

生組織サンプルを用いた代謝測定のための 改良型アッセイワークフロー

Agilent Seahorse XF Flex
3D キャプチャマイクロプレート-L を用いて

はじめに

Agilent Seahorse XF Flex アナライザーと、3D 研究モデル用の専用マイクロプレート Agilent Seahorse XF Flex 3D キャプチャマイクロプレート-L を組み合わせることで、代謝研究は大きく前進します。このプラットフォームはさらに優れた感度と一貫性、広い検出範囲を備え、組織スライス、オルガノイド、小さな生物などの 3D モデルの研究を促進します。これらのモデルから得られる生理学的に関連するデータをもとに、複雑な生物学的プロセスの深層を探ることができます。

組織スライスは、入手しやすく、コスト効率が高く、それ自体の組織構造に支持細胞タイプが含まれていることから、特に注目に値します。この Technical Overview では、Seahorse XF Flex アナライザーと Seahorse XF Flex 3D キャプチャマイクロプレート-L を用いた、肝組織の代謝解析用に最適化されたワークフローについて概説します。このワークフローは特に 3D サンプルの酸素消費速度 (OCR) と細胞外酸性化速度 (ECAR) を測定するために設計されており、生組織モデルの代謝解析を高い感度と一貫性でリアルタイムに行うことができます。

ワークフロー

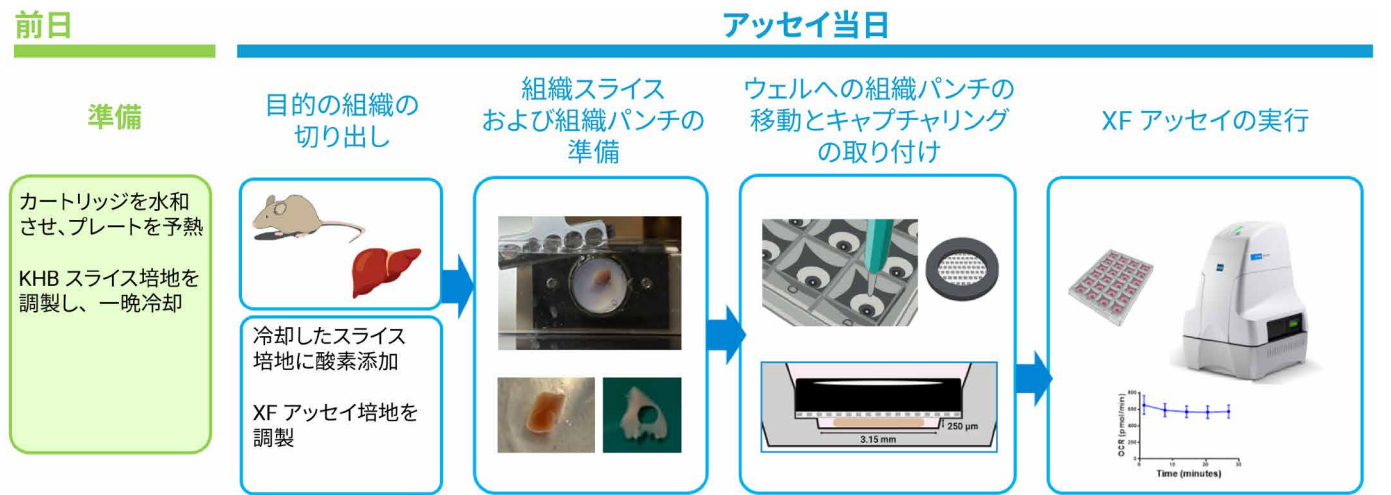


図 1. Agilent Seahorse XF 組織解析ワークフロー。ピプラトームで組織スライスを準備し、生検ツールで一貫したサイズのパンチを作製します。組織パンチを Agilent Seahorse XF Flex 3D キャプチャマイクロプレート-L のサンプルチャンバーに入れ、3D サンプル用に最適化された専用のキャプチャリングで適切な位置に保持します。

