

Agilent Seahorse XF Flex 3D キャプチャ マイクロプレート-S を用いた膵島および スフェロイドにおけるリアルタイム代謝 解析の改善

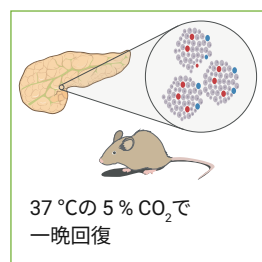
はじめに

Agilent Seahorse XF 技術は、リアルタイムな機能的代謝解析を提供する一体型のラベルフリープラットフォームであり、酸素消費速度（OCR）や細胞外酸化速度（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。Agilent Seahorse XF Flex アナライザーは、優れた感度と精度、広い検出範囲を備えています。組織、オルガノイド、共培養物などの 3 次元（3D）研究モデルに使用できる、最適化されたワークフロー専用の消耗品も用意されています。

この技術概要では、Seahorse XF Flex アナライザーと Agilent Seahorse XF Flex 3D キャプチャマイクロプレート-S を使用して、感度を向上させ、サンプル必要量を削減した、膵島代謝解析のための最適化されたワークフローを紹介します。このワークフローは、インスリン分泌と膵島全体の健康状態を促進する、主要なエネルギー経路に関するデータを提供しており、研究者は、グルコース反応性、ミトコンドリア効率、膵島集団における機能的不均一性に関する貴重な知見を得ることができます。これらのデータは、機能不全の膵島を同定して、培養条件を最適化し、治療的介入を評価するのに役に立ち、糖尿病研究の進展、膵島移植の成果向上、標的療法の開発に貢献します。さらに、このワークフローは、小さいマルチスフェロイドサンプルにも対応しており、3D 代謝解析における幅広いアプリケーションに適しています。

アッセイ前日

膵島を単離させ、
アッセイを準備

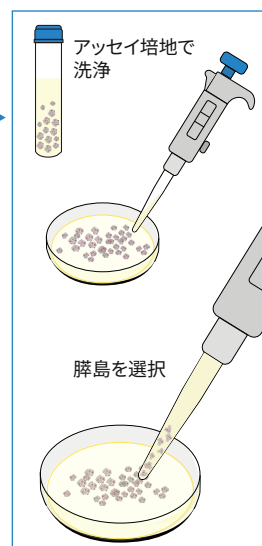


カートリッジを水和させ、
プレートを予熱

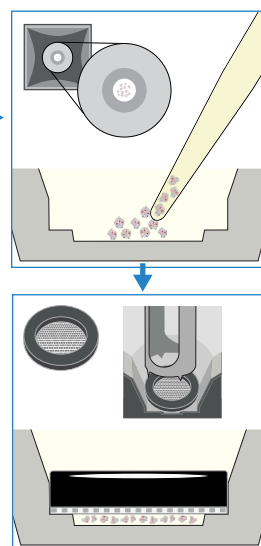
アッセイテンプレートを準備

アッセイ当日

培地を調製し、膵島を回収



膵島をウェルに移し、
キャプチャスクリーンを取り付け



化合物を調製し、XF アッセイを実施

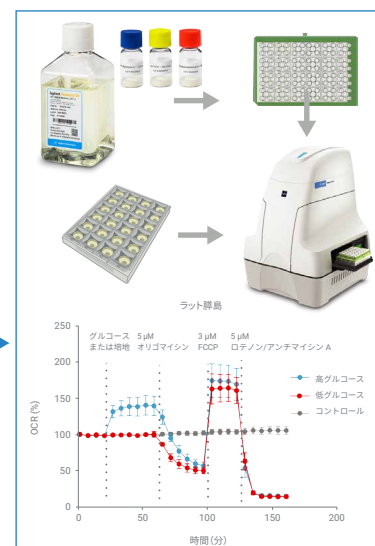


図 1. Agilent Seahorse XF 3D キャプチャマイクロプレート-S を用いた膵島ワークフロー。膵島を XF 3D キャプチャマイクロプレート-S のサンプルチャンバーに入れ、小さい 3D サンプル用に最適化された専用のキャプチャスクリーンで適切な位置に保持します。

膵島 XF アッセイワークフロー

図 1 に示すアッセイワークフローは、膵島サンプルを用いた Agilent Seahorse XF アッセイ（サンプル調製、アッセイプレート組み立て、必要な材料を含む）を実施するための主要なステップについて説明しています。以下のサブセクションでは、関係する各ステップの詳細について説明します。このワークフローは、必要に応じて、意図する研究目的に合わせて変更できます。

アッセイ手順

アッセイ前日

カートリッジを水和させ、37 °C の非 CO₂ インキュベーターに入れます。XF 3D キャプチャマイクロプレート-S およびスクリーンを 37 °C の非 CO₂ インキュベーターに入れ、プラスチックを一晩脱気します。

膵島の単離

ラボで使用しているプロトコルに従って全膵島を調製し、膵島培養の標準的な条件下で一晩回復させます。^{1~3} 本研究で使用した膵島は、Prodo Laboratories または Joslin Diabetes Center から購入したものであり、8 ~ 12 週齢のオスの Sprague Dawley ラット 5 匹から単離されています。Prodo Labs の膵島は、36 時間プールして回復させ、PIMT 培地 (Prodo Laboratories) 中に 6 ~ 10 °C に保ち、翌日配達便で輸送しました。到着後、膵島を PIM(R) 培地で洗浄し、遠心分離後、10 mL の完

全な PIM(R) 培地あたり 2,500 IEQ で再懸濁しました。Joslin Diabetes Center の膵島は、単離当日に、グルタミン、10 % ウシ胎児血清 (FCS)、1 % ペニシリン/ストレプトマイシンを含む RPMI 1640 培地において氷上で輸送し、1 mL あたり 100 個の膵島で同じ培地に入れました。膵島は、XF アッセイ実施前に、非組織培養処理ペトリ皿において、37 °C の 5 % CO₂ で一晩回復させました。

腫瘍スフェロイドの調製

HCT116-H2B-GFP 細胞は、10 % ウシ胎児血清 (FBS)、2 mM グルタミン、およびペニシリン/ストレプトマイシン抗生物質を添加した Advanced DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) で維持しました。細胞は、37 °C の 5 % CO₂ の加湿インキュベーターで維持し、80 % コンフルエンスで定期的に継代しました。HCT116-H2B-GFP スフェロイドは、6 ウェル Elplasia 丸底プレート (Corning) にキャピティあたり 200 細胞を播種して調製しました。スフェロイドは、アッセイに使用する前に、6 ~ 7 日間で直径約 150 μ m のサイズに到達するように培養しました。

アッセイ当日：臍島ワークフロー

臍島 XF アッセイ培地の調製

表 1 に従い、2.5 mM グルコース、2 mM グルタミン、1 mM ビルビン酸塩を添加した、100 mL Agilent Seahorse XF DMEM pH 7.4 アッセイ培地を調製します。50 mL を新しい 50 mL チューブに移して、化合物溶液の調製と、キャプチャスクリーンの事前湿潤に使用します。残りの培地に脂肪酸フリーのウシ血清アルブミン (BSA) を添加し、最終濃度を 0.2 % とします (表 2)。すべての培地を 37 °C まで予熱します。

