

# 脳組織およびその他 3D モデルを用いた リアルタイム代謝解析のための 優れたシステム

## 著者

Pamela Swain,  
Suzanne Armitstead, and  
Veronica Silva  
Agilent Technologies, Inc.

## 概要

ニューロンの発達および機能は、体内で最もエネルギー需要が大きい生物学的プロセスの 1 つです。脳が正常に機能するためには、すぐに利用できる安定したエネルギー源が必要となり、この需要を満たすために、ミトコンドリア呼吸と解糖に依存して継続的に ATP を供給します。酸素代謝とミトコンドリア機能の障害は、認知機能低下を伴うさまざまな老齢疾患や神経変性疾患に共通する病理学的特徴です。脳はその領域や構造によって機能およびエネルギー需要が異なります。脳におけるミトコンドリア代謝の研究には、培養ニューロン、または脳組織から単離したミトコンドリアがよく使用されています。ところが、このような手法は大量の組織を必要とするうえ、複雑な組織の微小環境、すなわち脳組織に存在する複数の細胞タイプの相互作用を捉えられません。

このアプリケーションノートでは、Agilent Seahorse XF Flex アナライザーと、異なる脳領域の小さな生検パンチでエネルギー代謝を検出して定量的に評価することのできる効率的なワークフローについて紹介します。Agilent Seahorse XF Flex 3D キャプチャマイクロプレート - L と Agilent Seahorse XF 3D ミトストレステストキットを用いて脳組織サンプルから得られた代謝データの例を示します。また、Seahorse XF アッセイで使用する脳組織を準備し、最適化する方法と、データ解析の手法について考察します。

Agilent Seahorse XF プラットフォームは一体型のラベルフリーソリューションです。Seahorse XF アナライザー、センサーカートリッジ、アッセイキット、およびソフトウェアをシームレスに組み合わせ、機能的代謝データをリアルタイムに提供します。このプラットフォームでは、酸素消費速度 (OCR) や細胞外酸性化速度 (ECAR) など、ミトコンドリアの健康状態、毒性、解糖、全体的な細胞機能 (障害) を示す重要な指標となる主要なパラメーターが得られます。

## はじめに

3D 細胞モデルを解析するためのツールや試薬に対する需要が急速に高まっています。これらの 3Dモデルの主な例として、例えば精密組織スライス、オーガンオンチップ、バイオプリンティング、オルガノイドなどがあります。精密組織スライスは、入手しやすく安価であること、また支持細胞タイプが含まれており、組織の自然な環境が維持されていることから、注目に値します。組織サンプルは、in vivo 環境を再現でき、従来の 2D 細胞培養よりも正確に生理機能を表現できるため、研究や薬物スクリーニングに広く使用されています<sup>1, 2, 3, 4</sup>。

Agilent Seahorse XF アナライザーは、代謝機能評価のゴールドスタンダードとなっています。このプラットフォームでは、ミトコンドリア呼吸を反映する酸素消費速度（OCR）と、解糖を反映する細胞外酸性化速度（ECAR）の測定が可能です。この測定技術は、代謝がどのように細胞機能に影響を与え、疾患の進行を促進するのかを理解するために不可欠なものとなっていますが、データのほとんどが 2 次元培養細胞や単離ミトコンドリアを使用して得られ、組織の複雑な環境を完全には捉えられない可能性があります。

この課題を解決するために、脳などの組織スライスを使用してミトコンドリア呼吸を測定する ex vivo による手法が開発されました。これらのアプローチでは、細胞間の協調や、異なる細胞タイプ間での代謝共役など、細胞環境の生理学的表現が得られます。これにより、脳の生体エネルギーの理解は、ごく単純な解釈から、代謝リプログラミングと代謝適応の動的モデルへと発展してきました。この代謝メカニズムにはミトコンドリアが関与し、さまざまなエネルギー基質の利用と、解糖および酸化的リン酸化への ATP 産生の振り分けが行われます。老化状態および病的状態で炎症が活性化するとグリア細胞の代謝が変化することが、研究により示されています<sup>5, 6, 7, 8</sup>。これらの研究から脳組織の解析ワークフローに関する知見が得られますが、これらのワークフローでは多様な Seahorse XF 機器や消耗品が、組織に最適化されていない状態で使用されているのが現状です。

このアプリケーションノートでは、脳組織スライスを例として、3D モデルでエネルギー代謝を調査する新しい Seahorse XF システムについて紹介します。このシステムは、Seahorse XF Flex 3D キャプチャマイクロプレート-L、Seahorse XF 3D ミストテストキット、ピプラトーム組織スライサー、Seahorse XF Flex アナライザーで構成されます（図 1）。

