

(1) 脂肪細胞数ならびにその大きさの解析法

マウスの脂肪組織の「形態学的特長をとらえる」ために通常の切片標本が作成されるが、固定等の過程で脂肪が抜けることによって細胞は小さくなる。さらに、脂肪組織は大きさの違う細胞が3次元で分布しているため、切片標本を用いて2次元でサイズを測定することには問題がある。また細胞サイズ測定にFACS解析が用いられるが、脂肪細胞の直径は50~150 μm のため通常のFACS解析には適応できない。本解析法は、オスミウム酸固定*によって脂肪を抱えた状態でサンプルが固定されるので、正確な細胞径を測定できることに特徴があり、一般的に最も信頼のおける細胞サイズ測定法であることが知られている。また細胞数は固定標本から測定することは不可能であるが、コールターカウンターで測定した平均直径から仮想重量を求め、組織重量を除いて、仮想細胞数を求め、対照群と比較して、相対細胞数を求めることで評価可能である[J Biol Chem. 282: 2038-2046 (2007), Nat Med. 14: 188-193 (2008), J Biol Chem. 283: 21220-21229 (2008), Am J Hypertension. 23: 425-431 (2010), Metabolism. 59: 1241-1251 (2010)]。

- 手順
- 1) 脂肪組織を摘出
 - 2) 組織重量の測定
 - 3) オスミウム酸固定*
 - 4) コールターカウンターによる直径とその分布の測定 (平均直径の算定)
 - 5) 2) と 4) より仮想細胞数を計算し、対照群と比較して相対細胞数を測定 (細胞数の算定)

*オスミウム酸固定の方法^{1, 2)}

1. Collidine 333 μl (Aldrich, cat. 14, 238-7)と蒸留水 12 ml を混和する。
2. 6規定 HCl 188 μl と蒸留水 11 ml を混和する。
3. 1. と 2. を混和して、そこへ蒸留水 26.3 ml を加えて、総量を 50 ml とする。
4. 3. に Osmium (Sigma, cat. 05500) を 1 g 加えて、4 $^{\circ}\text{C}$ で溶かす (overnight、溶けにくい場合には短時間 shake する)。
5. 12.5 ml ずつ Tube に分注し、そこへ脂肪組織 80-100 mg を入れ 37 $^{\circ}\text{C}$ で 48-72 時間 shake する。過量な組織は未固定組織となるため脂肪組織重量は正確に測る。また組織を分割する必要はない。固定する容器は密閉性や観察のしやすさからガラス容器が望ましい。
6. 固定後、250 μm のナイロンフィルターで結合組織を除去し、25 μm のフィルターで集める。廃液は各施設の規則に従うこと。
7. 生食を用いて 25 μm のフィルター上で洗浄する。洗浄が足りないと 25 μm 以下のものがカウントされ脂肪細胞サイズを上手く計測できない。この段階で固定された脂肪細胞は、砂鉄のようになっていることを確認する。
8. 生食もしくは Coulter Isoton II Diluent で 200 ml 程度に希釈し、コールターカウンター (例: Multisizer III) などでサイズを測定する。

注意: オスミウム酸は、固体の段階から非常に揮発しやすく、特に呼吸器に有害であるため、ドラフトの付いたベンチ内で作業すること。

- 1) Cushman SW et al. *J. Lipid Res.* 19: 269-273 (1978)
- 2) Hirsch J et al. *J. Lipid Res.* 9: 110-119 (1968)