表 1. Agilent Seahorse XF アッセイ培地 (BSA なし)

試薬	製品番号	[最終] (mM)	容量 (mL)
XF DMEM 培地、pH 7.4	103575-100	-	100
XF 1.0 M グルコース溶液	103577-100	2.5	0.25
XF 200 mM グルタミン溶液	103578-100	2	1.0
XF 100 mM ビルビン酸塩溶液	103579-100	1	1.0

表 2. 0.2 % BSA アッセイ培地の調製

試薬	最終 %	ストック溶液 %	容量 (mL)
Seahorse XF アッセイ培地 (表 1)	-	-	50
100 mg/mL BSA (脂肪酸フリー)	0.2	10	1.0

臍島のための Seahorse XF Flex 3D キャプチャマイクロプレート-S の設定

BSA を含まない XF アッセイ培地を入れた 60 mm ペトリ皿で、キャプチャリングを事前に湿らせます。ピンセットでキャプチャリングをメッシュ側を下にして培地内に押し込み、必要に応じて気泡を除去します。XF 3D キャプチャマイクロプレート-S の各ウェルに 525 µL の 0.2 % BSA アッセイ培地を添加し、プレートへの臍島のロードを開始する準備が完了するまで、非 CO₂ インキュベーターに戻します。

60 mm ペトリ皿 (滅菌未処理) に 6 mL の 0.2 % BSA アッセイ培地を添加します。ピペットチップやその他のプラスチックの表面に臍島が付着するのを防止するため、この培地でピペットチップやその他のプラスチックを事前に湿らせておきます。実験に使用するのに十分な量の臍島をソースプレートから採取します。最初に、ソースプレートをフード内で穏やかに攪拌して臍島を中央に集めてから、事前に湿らせたピペットチップで臍島を採取し、6 mL の 0.2 % BSA アッセイ培地を入れた 60 mm ペトリ皿に移します。あるいは、培養皿から臍島を採取するには、臍島の濃度に基づいて適切な量の臍島培養液を取り出し、15 mL チューブに分注します。自然落下させるか、または 200 x g で 2 分間遠心分離して、臍島を沈降させます。維持培地を取り除き、0.2 % BSA アッセイ培地で臍島を再懸濁して、未処理の 60 mm ペトリ皿に移します。

顕微鏡下で、事前に湿らせた P10 ピペットを用いて、ペトリ皿から 4 ~ 10 µL のアッセイ培地で臍島を採取しますが、この際、サイズが均一になるように選択します。キャプチャプレートへロードするには、ピペットチップを培地の中を通してウェルの底部中央まで入れ、臍島を中央チャンバーへゆっくりと排出します。自然落下により、臍島をチップの下に向けて誘導します。ゆっくりと排出することにより、臍島を中央に集めます。**ウェル A1 および D6 には臍島をロードしないでください。**これらはバックグラウンドウェルであり、培地のみを含める必要があります。

ヒント：排出が開始されると、臍島はチップから落下し始めます。完全に排出してウェルに空気を押し込まないでください。臍島を採取する前に、必ずチップを事前に湿らせておき、チップ内に気泡が存在しないことを確認してください。

事前に湿らせたキャプチャリングを、Agilent Seahorse XF 3D キャプチャスクリーン挿入ツールまたはピンセットでウェルに静かに押し込み、バックグラウンドウェルを含む、プレートのすべてのウェルに配置します。アッセイ前に、プレートを 37 °C の非 CO₂ インキュベーターで 30 ~ 45 分間インキュベートします。配置状態を評価するために、サンプルの画像 (明視野) を撮影することを推奨します。

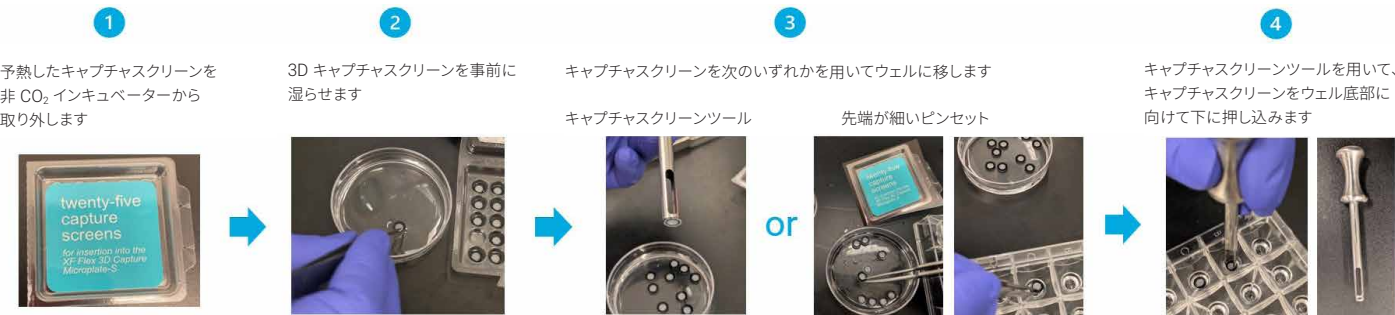


図 2. キャプチャスクリーンの取り付け

臍島を用いた Seahorse XF ミトストレステストの実施

センサーカートリッジおよび Agilent Seahorse XF ミトストレステスト化合物の調製については、『[Agilent Seahorse XF 3D Mito Stress Test kit user guide](#) (Agilent Seahorse XF 3D ミトストレステストキットユーザーガイド)』に詳細に説明されています。以下の表 3 および表 4 に、ストック溶液および注入溶液の調製について示しています。注入するすべての化合物の調製には、BSA を含まない Seahorse 臍島 XF アッセイバッファー (表 1) を使用しました。グルコース注入溶液は、臍島ミトストレステストの最初の注入または急性注入に使用する、Seahorse XF 1.0 M グルコース溶液を希釈して調製します。

カートリッジ上のインジェクションポートに化合物をロードする前に、ハイドロブースターが取り外されていることを確認します。

表 3. Agilent Seahorse XF 3D ミトストレステストキットを用いたストック溶液の調製

試薬	添加する容量 (mL)	ストック溶液 (μM)
オリゴマイシン A	2.7	270
FCCP	2.7	200
ロテノン/アンチマイシン A	2.7	110

表 4. 525 μL の開始ウェル容量のための注入溶液の調製

注入溶液	ストック溶液 (μL)	アッセイ 培地 (μL)	インジェクション ポートと容量	【最終ウェル】 (μM)
グルコース (8 倍)	341 (1 M ストック溶液)	2659	ポート A : 75 μL	16700 (+14200)
オリゴマイシン A (9 倍)	500	2500	ポート B : 75 μL	5
FCCP (10 倍)	450	2550	ポート C : 75 μL	3
*ロテノン/アンチマイシン A (11 倍)	1500	1500	ポート D : 75 μL	5

Agilent Seahorse Wave Controller ソフトウェアで提供されている **XF Islet Mito Stress Test (Acute) assay テンプレート**は、デフォルト設定で各サイクルにおいて、3 分間の混合、0 分間の待機、3 分間の測定を実施するように、臍島サンプルに対して最適化されています。サイクル数は、基礎測定 4 サイクル、グルコース注入後 6 サイクル、オリゴマイシン A 注入後 6 サイクル、FCCP 注入後 3 サイクル、ロテノン/アンチマイシン A 注入後 6 サイクルに設定されています。最終インジェクションポートに Hoechst 色素を最終濃度 2 μM で添加することにより、アッセイ後の臍島の蛍光イメージングが可能になります。