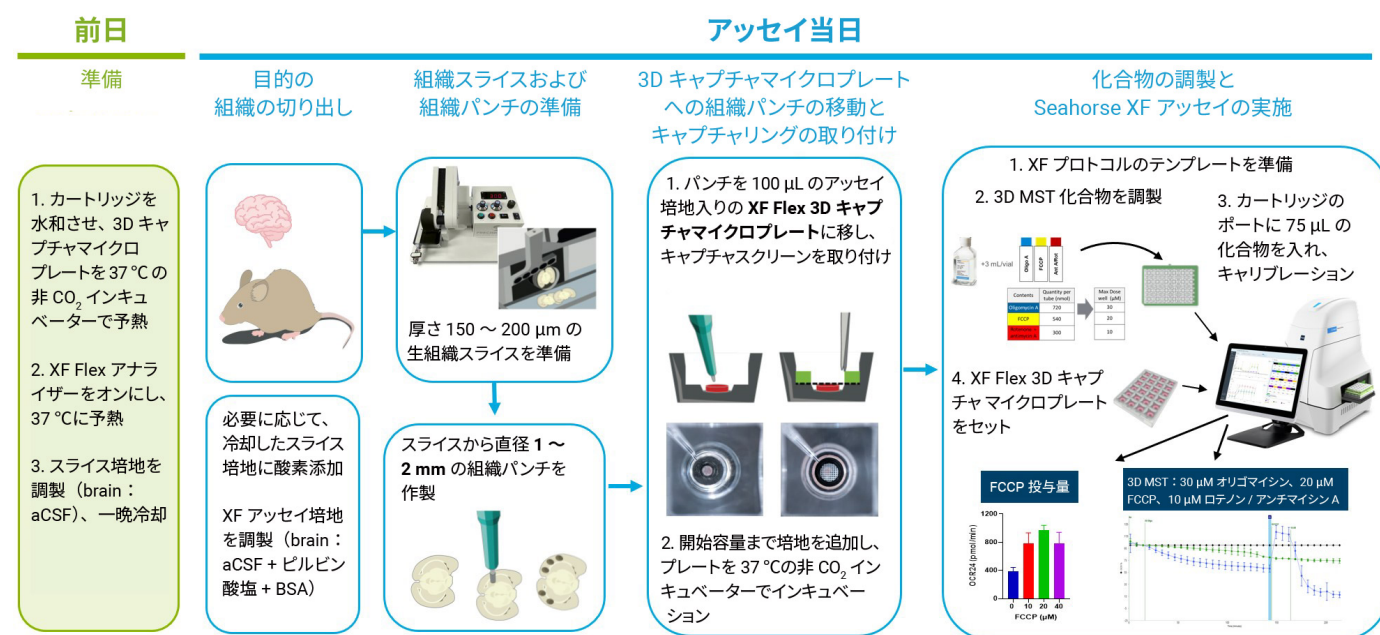


図 1. Agilent Seahorse XF Flex 3D 組織解析ワークフローの概略図：アッセイの主な手順

Seahorse XF Flex アナライザーは、向上した感度と精度、高度な実験デザインおよびデータ解析ツールを特長としています。3D キャプチャマイクロプレート-L は 24 ウェルプレートで、各ウェルの底部に深さ 250 μm、直径 3.15 mm のサンプルチャンバーがあります。この寸法と同一サイズまたはそれより小さい組織スライスの解析が可能です。このプレートには、組織を所定の位置に保持するように設計された各ウェル用のキャプチャリングも付属し、測定時には 8.5 μL の一過性のマイクロチャンバーを形成することができます。キャプチャリング上のメッシュの孔径が大きいため、ガスや化学物質の十分な再灌流が可能であるほか、Seahorse XF アッセイ中に培地の状態を回復させることもできます。Seahorse XF 3D ミストテストキットには、電子伝達系のモジュレーターが含まれ、組織サンプルや小さな生物など高用量を必要とするモデルの研究にも対応しています。このシステムは、より優れた感度と再現性を実現し、使いやすさも向上しています。

実験方法

組織の準備と Seahorse XF Flex 3D キャプチャマイクロプレート-L のセットアップ

9 週齢のメス SD ラットを Taconic Biosciences 社から入手しました (SD-F、MPF ヘルスステータス)。Hooke Laboratories で数日間順応させた後、同研究室において Seahorse XF アッセイ当日の朝にラット脳が切り出されました。切り出し後、ラット脳は直ちに、冷却された酸素添加人工脳脊髄液 (aCSF) バッファー (表 1) に入れられ、米国マサチューセッツ州レキシントンにあるアジレントの研究室に引き渡され、そこで Seahorse XF アッセイ用に組織の準備が行われました。

表 1. 人工脳脊髄液の組成。バッファーの pH を 7.4 に調整して 4 °C で保管し、使用 1 時間前に酸素添加しました。

| コンポーネント                         | 濃度 (mM) |
|---------------------------------|---------|
| NaCl                            | 120     |
| KCl                             | 3.5     |
| CaCl <sub>2</sub>               | 1.3     |
| Mg <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> | 1.0     |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 0.4     |
| HEPES                           | 5       |
| D-グルコース                         | 10      |

組織の処理前に、0.6 mM ビルビン酸塩を添加した 100 mL の aCSF、0.6 mM ビルビン酸塩と 0.4 % 脂肪酸フリー BSA を添加した 100 mL の Seahorse XF aCSF、7.5 mM ビルビン酸塩を添加した 20 mL の aCSF (それぞれ表 2A、2B、2C を参照) を温めました。また、pH を 37 °C で 7.4 に調整し、使用前にろ過滅菌しました。表 2A のバッファーを 3D キャプチャマイクロプレート-L の各ウェルに 100 μL ずつ加え、組織パンチの準備ができるまで置いておきました。

表 2A. 0.6 mM ビルビン酸塩を添加した Agilent Seahorse XF aCSF アッセイ培地 (BSA なし)

| コンポーネント       | 最終濃度 (mM) | ストック溶液 (mL) |
|---------------|-----------|-------------|
| aCSF バッファー    |           | 198.8       |
| 100 mM ビルビン酸塩 | 0.6       | 1.2         |
| pH            | 7.4       |             |

表 2B. 0.6 mM ビルビン酸塩と 0.4 % BSA を添加した Agilent Seahorse XF aCSF アッセイ培地

| コンポーネント       | 最終濃度 (mM) | ストック溶液 (mL) |
|---------------|-----------|-------------|
| aCSF バッファー    |           | 99.4        |
| 100 mM ビルビン酸塩 | 0.6 mM    | 0.6         |
| 200 mg/mL BSA | 4 mg/mL   | 2.0         |
| pH            | 7.4       |             |

表 2C. 7.5 mM ビルビン酸塩を添加した Agilent Seahorse XF aCSF アッセイ培地 (BSA なし)

| コンポーネント       | 最終濃度 (mM) | ストック溶液 (mL) |
|---------------|-----------|-------------|
| aCSF バッファー    |           | 18.5        |
| 100 mM ビルビン酸塩 | 7.5       | 1.5         |
| pH            | 7.4       |             |

脳組織は到着後、Compresstome VF-510-0Z 振動マイクローム (Precisionary Instruments 社) を使用して、メーカーの推奨に従い、冷却された酸素添加 aCSF バッファー中でスライスしました (主な手順については図 2 も参照)。脳スライスを準備する際には、Compresstome を Speed 2、Oscillation 4 に設定しました。酸素添加 aCSF バッファーを含み、各ウェルまたはペトリ皿の底にパンチパッド (TedPella 社、カタログ番号 15087-1) を敷いた 6 ウェルプレートまたはペトリ皿に、組織スライスを移しました。その後、生検パンチツール (TedPella 社、カタログ番号 15110-10、15110-15、または 15110-20) を使用して目的のサイズの組織パンチを作製し、各ウェルに 100 μL のバッファーが入った 3D キャプチャマイクロプレート-L に移しました。