実験方法

今回の研究で実行した Seahorse XF 組織解析ワークフローの概略を図 1 に示します。

肝組織パンチの作製

Precisionary Instruments 社の推奨に従って、解剖直後のラット肝組織を冷却した酸素添加 Krebs-Henseleitバッファー中で 150 μm にスライスしました¹。その後、Ted Pella 社製生検ツールで直径 1 ～ 2 mm のパンチを作製し、Agilent Seahorse XF DMEM アッセイ培地入りの XF Flex 3D キャプチャマイクロプレート-L に移しました。組織サンプルをサンプルチャンバー内に保持するため、各ウェルにキャプチャリングを挿入しました。視認できる気泡はピペットで除去しました。

イメージング

キャプチャリングの取り付け前後に、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倍率 4 倍のハイコントラスト明視野画像を撮影しました。画像を評価して、サンプルがウェルの中心位置にあることを確かめ、各組織パンチのサイズを確認しました。その後、2 回の直径測定から円形サンプルの面積を計算しました。

生組織の代謝解析

基礎 OCR および基礎 ECAR の測定値の収集には、Agilent Seahorse XF Flex および XFe24 アナライザーを使用しました。XF Flex のプロトコルは、混合 3 分間、待機 0 分間、測定 3 分間を 1 サイクルとする 5 サイクルで構成されていました。XFe24 アナライザーのプロトコルには、混合ステップと測定ステップの間に 2 分間の待機が含まれていました。各アナライザーで使用したマイクロプレートを表 1 に示します。

表 1. Agilent Seahorse XF キャプチャプレートとアナライザーの適合性

マイクロプレート	適合アナライザー	測定チャンバーの高さ
Seahorse XF Flex 3D キャプチャマイクロプレート-L	Seahorse XF Flex アナライザー	762 μm
Seahorse XF24 篩島キャプ チャマイクロプレート	Seahorse XFe24 アナライザー	1422 μm

タンパク質の定量

基礎代謝の測定に続き、組織を PBS で洗浄し、プロテアーゼ阻害剤を含む RIPA バッファーで溶解しました。凍結/融解および解離後に、ライセートのタンパク質含有量を Pierce BCA assay と Agilent BioTek Synergy H1 ハイブリッドマルチモード・プレートリーダーで測定しました。

アッセイの感度と正確度

アナライザーとマイクロプレートの改良により堅牢な結果を提供

XF Flex アナライザーと 3D キャプチャマイクロプレート-L を組み合わせることで、優れた組織代謝測定が実現します。このアナライザーとマイクロプレートはどちらも、性能が大幅に強化されています。アナライザーは優れた性能を誇り²、3D サンプルに対する性能を最適化する専用の混合プログラムを採用しています。また、小さな測定チャンバーと大きな開口部を特徴とするマイクロプレートのキャプチャリングの設計により、組織サンプルの代謝測定が格段に改善されます。

これらの改善点を実証するために、異なるプラットフォームとマイクロプレートで測定した基礎 OCR および基礎 ECAR データを比較しました。肝組織スライスと組織パンチは、同一条件下で作製しました。一方の測定群では 3D キャプチャマイクロプレート-L と XF Flex アナライザーを使用し、もう一方の測定群では藤島キャプチャマイクロプレートと XFe24 アナライザーを使用しました。

図 2 に示すように、XF Flex アナライザーと 3D キャプチャマイクロプレート-L で収集した基礎 OCR データは、より高い堅牢性を示しました。このプラットフォームでは、組織サイズが大きくなるにつれ OCR が明らかに増加しています。これはデータの正確度が優れていることを表しています。また、XF Flex プラットフォームで測定した基礎 ECAR データ（図 3）は、より堅牢であることに加え、アナライザーの推奨動作範囲内（XF Flex アナライザーの場合は > 10 mpH/min）では定量も可能です。これに対し、XFe24 アナライザーと藤島キャプチャマイクロプレートによる測定値は大きなばらつきを示し、XFe24 アナライザーの推奨動作範囲の下限を下回りました。このように、XF Flex アナライザーと 3D キャプチャマイクロプレート-L を使用することで、感度と正確度が明らかに向上し、組織検体の包括的な代謝評価が可能になります。

再現性

ばらつきを抑えることで組織代謝の特性解析の品質を向上

XF Flex アナライザーと 3D キャプチャマイクロプレート-L を用いることにより、OCR および ECAR の各シグナルが改善するだけでなく、ばらつきが大幅に低減します。図 4 から、2 mm パンチの基礎 OCR が、独立した複数の実験にわたって高い再現性を示していることがわかります。この著しい改善は、実験群間の差異を検出する優れた性能と、組織代謝の特性解析における堅牢性の向上につながります。