XF 臍島ミトストレステスト (急性) アッセイを実施するには、XF Flex Controller ソフトウェアの利用可能なテンプレートのリストから、**XF Islet Mito Stress Test (Acute) assay テンプレート**を選択します。アッセイのグループ (細胞のタイプまたは条件)、プレートレイアウトマップ、機器プロトコルを確認し、必要に応じて変更します。Review (確認) およ

び run (実行) 画面で、**Scan Assay Kit (アッセイキットをスキャン)** をクリックして、アッセイキット情報ダイアログを表示します。利用可能な場合は、外部ハンドヘルドバーコードリーダーを使用して、キット箱ラベル (外側) 上のバーコードをスキャンします。これにより、アッセイキットの部品番号とロット番号がこのダイアログに自動的に追加されます。追加されない場合は、キット情報を手動で入力します。**SW ID** フィールドには、キット箱ラベル上のソフトウェアコードを手動で入力します。**Apply (適用)** をクリックします。ソフトウェアにより、この情報がデータファイルに埋め込まれます。**Start Run (分析を開始)** をクリックして、アッセイを開始します。指示が表示されたら、カートリッジの蓋を取り外し、ロードしたセンサーカートリッジとキューティリティプレートをサーマルトレイ上に配置します。プレートの方向が正しく、カートリッジの蓋およびハイドロブースターが取り外されていることを確認します。その後、**I'm Ready (準備完了)** をクリックします。キャリブレーションには約 15 ~ 20 分かかります。キャリブレーションの完了後、**Open Tray (トレイを開く)** をクリックしてキューティリティプレートを取出し、細胞プレートをロードします。ロードする前に、細胞プレートの蓋が取り外されていることを確認します。**Load Cell Plate (細胞プレートをロード)** をクリックして、アッセイを実施します。

アッセイ当日：スフェロイドワークフロー

スフェロイドの XF アッセイ培地の調製

グルコース以外は表 1 に従い、100 mL の Agilent Seahorse XF DMEM アッセイ培地を調製します。スフェロイドには、2.5 mM ではなく 10 mM グルコースを使用します。培地を 37 °C まで温めます。

スフェロイドのための Seahorse XF Flex 3D マイクロプレートの設定

3 mL XF アッセイ培地で穏やかに洗浄して、Elplasia 培養プレートからスフェロイドを回収します。15 mL コニカルチューブに移し、自由落下により沈降させます (これには、15 ~ 20 分かかる場合があります)。スフェロイドへの損傷を最小限に抑えるために、約 500 μL を残した状態で、培地の大部分をゆっくりと取り除きます。スフェロイドを 5 mL の XF アッセイ培地で再懸濁して、非コーティングの 60 mm ペトリ皿に移し、臍島の場合について上述したように、XF 3D キャプチャマイクロプレートに直接手作業で採取して移します。

キャプチャプレートの各ウェルに 600 μL の XF アッセイ培地を添加します。顕微鏡下で、事前に湿らせた P10 ピペットを用いて、4 ~ 10 μL のアッセイ培地で必要な数のスフェロイドをペトリ皿から採取します。**ウェル A1 および D6 にはスフェロイドをロードしないでください。**これらはバックグラウンドウェルであり、培地のみを含める必要があるためです。その後、臍島アッセイ設定の手順に従い、事前に湿らせた 3D キャプチャリングをすべてのウェルに配置します。

スフェロイドを用いた Seahorse XF 3D ミトストレステストの実施

本研究では、Agilent Seahorse XFミトストレステストキット (部品番号 103015-100) を使用しました。このキットに含まれる化合物の量は、HCT116-H2B-GFP スフェロイド (約 150 μm) に対して十分であるためです。化合物はすべて、表 5 および表 6 に従ってアッセイ培地で調製しました。カートリッジ上のインジェクションポートに化合物をロードする前に、ハイドロブースター が取り外されていることを確認します。

表 5. Agilent Seahorse XF ミトストレステストキットを用いたストック溶液の調製

化合物	添加する容量 (μL)	ストック溶液 (μM)
オリゴマイシン	630	100
FCCP	720	100
ロテノン/アンチマイシン A	540	50

表 6. 600 μL の開始ウェル容量のための注入溶液の調製

注入溶液	ストック溶液 (μL)	アッセイ 培地 (μL)	インジェクション ポートと容量	【最終ウェル】 (μM)
オリゴマイシン (9 倍)	621	1679	ポート B : 75 μL	3
FCCP (10 倍)	230	2070	ポート C : 75 μL	1
*ロテノン/ アンチマイシン A (11 倍)	506	1794	ポート D : 75 μL	1

Agilent Seahorse Wave Controller ソフトウェアで提供されている **3D Mito Stress Test テンプレート**を使用して、サイクル数を調整しました。このテンプレートは 3D 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、基礎測定 3 ~ 4 サイクル、オリゴマイシン注入後 8 サイクル、FCCP 注入後 3 サイクル、ロテノン/アンチマイシン A 注入後 6 サイクルに調整しました。最終インジェクションポートに Hoechst 色素を最終濃度 2 μM で添加することにより、アッセイ後のスフェロイドの蛍光イメージングが可能になります。

臍島ワークフローに記載された手順に従って、XF ミトストレステストを実施して完了します。

アッセイ当日：イメージング

XF アッセイ前後において、Agilent BioTek Lionheart または Cytation イメージングシステムを用いて、4 倍の倍率で明視野画像および蛍光画像を撮影することにより、サンプル交換とデータ正規化を評価しました。

XF 3D ミトストレステストデータの解析

ウェブ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、XF 3D ミトストレステストの結果ファイルの解析を実施しました。Seahorse Analytics の XF 3D Mito Stress Test コンパニオンビューを使用すると、主要なアッセイパラメーターが自動的に計算され、グラフで表示されます。

材料および機器

表 7. ワークフローで使用了材料および機器

材料	販売元	部品番号
Seahorse FluxPak-XF Flex 3D キャプチャ-S 用	アジレント・テクノロジー	103874-100
Seahorse XF Flex 3D キャプチャマイクロプレート用スクリーン挿入ツール		103873-100
Seahorse XF 3D ミトストレステストキット		103016-100
Seahorse XF ミトストレステストキット		103015-100
Seahorse XF DMEM pH 7.4		103575-100
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 200 mM グルタミン溶液		103579-100
Seahorse XF Flex アナライザー		S7851A または S7851AN
Cytation イメージングシステム		XXXXXX
Lionheart イメージングシステム		XXXXXX

システム性能の評価

臍島アッセイ

野生型のオス Sprague Dawley ラット由来の 20 個の臍島を用いた、XF ミトストレステストの代表的な結果を図 3 に示します。このアッセイは、ミトコンドリアの健康状態を評価するためのゴールドスタンダードであり、基礎呼吸、ATP 産生呼吸、最大および予備呼吸能、非ミトコンドリア呼吸を含む、ミトコンドリア機能を示す複数のパラメーターを提供します。