図 2. Precisionary Instruments 社の Compresstome を使用した、ラット脳組織スライズの準備に必要な主な手順の概略図

ウェル A1 および D6 はバックグラウンドウェルとして使用するため、組織を入れません。組織パンチは各ウェルの中心に配置しました。次に、バックグラウンドウェルを含む各ウェルに、メッシュ側を下に向けて 3D キャプチャリングを 1 つずつ取り付け、ウェルの底までしっかり押し込みました。さらに、各ウェルに表 2B のバッファー（BSA を含む）を追加し、合計容量を 600  $\mu$ L にしました。また、ウェル内に気泡が閉じ込められていないことを確認しました。その後、アッセイ前に、組織サンプルが入った 3D キャプチャマイクロプレート-L を 37  $^{\circ}$ C の非 CO<sub>2</sub> インキュベーターに 45 ~ 60 分間静置しました。

### Seahorse XF 3D ミトストレステストの実行

Seahorse XF アッセイは、化合物や試薬の調製、センサーカートリッジの準備なども含め、Agilent Seahorse XF 3D ミトストレステストキットのユーザーガイドに記載されている指示に従って実行しました。オリゴマイシン A およびロテノン/アンチマイシン A 注入液の調製には、表 2A の Seahorse XF バッファーを使用しました。また、FCCP 注入液の調製には、表 2C の Seahorse XF バッファーを使用しました。Agilent Seahorse Wave Controller ソフトウェアに用意されている Seahorse XF 3D ミトストレステストのテンプレートを使用し、必要に応じて調整しました。このテンプレートは組織サンプル用に最適化されており、デフォルト設定では 3 分間の混合、0 分間の待機、3 分間の測定を 1 サイクルとしています。サイクル数は、基礎呼吸については 3 回、オリゴマイシン A は 15 回、FCCP は 3 回、ロテノン/アンチマイシン A は 8 回に設定されています（図 3）。

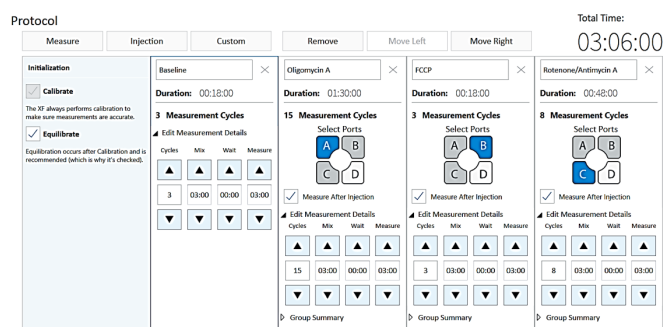


図 3. Agilent Seahorse XF Flex Controller ソフトウェアに搭載されている Agilent Seahorse XF 3D ミトストレステストのテンプレート

### タンパク質の定量

Seahorse XF アッセイの最後に、3D キャプチャマイクロプレート-L の各ウェルから培地を除去し、さらに PBS で 3 回洗浄して aCSF バッファー中の BSA を除去しました。バックグラウンドウェルも同様に洗浄し、タンパク質アッセイのバックグラウンドコントロールとして使用しました。3 回目の洗浄後、プロテアーゼ阻害剤（Thermo Scientific 社）を含む 100  $\mu$ L の RIPA lysis buffer（Thermo Scientific 社）を各ウェルの底に直接加えました。その後、プレートのパラフィルムで覆い、-80  $^{\circ}$ C で一晩凍結させました。プレートを解凍し、組織が溶解するまでメッシュを通して RIPA buffer をピペティングし、組織スライスをホモジナイズしました。次に、プレートを 250 g で 10 分間遠心分離し、25  $\mu$ L のライセートを 96 ウェルアッセイプレートに duplicate に移しました。この作業には電子ピペットを使用し、ピペット内に残ったライセートや空気または気泡が 96 ウェルアッセイプレートに入らないように注意しました。BSA の検量線を作成し、アッセイプレートとバックグラウンドコントロールに各標準液を 25  $\mu$ L 加えました。

Pierce BCA Assay (Thermo Scientific 社) を使用し、メーカーの指示に従って総タンパク質含有量を測定しました。その手順を簡潔に説明すると、次のとおりです。200  $\mu$ L の調製済みアッセイ試薬を各ウェルに加え、プレートにプレートシールでカバーし、プレートシェーカーで 0.5~1 分間混合しました。その後、プレートを 37  $^{\circ}$ C で 30 分間インキュベーションし、Agilent BioTek Synergy H1 マルチモード・プレートリーダーを用いて 562 nm の吸光度を測定しました。検量線から各未知サンプルの総タンパク質含有量を特定し、その値を Seahorse XF アッセイデータの正規化に使用しました。

組織の表面積の測定

キャプチャリングの取り付け前に、Agilent BioTek Cytation 1 細胞イメージング・プレートリーダーを使用して、3D キャプチャマイクロプレート-L 内の組織のハイコントラスト明視野画像を撮影しました。次に、Gen5 ソフトウェアにより、各組織ディスクの平均径または面積を求めました (図 4 を参照)。

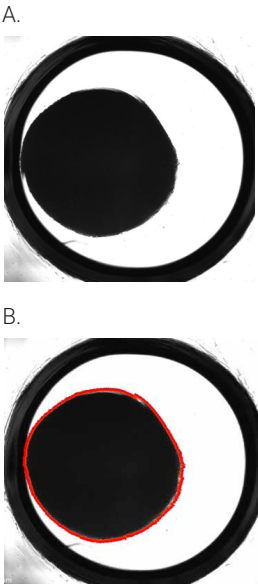


図 4. 面積の測定方法を示す代表的なウェル画像。内側の黒色の領域は組織サンプルの位置を示します。(A) Agilent BioTek Gen5 ソフトウェアの測定ツールを用いた、組織サンプルの X 軸および Y 軸方向の直径の測定例。(B) Gen5 による面積測定例 (赤色で表示)：サンプルの直径と面積が自動的に測定されますが、組織サンプルがウェルの中心にあり、サンプルチャンバー (黒色のリング) のエッジの影響を受けていないことが条件になります。

XF 3Dミトストレステストデータの解析

Web ベースのソフトウェアプラットフォームである Seahorse Analytics を使用して、Seahorse XF 3D ミトストレステストの結果ファイルの解析とデータ変換を実行しました。Seahorse Analytics の専用機能 (ウィジェット) により、OCR カイネティクス測定値から主要な 3D ミトストレステストのアッセイパラメーターが自動的に計算されました。

