及び Error bar を標準誤差(±)として示した(n=3)。

\*  $p < 0.05$  (両側検定), \*\*  $p < 0.01$  (両側検定),

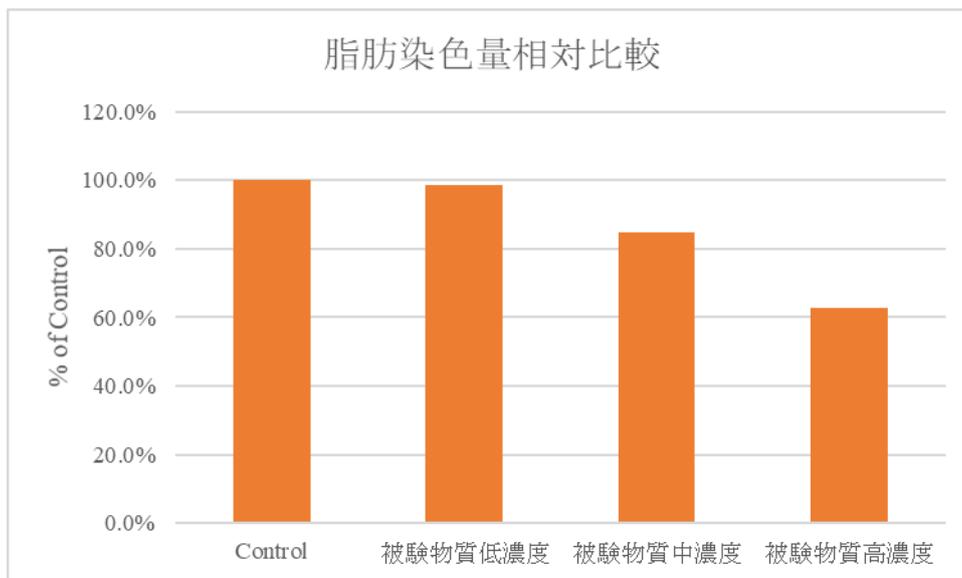


図 4 脂肪染色量相対比較

結果は Scale Bar を各群の脂肪染色量平均値の% of control として示した。

脂肪染色量では、被験物質中濃度及び高濃度において、染色量の低下が認められた。相対比較においては、最大で約 40%の脂肪染色量の低下が認められた。

#### 4 まとめ

被験物質による褐色脂肪の脂肪蓄積に対する影響を脂肪染色にて評価した。被験物質の中濃度及び高濃度では有意な脂肪蓄積の低下が認められ、コントロールに対する割合では約 40%の低下を示した。このことから、被験物質は褐色脂肪細胞の脂肪代謝を活発化させる可能性が示唆された。今後、脂肪代謝に関連する UCP1 の遺伝子発現や代謝物の測定等、より詳細な検討を期待したい。

以上