この試験では、アッセイプロトコルにグルコースの急性注入を追加しました。図 3A に示すように、臍島サンプルは、すべてのミトコンドリアモジュレーターおよび 16.7 mM の高グルコース濃度に対して、堅牢な OCR 反応を示しました。コントロールグループ（化合物非注入）からの安定した OCR シグナルは、アッセイ全体を通して臍島が健全であったことを示しています。

全体的な ECAR シグナルは低く、サンプルでの解糖活性が低いことを示しています（図 3B）。グルコース注入および FCCP 注入後に ECAR シグナルが増大したことは、解糖ではなくミトコンドリアの CO₂ 産生に起因する可能性が高いと考えられます。これは、ECAR と OCR の傾向が類似したパターンを示し、オリゴマイシンまたはロテノン/アンチマイシン A によるミトコンドリア機能の阻害が、ECAR の低下を引き起こしたためです。これらの観察結果は、臍島が非常に酸化的なサンプルタイプであり、有意な解糖活性を示していないという事実と一致しています。

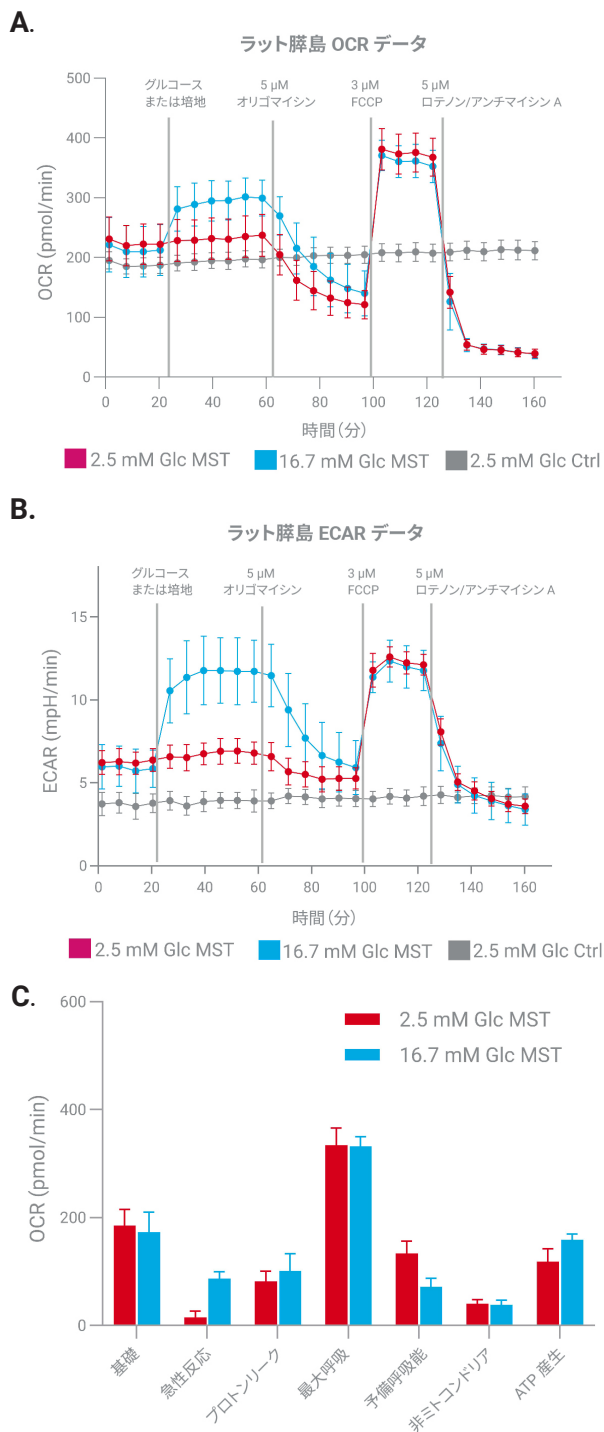


図 3. Agilent Seahorse XF Flex アナライザー上で Agilent Seahorse XF 3D キャプチャマイクロプレート-S を使用した場合の Agilent Seahorse XF ミストレステストの代表的な結果 (ウェルあたり 20 個の膵島)。A. OCR カイネティクスグラフ。B. ECAR カイネティクスグラフ。C. XF ミストレステストで報告されたパラメーター。

ある特定の膵臓由来の膵島でもサイズが異なっており、別個の代謝特性を示しています。グルコースに対する感度は膵島ごとに異なっており、ミトコンドリア呼吸は、グルコース刺激性インスリン分泌において重要な役割を果たします。XF 膵島ワークフローでは、均一なサイズと数の膵島を手作業で採取し、XF 3D キャプチャマイクロプレート-S のサンプルチャンバーの中央に直接配置することが重要です。下流の代謝アッセイで正確かつ信頼性の高い結果を得るためには、壊死コアを示す大きい膵島のロードを防止することが重要になりますが、これらは代謝測定を妨げる可能性があるためです。

アッセイ最適化時には、ウェルあたりにロードした膵島数 (5、10、20、40 個) を評価しました。ウェルあたり 5 ~ 40 個の膵島数において、基礎 OCR と膵島数との間に良好な相関関係が認められました (図 4A)。ここでは、堅牢な OCR シグナル (70 ~ 100 pmol/min) を生成するのに、わずか 10 ~ 20 個の膵島で十分でした。アッセイで使用する特定のタイプおよび調製に対して、膵島数を最適化する必要があります。アッセイ後の染色された膵島の代表的なウェル画像を図 4B に示します。

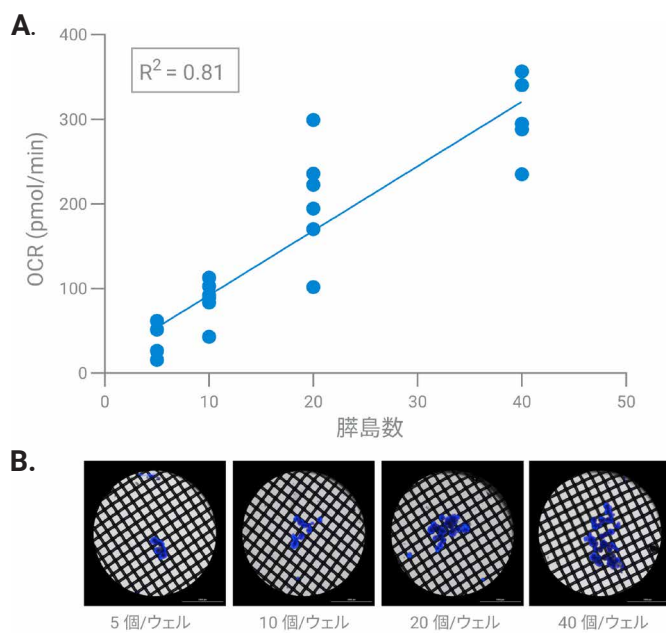


図 4. OCR とウェルあたりの膵島数との間の相関関係。B. Seahorse XF アッセイ後、Agilent Seahorse XF 3D キャプチャマイクロプレート-S のキャプチャスクリーン下で視覚化された、Hoechst 染色された膵島の代表的な画像。