材料および機器

| 材料                                  | 販売元                                                                      | カタログ番号                     |
|-------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|----------------------------|
| Seahorse XF Flex 3D キャプチャマイクロプレート-L | アジレント・テクノロジー                                                             | 103864-100                 |
| Seahorse XF 3D キャプチャプレート用スクリーン挿入ツール |                                                                          | 101135-100                 |
| Seahorse XF 3D ミトストレステストキット         |                                                                          | 103016-100                 |
| Seahorse XF 1.0 M グルコース溶液           |                                                                          | 103577-100                 |
| Seahorse XF 100 mM ビルビン酸塩溶液         |                                                                          | 103578-100                 |
| Seahorse XF Flex アナライザー             |                                                                          | S7851A または S7851AN         |
| Cytation 1 細胞イメージング・プレートリーダー        |                                                                          |                            |
| 人工脳脊髄液 (aCSF)                       | アッセイ当日から遡って 48 時間以内に新しく調製、pH 7.4、ろ過滅菌し、4 $^{\circ}$ C で保管。使用 1 時間前に酸素添加。 |                            |
| Compresstome VF-510-0Z 振動ミクロトーム     | Precisionary Instruments 社                                               | VF-510-0Z                  |
| Crazy glue (瞬間接着剤)                  |                                                                          | VF-VM-GLUE-CANAL           |
| 2 % Agarose tablet                  |                                                                          | VF-AGT-VM                  |
| 1 mm、1.5 mm、2 mm のブランジャー付き組織パンチ     | TedPella 社                                                               | 15110-10、15110-15、15110-20 |
| カッティングマット                           |                                                                          | 15087-1                    |
| RIPA lysis buffer                   | Thermo Scientific 社                                                      | 89900                      |
| プロテアーゼ阻害剤                           |                                                                          | 87786                      |
| Pierce BCA Assay                    |                                                                          | 23225                      |

結果と考察

アッセイ最適化の必要性

Agilent Seahorse XF アナライザーを有効に活用して代謝機能および生体エネルギー機能を効果的に調べるには、まず、Seahorse XF アッセイの実行に必要な組織の適切な量とすべてのモジュレーターの最適な濃度を特定することが不可欠です。

3D キャプチャマイクロプレート-L には、各ウェルの底部に深さ 250  $\mu$ m、直径 3.15 mm のサンプルチャンバーがあります。つまり、組織サイズが厚さ 250  $\mu$ m、直径 3 mm を超えてはなりません。組織と培地間でガスや栄養素を十分に交換できるように、サンプルチャンバーに余裕を残しておくことを推奨します。

今回の研究では、アッセイの最適化時に、厚さ 200  $\mu$ m、直径 1 mm、1.5 mm、および 2 mm の脳組織ディスクを Seahorse XF 3D ミトストレステストキットでテストしました。図 5 に示すように、パンチサイズは OCR 値との線形関係を示しました。これは、この範囲のサイズが実験を進めるのに適切、または許容できることを意味しています。

最適なサイズを特定するには、完全なミトストレステスト (MST) により、基本的にアッセイの全シグナル範囲を含むテストを実行して、 $O_2$  レベルとプロトンレベルのデータを調べる必要があります。一般に、開始時の基礎  $O_2$  レベルは 152 mmHg 前後である必要があります。100 mmHg を下回ってはいけません。また、 $O_2$  レベルは、各測定開始時に完全に回復していなければならない、各測定の終了時に 40 mmHg を下回ってはいけません。極度に低い  $O_2$  レベル (低酸素) に長時間曝露されると、組織の健康状態に悪影響がおよぶ可能性があるからです。さらに、pH レベルは、センサーの直線範囲内 (pH 7.5 (+/- 0.1) ~ 6.5 (+/- 0.1)) になければなりません。この範囲外では、測定の正確度が損なわれる可能性があります。

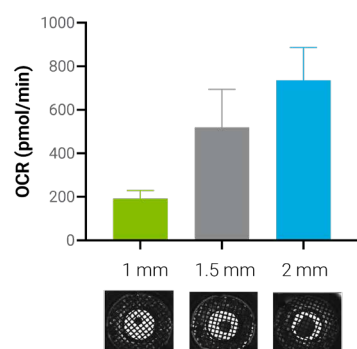


図 5. OCR シグナルと組織パンチサイズの相関。グラフの下画像は、Agilent BioTek Cytation 1 細胞イメージング・プレートリーダーで撮影した、ウェル内のキャプチャリング下の組織ディスクを示しています。

Seahorse XF Flex アナライザーでは、混合の高さと速度が 3D キャプチャマイクロプレート・L 用に最適化されているため、各測定の開始時に培地条件を元の状態に完全に回復させることができます。図 6 は、許容できるデータの例を示しています。アッセイ開始時の  $O_2$  レベルが約 130 mmHg で、各測定開始時には  $O_2$  レベルが完全に回復しています (図 6A)。pH レベルのデータについても、7.5 (+/- 0.1) ~ 6.5 (+/- 0.1) の範囲内に収まっています (図 6B)。