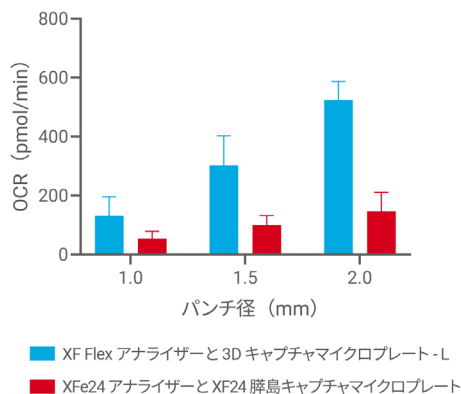


図 2. 肝組織パンチの基礎 OCR 測定値。Agilent Seahorse XF Flex アナライザーで Agilent Seahorse XF Flex 3D キャプチャマイクロプレート-L により得られた OCR 測定値は、パンチ径範囲にわたってシグナルが目に見えて改善しています。データは、3 回の独立した実験の平均値 ± SD を表しています。

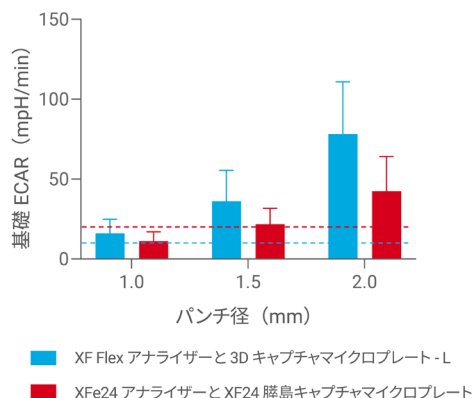


図 3. 肝組織パンチの基礎 ECAR 測定値。Seahorse XFe24 アナライザーで Agilent Seahorse XFe24 藤島キャプチャマイクロプレートにより収集した ECAR 測定値は、この装置の推奨下限 (20 mpH/min、赤色の破線) を下回っています。一方、Agilent Seahorse XF Flex アナライザーで Agilent Seahorse XF Flex 3D キャプチャマイクロプレート-L を用いて収集した ECAR 測定値は、この装置の推奨下限 (10 mpH/min、青色の破線) を上回っています。データは、3 回の独立した実験の平均値 ± SD を表しています。

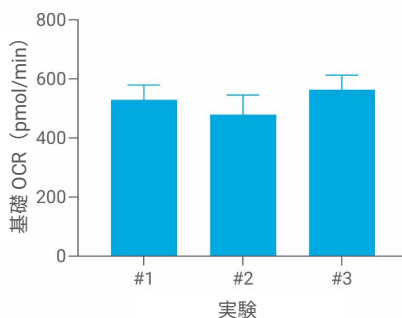


図 4. Agilent Seahorse XF Flex アナライザーで Agilent Seahorse XF Flex 3D キャプチャマイクロプレート-L により得られた、2 mm 肝組織パンチの基礎 OCR 測定値 (平均値 ± SD)。独立した実験にわたって再現性の高いデータが得られています。

正規化

画像にもとづく正規化

細胞のコンフルエンスやサンプル調製の違いによるウェル間のばらつきを最小限に抑えるには、細胞外フラックスデータの正規化が不可欠です。今回の研究で用いた XF Flex アナライザーによる組織解析ワークフローでは、組織スライスの厚さとパンチ径を厳密に管理することが、データの一貫性を確保するうえで極めて重要になります。そのために、キャプチャリングを取り付ける前に、図 5 に示す明視野画像を撮影し、組織面積を計算することができます。OCR と組織面積との間に線形関係があると仮定すると（図 6A）、OCR データを組織面積に対して正規化すれば、データ品質をさらに高めることができます。図 6C に示す正規化後の OCR データは、パンチサイズ 1.5 mm および 2 mm について同等の結果を示しています。

タンパク質濃度にもとづく正規化

このほか、タンパク質含有量にもとづいてデータを正規化する方法もあります。ライセートの調製やタンパク質の測定など追加のサンプル処理ステップが必要になりますが、細胞の密度や不均一性が変化するような組織タイプには、この方法の方が適している場合があります。高品質の 3D 代謝測定値を得るために、いずれかの正規化方法を評価することができます。