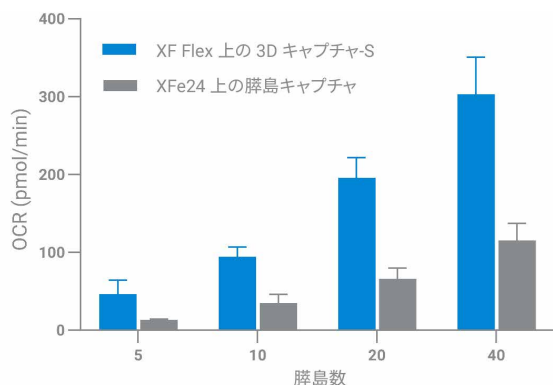
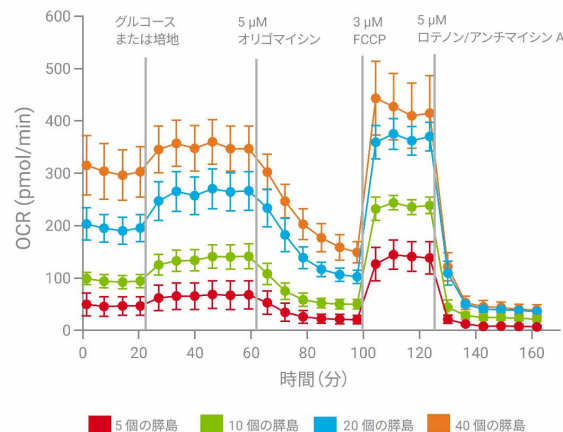


図 5. Agilent Seahorse XF Flex アナライザー上で Agilent Seahorse 3D キャプチャマイクロプレート-S、および Agilent Seahorse XF24 アナライザー上で Agilent Seahorse XF 臍島キャプチャマイクロプレートを使用した場合の、ウェルあたりのラット臍島数を変化させた基礎 OCR 測定値の比較。

また、XF Flex アナライザー上で XF 3D キャプチャマイクロプレート-S、および Agilent Seahorse XF24 アナライザー上で Agilent XF24 臍島キャプチャマイクロプレートを使用した場合のアッセイ性能も比較しました。図 5 に示すように、XF Flex アナライザー上で XF 3D キャプチャマイクロプレート-S を使用した場合、基礎 OCR ははるかに高くなりました。XF Flex システムでは、10 ~ 20 個の臍島により、約 100 ~ 200 pmol/min の基礎 OCR を生成したのに対して、XF24 システムでは、100 pmol/min の基礎 OCR を得るために 40 個の臍島が必要であり、XF Flex システムの感度が高いことが明確に実証されました。両システムで実施した完全な XF ミトストレステストのカイネティクスプロファイルを図 6 に示します。

臍島数とともに、化合物の投与量も評価し、最適な濃度を決定する必要があります。これは、アッセイ培地の組成（BSA または FBS を含むまたは含まない）、臍島の供給源、サイズ、ウェルあたりの数に依存しています。ここでは、16.7 mM グルコースおよび 5 μ M オリゴマイシン A の注入後に、異なる FCCP 投与量を 2 回の連続注入で適用して、最適な FCCP 濃度を決定した例を示します。この手順により、より少数のウェルと臍島でより広範囲の投与量を実現できます。図 7 では、最終 FCCP 濃度 1、2、3、4、5、8 μ M での FCCP 注入後の最大パーセント OCR を比較しています。データは、2 ~ 4 μ M で同等の最大 OCR を示しており、3 μ M の結果により一貫性があることを示しています（図 7B）。したがって、最適な FCCP 濃度は 3 μ M であると決定されます。臍島アッセイでは、濃度 5 μ M のオリゴマイシンと 5 μ M のロテノン/アンチマイシン A を使用しました。

A. ラット臍島 OCR データ - XF Flex 3D キャプチャマイクロプレート-S



B. ラット臍島 OCR データ - XF24 臍島キャプチャマイクロプレート

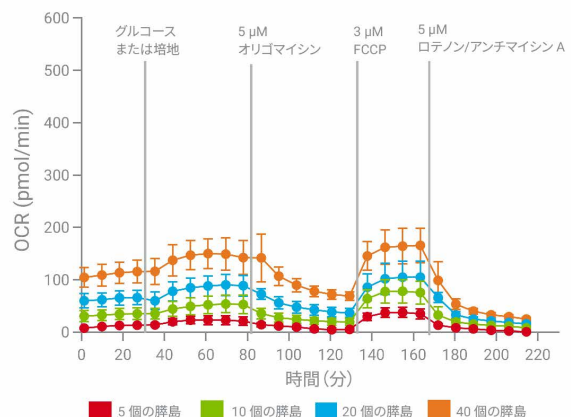


図 6. Agilent Seahorse XF Flex アナライザー上で Agilent Seahorse 3D キャプチャマイクロプレート-S (A)、および Agilent Seahorse XF24 アナライザー上で Agilent Seahorse XF 臍島キャプチャマイクロプレート (B) を使用した場合の、ウェルあたり 5、10、20、40 個のラット臍島での性能の比較。

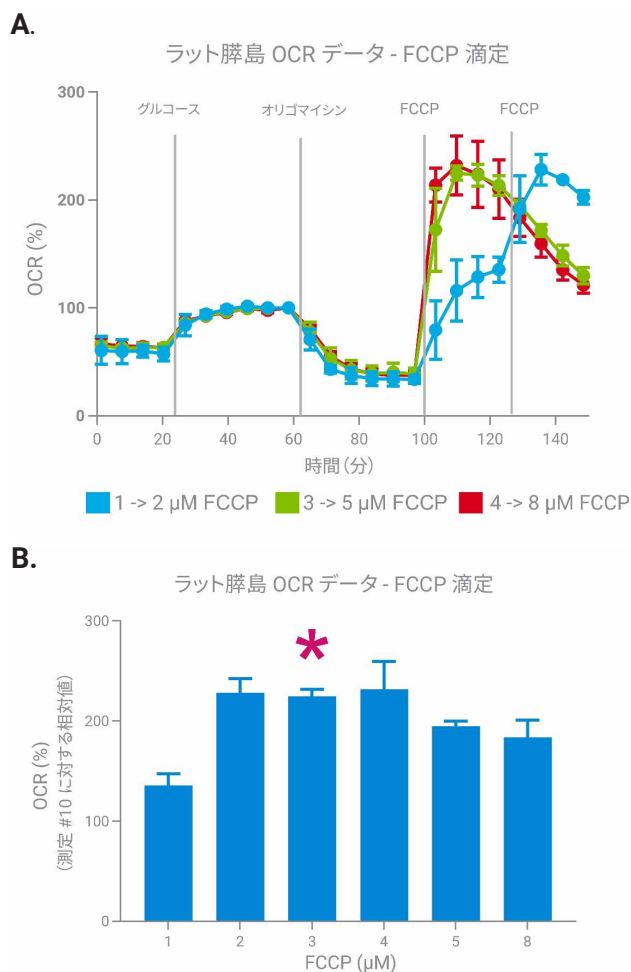


図 7. 連続注入手順を用いた、ラット臍島における FCCCP 投与量の滴定。A. 測定 #10 (オリゴマイシン A 注入前の最終測定) をベースラインとして評価したパーセント OCR のカインेटクスグラフ。B. 異なる濃度の FCCCP 注入後の最大パーセント OCR の棒グラフ (各 FCCCP 注入後の 2 回目の測定)。