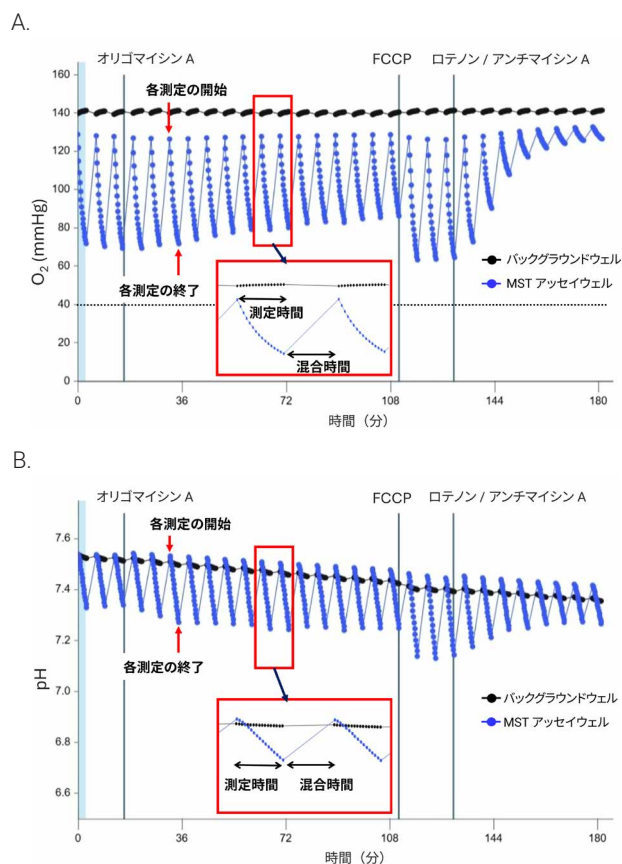
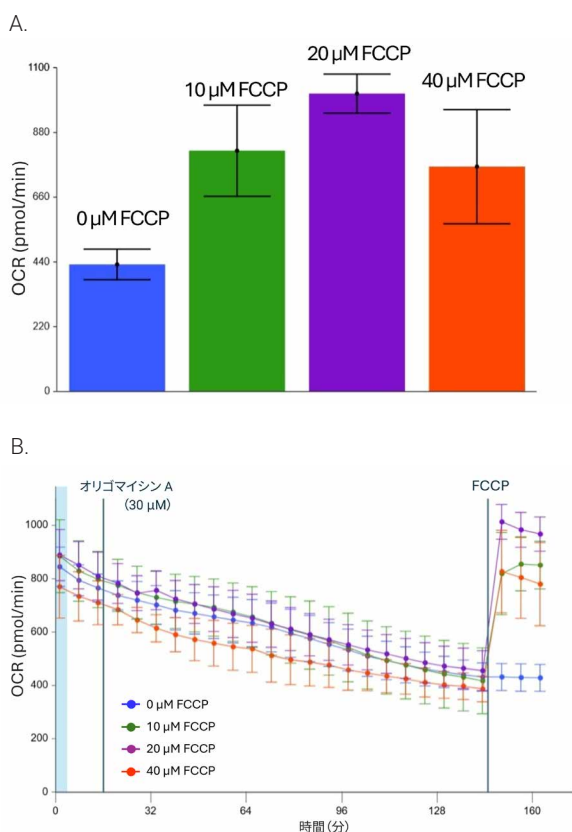


図 6. 適切なレベルの酸素消費 (A) と pH レベル (B) のデータ例

堅牢な結果を得るための最適なモジュレーター濃度は組織によって異なるため、アッセイの最適化時に各モジュレーターの滴定実験を組織タイプごとに行う必要があります。FCCP については、この滴定が特に重要になります。濃度が低すぎたり高すぎたりすると、反応が低減し、最大呼吸能の過小評価につながる可能性があるからです。アッセイ培地への BSA や血清の添加など、バッファーの条件も、最適なモジュレーター濃度に影響する可能性があります。そのため、培地条件を変更した場合は、最適化実験も必要になります。高呼吸の組織タイプの場合、アッセイ中の基質の欠乏を最小限に抑えるために、FCCP 注入バッファーに追加するピルビン酸塩やグルコースなどの基質の濃度を高くすることができます。

図 7 は、Seahorse XF 3D ミトストレステストキットと厚さ 200  $\mu\text{m}$ 、直径 2 mm のラット大脳皮質組織ディスクを使用した、FCCP 濃度の最適化実験の例です。このテストでは、3 回のベースライン測定に続いて、すべてのサンプルにオリゴマイシン A を最終濃度 30  $\mu\text{M}$  で注入しました。オリゴマイシン A 注入後の 20 回の測定後に、さまざまな濃度の FCCP を注入しました。アッセイバッファーには約 0.32 % の BSA が含まれています。このデータから、すべての FCCP 濃度で呼吸が増加し、最大 OCR が 20  $\mu\text{M}$  のときに観察されていることがわかります。以上より、FCCP の最適な濃度は 20  $\mu\text{M}$  であると判断しました。

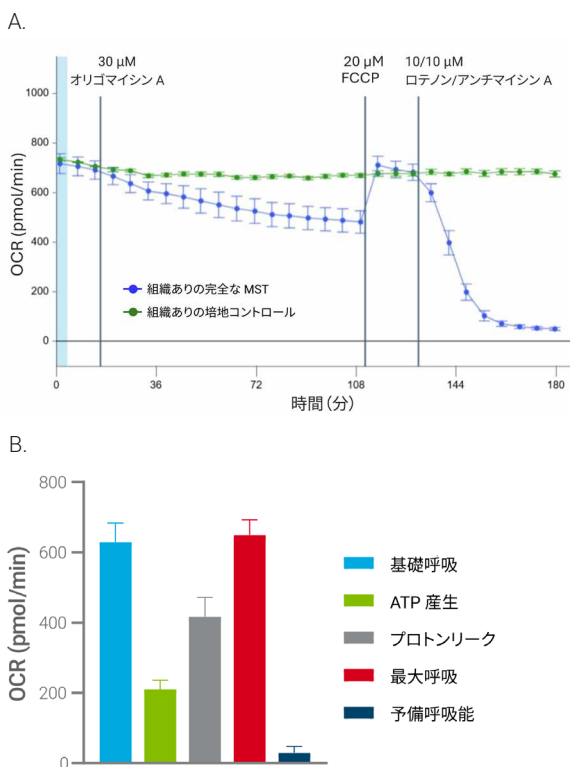


**図 7.** FCCP の最適化。カイネティクスグラフに示されているとおり、すべての実験群に対し、3 回の基礎呼吸測定後にオリゴマイシン A を最終濃度 30  $\mu\text{M}$  で注入しました。A. FCCP 注入後の最初の測定である測定 24 における OCR。グラフに示されている濃度はウェル内の最終濃度です。B. OCR カイネティクスグラフ。n=5~6。

オリゴマイシン A およびロテノン/アンチマイシン A についても最適化実験を実施しました（データは非掲載）。その結果にもとづき、オリゴマイシン A とロテノン/アンチマイシン A の最適な濃度はそれぞれ 30  $\mu\text{M}$  および 10  $\mu\text{M}$  であると判断しました。

## システム性能の評価

3D キャプチャマイクロプレート L、3D MST キット、および Seahorse XF Flex アナライザーで構成される新しいシステムを使用し、前のセクションで説明した最適化条件に従って、ラット脳組織のミトストレステストより得られた結果を図 8 に示します。図からわかるように、堅牢な基礎 OCR と、すべてのモジュレーターへの妥当な反応カイネティクスが観察されました（図 8A）。ミトコンドリア機能を示す主要なパラメーターもすべて得られました（図 8B）。