サンプル調製の最適化

パンチサイズが小さいほど、ばらつきが増大

XF Flex アナライザーと 3D キャプチャマイクロプレート-L では、1 mm パンチに対して測定可能な結果が得られていますが、ばらつきがはるかに大きいことは明らかです（図 6C）。堅牢なデータを得るために、目的とするモデル用に組織の準備を最適化することを推奨します。今回の実験では、1 mm パンチにおけるばらつきの主因が、それぞれのパンチから、各ウェルの中心に位置する XF Flex アナライザーのカートリッジセンサーまでの距離の変動であるという仮説を立てました。図 5A には、右側の 2 列に 1 mm パンチが表示されていますが、それぞれのサンプルチャンバー内での位置が大きく変化しています。それとは対照的に、左側の 2 列に表示されている 2 mm パンチは、センサーが位置しているウェル中心までの距離がより一貫しています。



図 5. (A) キャプチャリングを取り付ける前の肝組織パンチのハイコントラスト明視野画像（倍率 4 倍）。(B) 直径の測定値が示された代表的なウェル

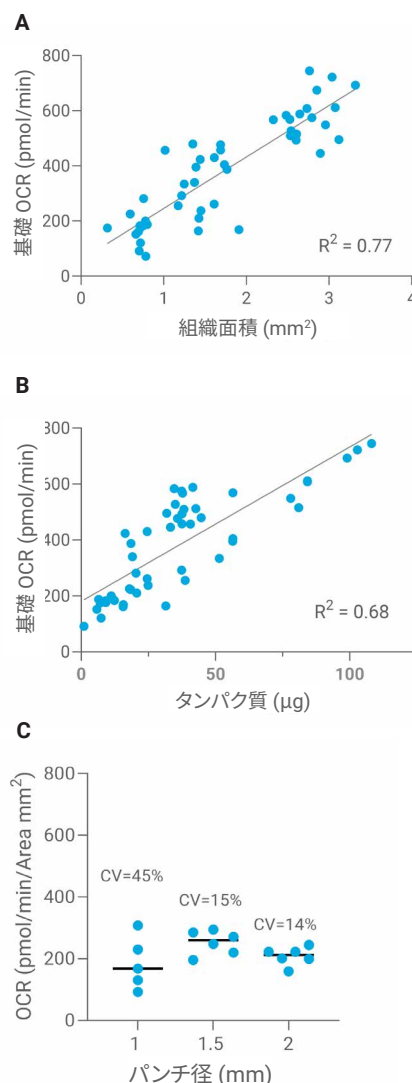


図 6. 基礎 OCR と (A) 組織面積または (B) ウェルあたりのタンパク質含有量との相関。正規化後の OCR (C) は、パンチサイズ範囲にわたって同様にスケールされたデータを示しており、1.5 mm および 2 mm の組織スライスパンチでの性能がより高いことがわかります。

結論

Agilent Seahorse XF Flex 3D キャプチャマイクロプレート-L は、組織や小さな生物など生理学的に関連した 3D モデルタイプの代謝特性解析のために設計されています。Agilent Seahorse XF Flex アナライザーと組み合わせることで、感度、正確度、再現性が大幅に向上し、組織の代謝特性解析ツールとして威力を発揮します。また、ここで説明した正規化方法とサンプル最適化方法を用いることで、データ品質をさらに高めることができます。このワークフローは適応性があり、さまざまな種類の 3D サンプルに適用できます。データの堅牢性、信頼性、再現性を確保し、これまでない方法でモデルを研究する新たな道を切り拓くことができます。

参考文献

1. Precisionary Reference Protocols, page 275. https://precisionary.com/wp-content/uploads/2024/10/References_Protocols_Packet.pdf
2. Agilent Seahorse XF Flex アナライザー, データシート, 資料番号 5994-8028JAJP. <https://www.agilent.com/cs/library/specifications/public/seahorse-xf-flex-technical-details-specifications-5994-8208ja-jp-agilent.pdf>

このアプリケーションでを使用した製品

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

カスタムコンタクトセンタ

0120-477-111

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。

RA250418.241

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
5994-8286JAJP

販売店