スフェロイドアッセイ

7 日齢の HCT116-H2B-GFP スフェロイド (平均直径 150 μ m、ウェルあたり 20 個のスフェロイド) を用いた、XF ミストレストテストの代表的な結果を図 8 に示します。200 pmol/min の堅牢な基礎 OCR が観察されました。また、スフェロイドは、3 種類のモジュレーターすべてに対して明確な反応を示しました。臍島と同様に、オリゴマイシンがプラトー効果に到達するには、より多くの測定サイクルが必要になります。この例では、8 サイクルを許可しましたが、アッセイで使用するスフェロイドの数、サイズ、タイプに基づいて調整することができます。

HCT116-H2B-GFP スフェロイドは均一なサンプルであり、非常に一貫性の高いシグナル (測定 3 の基礎 OCR の CV 7 %) が得られています。ミトコンドリア機能を示すすべての主要なパラメーターも、SHA ソフトウェアを使用することにより得られました (図 8C)。

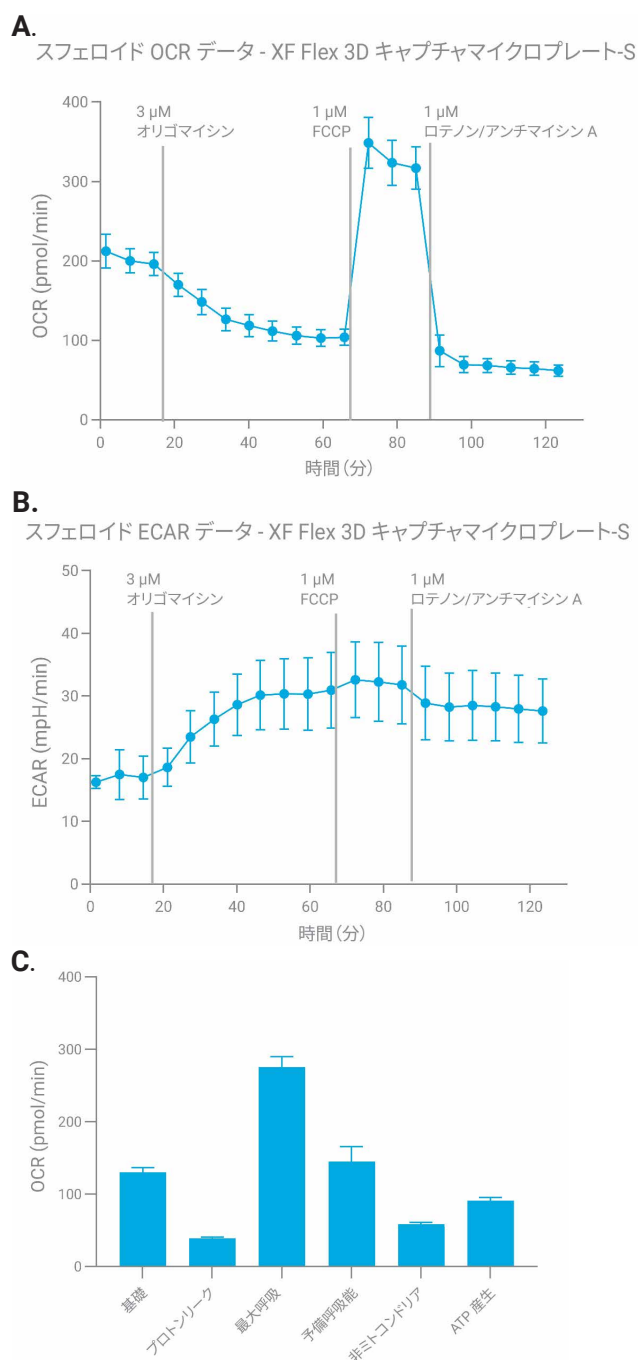


図 8. Agilent Seahorse XF Flex アナライザー上で Agilent Seahorse XF 3D キャプチャマイクロプレート-S を使用した場合の、HCT116-H2B-GFP スフェロイド (20 個) に対する Agilent Seahorse XF ミストレストテストの代表的な結果。A. OCR カインेटクスグラフ。B. ECAR カインेटクスグラフ。C. XF ミストレストテストで報告されたパラメーター。

全体的な ECAR は低いですが、ECAR のカイネティクスストレスは、OCR のカイネティクスストレスを反映してはいません。オリゴマイシンにより ATP 合成酵素を阻害すると、ECAR の補償的な増加が観察されます。この ECAR の増加は、ロテノン/アンチマイシン A の注入後も維持されており、これはこの ECAR 活性の増加がミトコンドリア呼吸に関連しておらず、どちらかといえば、ミトコンドリア呼吸による ATP 産生能力の喪失を補償する、解糖のアップレギュレーションである可能性が高いことを示しています。

アッセイ最適化時には、XF 3D キャプチャマイクロプレート-S を用いて、HCT116-H2B-GFP スフェロイド数（ウェルあたり 10、20、40、60 個）を評価しました。10 ～ 60 個のスフェロイドで直線関係が観察されており（図 9）、 R^2 は 0.95 でした。このような強い相関関係と低い変動は、スフェロイドの均一性によるものです。アッセイ後の染色されたスフェロイドの代表的なウェル画像を図 9B に示します。

XF 3D キャプチャマイクロプレート-S は、各ウェル底部の深さ 250 μm のサンプルチャンバーと、ポアサイズ 170 μm のキャプチャスクリーンを特徴としています。本研究では、直径約 150 μm のスフェロイドを使用しました。このマイクロプレートで使用するのに適したスフェロイドのサイズ範囲は、150 ～ 300 μm です。

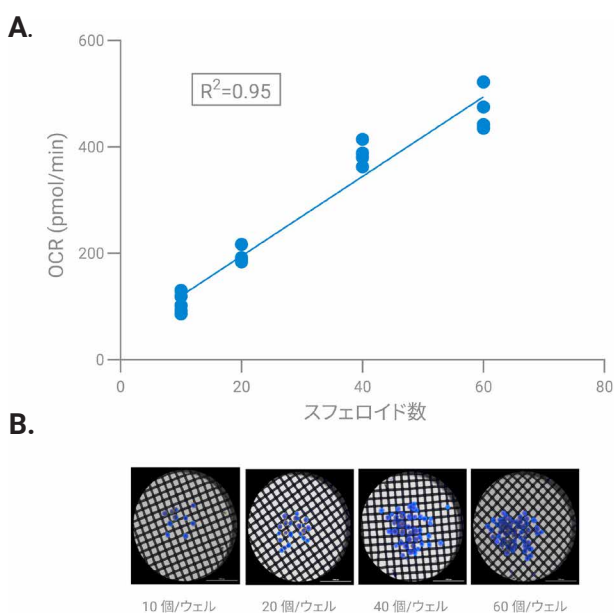


図 9. HCT116-H2B-GFP スフェロイド数を変化させた基礎 OCR 測定値。A. OCR とウェルあたりのスフェロイド数との間の相関関係。B. Agilent Seahorse XF アッセイ後、キャプチャスクリーン下で視覚化された、Hoechst 染色されたスフェロイドの画像。