**図 8.** XF Flex アナライザーで 3D Capture マイクロプレートを使用して実行した、ラット脳組織ディスク（200  $\mu\text{m}$   $\times$  2 mm）を用いた Agilent Seahorse XF ミトストレステストの結果。A. OCR カイネティクスグラフ。B. ミトコンドリア機能の主要なパラメーター。MST ウェルは n=12、組織コントロールウェルは n=3。

これに対し、同じアッセイを Seahorse XFe24 アナライザーで Seahorse XF 豚島キャプチャマイクロプレートを用いて実行したところ、モジュレーターに対する反応がほとんど、またはまったく認められませんでした (図 9)。この 2 つの結果を対照比較すると、3D キャプチャマイクロプレート-L と Seahorse XF Flex アナライザーから成る新しいシステムにより感度とデータの堅牢性が向上することは明白です。このデータは、オリゴマイシン A に対する反応が、培養 2D 細胞で一般的に見られる反応よりはるかに緩慢であることも示しています。したがって、オリゴマイシン A の注入後に少なくとも 10 回の測定を組み込むことを推奨します。また、アッセイの最適化時には、組織コントロール (モジュレーターの追加なし) を各アッセイに加え、アッセイ全体を通して呼吸シグナルの安定性をモニタリングすることも推奨します。

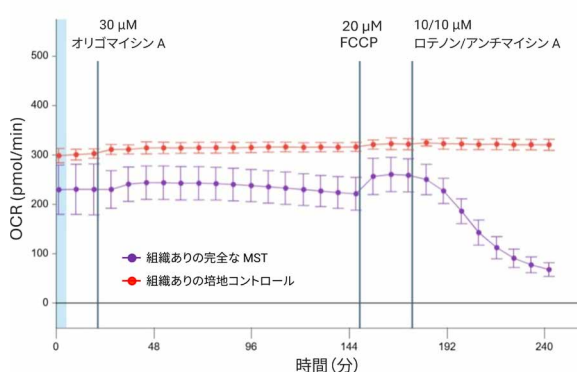


図 9. Agilent Seahorse XFe24 アナライザーで Agilent Seahorse XF 豚島プレートを使用して実行した、ラット脳組織ディスク (200 μm × 2 mm) を用いた Agilent Seahorse XF ミトストレステストの OCR カイネティクスグラフ。MST ウェルは n=12、組織コントロールウェルは n=3。

## 組織の準備に関する考慮事項

Seahorse XF リアルタイム代謝アッセイを成功させるには、アッセイ終了まで組織の機能を確保するために、数時間にわたって健康な状態を維持できる生体組織を使用することがきわめて重要になります。ただし、サンプルの準備に適した条件は組織の種類によって大きく異なる可能性があり、しばしば低温が使用されます。例えば、脳組織および肝組織は、100 % O<sub>2</sub> または 95 % O<sub>2</sub>:5 % CO<sub>2</sub> で酸素添加された、それぞれ氷冷の aCSF または Krebs-Henseleit Buffer (KHB) 中で扱われるのが一般的です。これらの条件を用いることで、スライスによる損傷の影響を軽減できる可能性があります。一方、脂肪組織は室温での準備が可能です。いずれにせよ、組織の準備は切り出し後できるだけ速やかに行う必要があります。ほかのアッセイタイプについては、特定の組織タイプを扱った経験のあるエキスパートに相談するとよいでしょう。

アッセイ結果の一貫性を達成するには、組織のサイズを均一にすることも重要です。文献では、外科剪刀、生検パンチツール、各種組織カッターを使用するなど、小さな組織片を作製する方法がいくつか報告されていますが、アジレントは Precisionary Instruments 社の Compressstome VF-510-0Z をはじめとするピプラトーム組織スライサーと生検パンチツールを併用することを推奨します。この方法では、細胞の損傷を最小限に抑えながら、正確な組織サンプルをすばやく大量に作製することができます。Compressstome VF-510-0Z は使いやすく、Seahorse XF アッセイの実行に推奨される 150 ~ 200 μm の範囲の一貫した厚さの生組織スライスを作製できます。脳組織など、組織タイプによっては、組織をディスク状にパンチする前に、酸素添加された室温のバッファー中に組織スライスを静置または順応させると、データの一貫性の確保に役立つことがわかっています。

組織のスライス後、生検パンチツールで一貫した組織サンプルまたはディスクを作製します。目的とする組織領域の組織ディスクを選択すれば、代謝の空間的差異を研究することもできます。プランジャーが組み込まれた生検パンチツールを使用することを推奨します。これは、3D キャプチャマイクロプレート-L のサンプルチャンバーの中心にサンプルを簡単に移すことができるからです。スライスをパンチする際は、組織スライスの下に柔らかいパッドを敷くことも推奨します。こうすることで、スライスをプランジャー内に押し込みながらきれいな切り口で切断できるため、3D キャプチャマイクロプレート-L のサンプルチャンバーへの組織ディスクの移動が容易になります。また、一般用途のペイントブラシがあると、繊細な組織スライスや組織ディスクを扱う際に便利です。柔らかい毛は組織スライスを移す際の損傷防止にも役立ちます。

3D キャプチャマイクロプレート-L のワーキングボリュームは、ウェルあたり 600 ~ 1000 μL です。ただし、組織サンプルを移す前の最初の培地容量はウェルあたり 50 ~ 100 μL にすることを推奨します。このように少量にしておくと、組織サンプルをウェルの中心に保ちやすくなり、3D キャプチャリングの取り付けも容易になります。キャプチャリングの取り付け後、明視野イメージングシステムでウェル内の組織サンプルの画像を撮影し (倍率 4 倍)、気泡がないか確認することを推奨します。メッシュの下に気泡が閉じ込められていると、異常な O<sub>2</sub> シグナルや pH シグナルが現れ、速度データのばらつきが大きくなる可能性があります。気泡は、Seahorse XF アッセイの実行前に取り除いてください。画像は、組織の配置を評価し、すべてのウェルに組織サンプルが意図どおり収まっていることを確認するうえでも役立ちます。図 10 は、組織を入れ、キャプチャリングを取り付けた状態の 3D キャプチャマイクロプレート-L の明視野画像です。ウェル A3 を除くほとんどのウェルに組織ディスクが適切に配置されていることがわかります。

ウェル A3 では、組織ディスクの半分がリングの下に挟まっています。OCR シグナルを調べると、このウェルで得られた OCR 値はプレートの平均値の 50 % を下回っていました。