また、XF Flex アナライザー上で XF 3D キャプチャマイクロプレート-S、および XFe24 アナライザー上で XF24 脾島キャプチャマイクロプレートを使用した場合のアッセイ性能も比較しました。図 10 に示すように、XF Flex アナライザー上で XF 3D キャプチャマイクロプレート-S を使用した場合、スフェロイドの基礎 OCR は約 2 倍高くなり、XF Flex システムの感度が高いことがここでも実証されました。

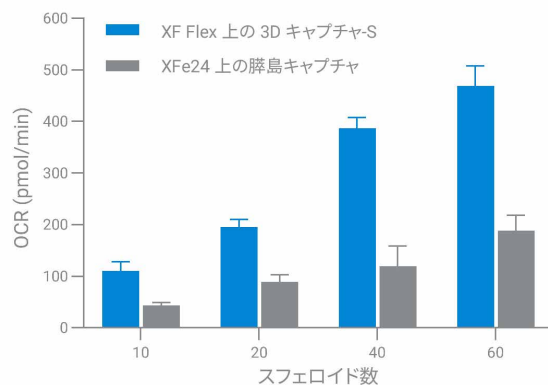


図 10. Agilent Seahorse XF Flex アナライザー上で Agilent Seahorse 3D キャプチャマイクロプレート-S、および Agilent Seahorse XFe24 アナライザー上で Agilent Seahorse XF24 脾島キャプチャマイクロプレートを使用した場合の、HCT116-H2B-GFP スフェロイド数を変化させた基礎 OCR の比較。

化合物の最適な投与量は、アッセイ培地の組成（BSA または FBS を含むまたは含まない）、スフェロイドの細胞タイプ、調製、サイズ、およびウェルあたりのスフェロイド数によって異なります。HCT116-H2B-GFP スフェロイドに対する最適な FCCP 濃度を決定するために、0.25 ～ 2 μM の範囲の FCCP 投与量を評価しました。図 11 は、ウェルあたり 20 個のスフェロイドを使用した場合、0.5 ～ 1.5 μM の FCCP 濃度において、同等で最高の最大 OCR が得られることを示しています。1 μM を使用した際のデータはより一貫性が高く、最適な濃度を表しています。

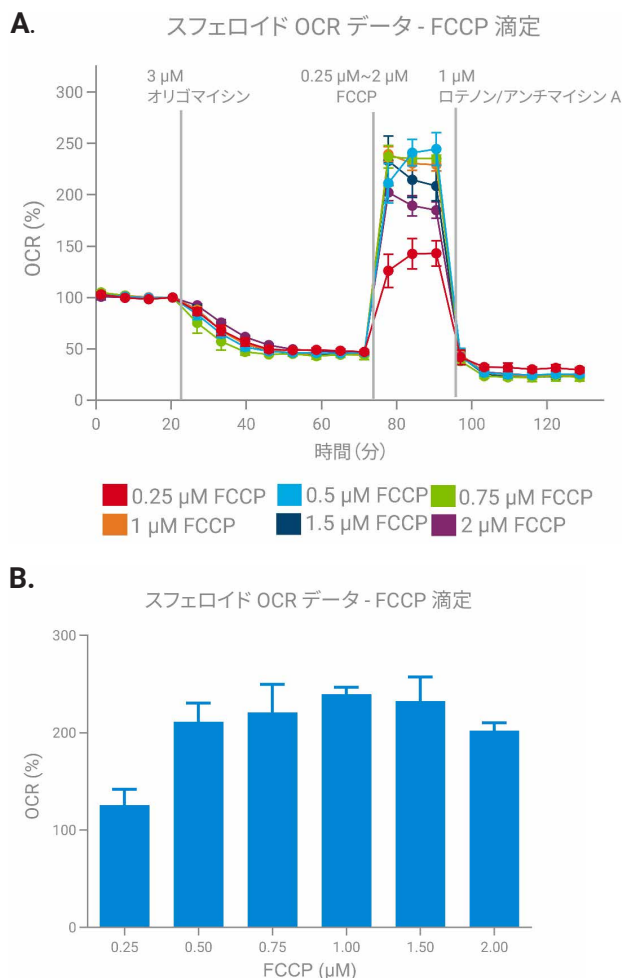


図 11. HCT116-H2B-GFP スフェロイドを用いた FCCP 投与量の滴定。A. 測定 #4 をベースラインとして評価したパーセント OCR のカイネティクスグラフ。B. FCCP 注入後の最大パーセント OCR の棒グラフ (各 FCCP 注入後の最初の測定)。1 回の代表的な実験のデータ。

データ解析と正規化の考慮事項

Seahorse XF 代謝アッセイデータの解析は、クラウドベースのソフトウェアアプリケーションである Agilent Seahorse Analytics において、3D Mito Stress Test kit を使用することにより実施できます。このコンパニオンビューは、XF ミトストレステストキットまたは XF 3D ミトストレステストキットの製品ラベル上の SW コードを入力することにより、利用できるようになります。3D Mito Stress Test kit のコンパニオンビューは、3D モデルを用いたアッセイ向けに特別に設計されたウィジェットを提供します。標準的なミトストレステストでは、最初の注入としてオリゴマイシンを使用しないデータ解析オプションを提供しており、急性注入の場合には、最初または 2 回目の注入としてオリゴマイシンを使用するデータ解析オプションを提供しています。

アッセイ結果を解釈するうえで、Seahorse XF アッセイデータの正規化が重要になります。これにより、サンプルのサイズや数の違いによるウェル間変動を最小限に抑えることができます。正規化に最適な方法は、アッセイで使用される特定の 3D サンプル、研究目的、培地組成などのアッセイ条件に依存しています。3D サンプルで生成されたデータを正規化するために考慮できる手法はいくつかあり、例えば、染色された対象物からサンプルの数/サイズ、面積、蛍光強度を取得するイメージングベースの手法などがあります。さらに、基礎測定値、総タンパク質量、または DNA 含有量に対するシグナル変化の割合を考慮することもできます。

画像ベースの手法

明視野画像は、アッセイ前後のいずれかで取得することにより、サンプルチャンバー内でのサンプル位置を確認することができます。臍島またはスフェロイドの蛍光イメージングを可能にするために、ロテノン/アンチマイシン A 溶液の最終注入に Hoechst 色素を含めることができます。この手法により、明視野画像に存在する可能性のあるスクリーンの干渉を受けずに、蛍光イメージングを実施できます。Gen5 ソフトウェアを使用すると、各ウェルについて対象物の総面積 (ObjectSumArea) や対象物の総強度 (ObjectSumInt) などの定量指標を計算できます (図 12)。