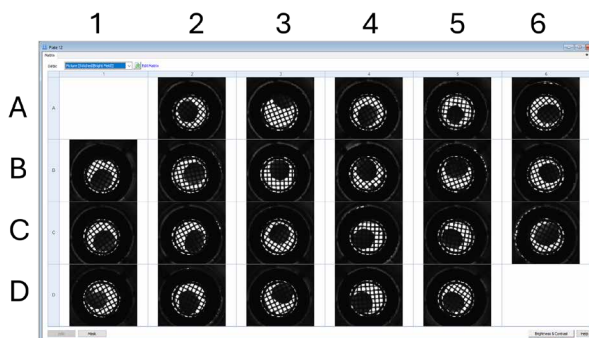


図 10. Agilent Seahorse XF Flex 3D キャプチャマイクロプレート-L の明視野画像。3D キャプチャリングの取り付け後に撮像した、200  $\mu\text{m}$  スライスから作製したラット大脳皮質組織の 2 mm ディスクの BFHC モンタージュ画像（倍率 4 倍）。

## データ解析と正規化オプション

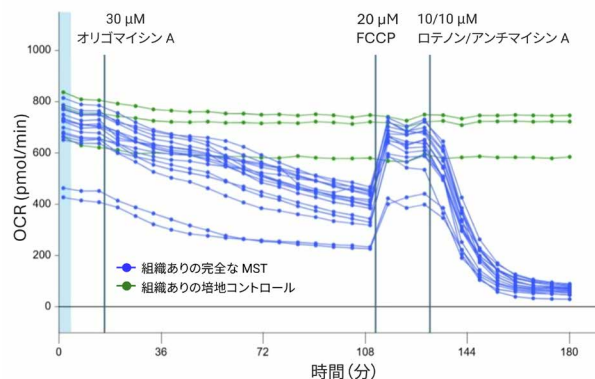
Seahorse XF 代謝アッセイデータの解析は、アジレントのクラウドベースのソフトウェアである Seahorse Analytics を使用して実行できます。このソフトウェアは、直感的なインターフェースによりデスクトップソフトウェアのようなインタラクティブ性を提供し、いつでも世界中どこからでも使用できます。3D ミトストレステストキットのコンパニオンビューも用意されており、3D モデルを用いたアッセイのために設計されたウィジェットから利用できます。このコンパニオンビューには、オリゴマイシン注入なしのデータ解析オプションもあります。

アッセイ結果を解釈するうえで、Seahorse XF 代謝アッセイデータの正規化が重要になります。総タンパク質量、サンプルのサイズまたは重量、ベースラインシグナルに対する割合（ベースラインを基準とした評価）など、3D サンプルにおいて検討できるオプションがいくつかあります。ただし、最適な方法は、研究対象の 3D モデル、研究目的、およびアッセイ条件（培地の組成など）によって異なります。

Seahorse XF 代謝アッセイ後、アッセイプレート中の組織サンプルは  $-80^{\circ}\text{C}$  の lysis buffer 中で数日間保管できるため、総タンパク質量の定量は正規化の方法として好都合です。この場合、組織が適切に溶解されていることが重要になります。アッセイ培地に BSA または血清が含まれている場合は、洗浄ステップが必要です。図 11 に、総タンパク質量で正規化したデータと正規化していないデータを比較します。図からわかるように、青線で表された実験群の 2 つのサンプルがアッセイを通して低い OCR 値を示しています。

一方、総タンパク質量で正規化した OCR 値は、同じ実験群の他のサンプルと同じようなレベルに調整されています。この方法では、細胞内のタンパク質含有量だけが測定されるのではなく、組織材料中に存在する細胞外マトリックスのタンパク質量の影響も受けることに注意してください。

A.



B.

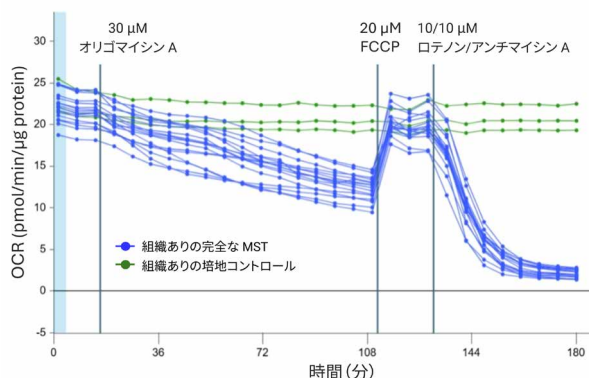


図 11. Agilent Seahorse XF Flex アナライザーで 3D キャプチャマイクロプレート-L を使用して実行した、ラット脳組織ディスク（200  $\mu\text{m}$   $\times$  2 mm）を用いた Agilent Seahorse XF ミトストレステストの OCR カイネティクスグラフ。各線は個々のウェルを表しています。A. 正規化していないデータ。B. ウェルあたりの総タンパク質量にもとづいて正規化したデータ。

サンプルのサイズ/面積または重量による正規化も、自動イメージングシステムで簡単に行えます。一般に、この方法は、一貫した組織サンプルを作製する方法を利用できない場合に使用されます。図 12 は、組織の表面積で正規化したデータの例です。これは図 5 とまったく同じデータです。図 5 では、サイズ 1 mm、1.5 mm、および 2 mm の OCR 値の範囲が 190 ~ 730 pmol/min でしたが、正規化したデータでは、これらの組織サイズの単位面積あたりの OCR 値が 30 % 以内になっています。

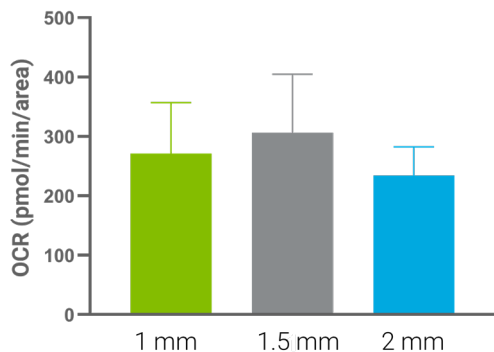


図 12. 図 5 の正規化されていない生データをもとに、サンプル面積で正規化した OCR シグナル。

場合によっては、Seahorse XF アッセイデータをベースラインシグナルまたはカイネティクスグラフ内のいずれかの測定値で正規化することができます。この場合、その他すべての測定値はベースラインシグナルに対する割合で表されます。この方法は、モジュレーターの急性処理に対する反応を比較する必要がある場合に適用できます。特に、同じ実験群内の replicate 間で組織材料が変動している場合に役立ちます。

図 13 は、図 8A と同じ生データにもとづく、ベースラインを基準とした OCR カイネティクスグラフの結果の例です。図からわかるように、すべてのデータポイントのエラーバーが図 8A より小さく、ベースラインを基準としていない元のデータよりはるかに整然としています。この方法は、Seahorse Analytics または Wave ソフトウェアの「Baseline」ボタンにより簡単に実行できます。

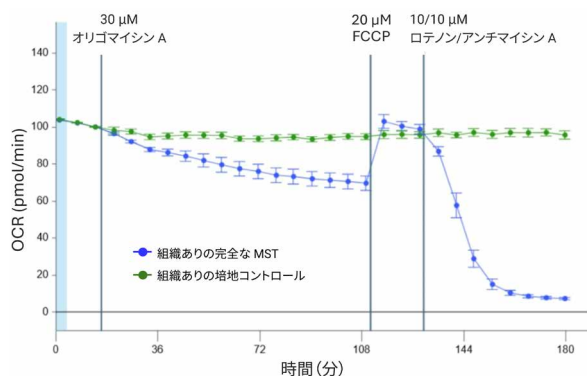


図 13. ベースラインを基準とした、図 8A の OCR カイネティクスグラフ。

## 結論

Agilent Seahorse XF 技術はリアルタイムの代謝解析を実現することにより、生細胞の生体エネルギー測定に変革をもたらしました。以来、この技術は、代謝がどのように疾患進行を促進するのかを理解し、高度な治療薬開発を前進させるうえで不可欠なものになっています。

Seahorse XF Flex アナライザーと、3D サンプルの代謝解析のために設計された 3D キャプチャマイクロプレート-L により、この画期的なシステムは従来の 2 次元細胞培養を超えて拡張され、組織などの 3 次元モデルを用いた生理学的に関連した発見を可能にします。脳組織を用いた実験から、このシステムが、組織の呼吸シグナルと、ミトコンドリアのモジュレーターに対する明確な反応を確実に捉えるために必要な感度を備え、組織の代謝解析をリアルタイムに行える優れたツールであることが実証されました。このアプリケーションノートで説明した助言に従えば、脳組織の代謝の調査において、最小限の労力でより大きな成果を達成することができます。このシステムと効率的なワークフローは、幅広い生物医学研究アプリケーションにおいて他の組織タイプや生物にも容易に適応させることができます。

## 参考文献

- Schwarz, N.; Uysal, B.; Welzer, M.; Bahr, J. C.; Layer, N.; Löffler, H.; Stanaitis, K.; Harshad, P.A.; Weber, Y. G.; Hedrich, U. Long-Term Adult Human Brain Slice Cultures as a Model System to Study Human CNS Circuitry and Disease, eLife, 2019, 8:e48417. DOI: [10.7554/eLife.48417](https://doi.org/10.7554/eLife.48417)
- Lam, M.; Lamanna, E.; Organ, L.; Donovan, C.; Bourke, J.E. Perspectives on Precision Cut Lung Slices-Powerful Tools for Investigation of Mechanisms and Therapeutic Targets in Lung Diseases. Front Pharmacol. 2023, 14:1162889. DOI: [10.3389/fphar.2023.1162889](https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1162889)
- Dewyse, L.; Reynaert, H.; Van Grunsven, L. A. Best Practices and Progress in Precision-Cut Liver Slice Cultures. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(13), 7137. DOI: [10.3390/ijms22137137](https://doi.org/10.3390/ijms22137137)
- Siwczak, F.; Hiller, C.; Pfannkuche, H.; Schneider, M. Culture of Vibrating Microtome Tissue Slices as a 3D Model in Biomedical Research. J Biol Eng 2023, 17, 36 DOI: [10.1186/s13036-023-00357-5](https://doi.org/10.1186/s13036-023-00357-5)

5. Fried, N. T.; Moffat, C.; Seifert, E. L.; Oshinsky, M. L. Functional Mitochondrial Analysis in Acute Brain Sections From Adult Rats Reveals Mitochondrial Dysfunction in a Rat Model of Migraine. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2014 Dec 1, 307(11):C1017-30.DOI: [10.1152/ajpcell.00332.2013](https://doi.org/10.1152/ajpcell.00332.2013)
6. Schuh, R. A., Clerc, P.; Hwang, H.; Mehrabian, Z.; Bittman, K.; Chen, H.; Polster, B.M.Adaptation of Microplate-Based Respirometry for Hippocampal Slices and Analysis of Respiratory Capacity. *J. Neurosci. Res.* 2011, 89:1979–1988.DOI: [10.1002/jnr.22650](https://doi.org/10.1002/jnr.22650)
7. Underwood, E.; Redell, J. B.; Zhao, J.; Moore, A. N.; Dash, P. K. A Method for Assessing Tissue Respiration in Anatomically Defined Brain Regions. *Sci Rep.* 2020, 10(1):13179, DOI: [10.1038/s41598-020-69867-2](https://doi.org/10.1038/s41598-020-69867-2)
8. Qi, G.; Mi, Y.; Yin, F. Characterizing Brain Metabolic Function Ex Vivo With Acute Mouse Slice Punches. *STAR Protoc.* 2021, May 23; 2(2):100559.DOI: [10.1016/j.xpro.2021.100559](https://doi.org/10.1016/j.xpro.2021.100559)

このアプリケーションで使用した製品

**アジレント製品**

[Agilent Seahorse XF Flex アナライザー](#) 

ホームページ

[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)

カスタムコンタクトセンタ

**0120-477-111**

**[email\\_japan@agilent.com](mailto:email_japan@agilent.com)**

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、  
医薬品医療機器等法に基づく登録を行っていません。  
本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに  
変更されることがあります。

RA250418.240

アジレント・テクノロジー株式会社  
© Agilent Technologies, Inc. 2025  
Printed in Japan, April 28 2025  
5994-8309JAJP

販売店

**プライムテック株式会社**

東京都文京区小石川 1-3-25 小石川大国ビル2F

Phone: [東京] 03-3816-0851

[大阪] 06-6310-8077

E-mail: [inst-sales@primetech.co.jp](mailto:inst-sales@primetech.co.jp)



**Agilent**

Trusted Answers