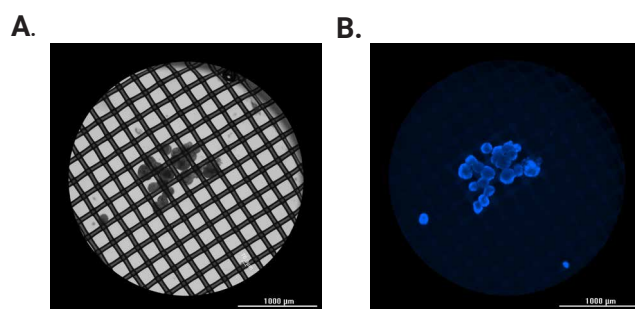


図 12. アッセイ前後の Agilent Seahorse XF 3D キャプチャマイクロプレート-S ウェルの臍島。A. アッセイ前の明視野画像。B. アッセイ後の Hoechst 33342 染色による蛍光画像。

図 13 に示すように、臍島を Hoechst 33342 核色素で染色した場合、酸素消費速度 (OCR) と対象物の総面積または対象物の総強度 (蛍光) との間に、強い直線相関関係が観察されました。このデータセットは、図 4A に示されたデータに対応するものであり、OCR を臍島数に対してプロットしたものです。ここでは、決定係数 (R^2) が、0.81 から 0.88 ~ 0.91 の範囲へとわずかに改善されました。

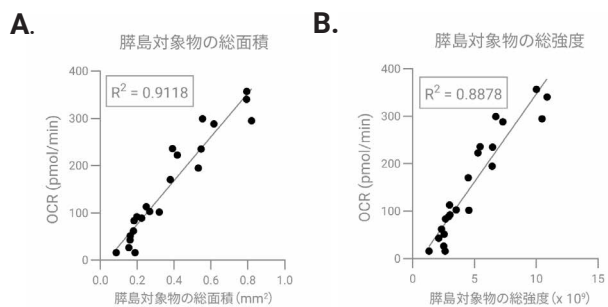


図 13. OCR と Seahorse Object Sum Area (対象物の総面積) (A) との間、または OCR と Seahorse Object Sum Intensity (対象物の総強度) (B) との間の直線相関関係。

同じデータセットを用いて正規化した OCR 値を図 14 に示します。正規化前は、5 ~ 40 個の Seahorse を含むウェルにおける基礎 OCR 値は、46 ~ 350 pmol/min の範囲でした。正規化後は、10、20、40 個の Seahorse を含むウェルにおける正規化した基礎 OCR 値は 15 % 未満で変動しており、各グループ内の変動係数 (%CV) は 20 % を下回っていました。一方、5 個の Seahorse のみを含むウェルは高い変動を示しており、このサンプルサイズでは、堅牢なアッセイデータを生成するには不十分であることを示しています。

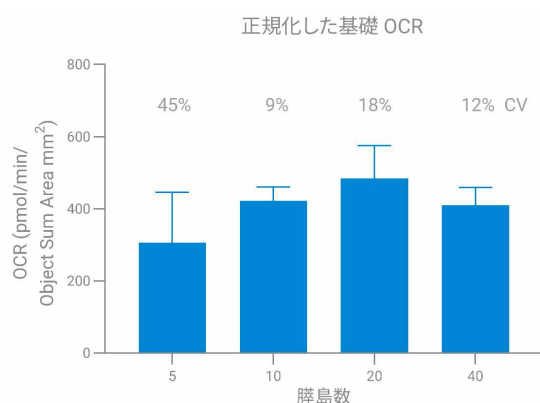


図 14. Object Sum Area (対象物の総面積) に対して正規化した基礎 OCR (図 4A の正規化されていない生データを使用)。

図 15 では、正規化前の Seahorse ミトストレステストのカイネティクスストレスは、比較的大きいウェル間変動 (20 ~ 36 % CV) を示しました。総面積 (図 15B) または総強度 (図 15C) に対して正規化した場合、データ変動は改善されます。データを対象物の総面積に対して正規化すると、ウェル間変動は 12 ~ 14 % CV に低減しており、対象物の総強度に対して正規化すると、CV 範囲は 5 ~ 19 % となりました。

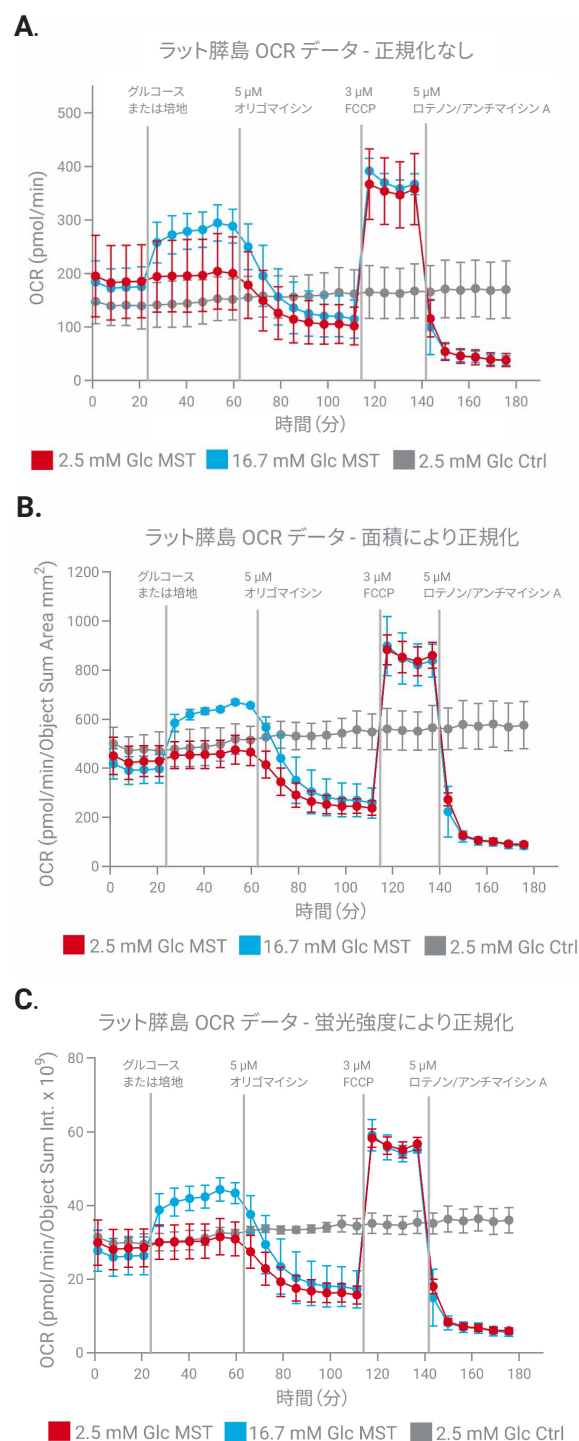


図 15. Agilent Seahorse XF Flex アナライザー上で Agilent Seahorse XF 3D キャプチャマイクロプレート-S を使用した場合の、急性グルコース注入を用いた Agilent Seahorse XF ミトストレステスト (ウェルあたり 20 個の Seahorse)。A. 正規化前の OCR カイネティクスグラフ。B. Object Sum Area (対象物の総面積) に対して正規化した OCR カイネティクスグラフ。C. Object Sum Intensity (対象物の総強度) に対して正規化した OCR カイネティクスグラフ。

基礎シグナルに対する正規化

ベースラインを基準とした評価は、Seahorse XF アッセイデータを正規化するために使用できる別の方法です。これは、シグナルを基礎測定値（通常は、最初の注入直前の基礎測定値）に対するパーセンテージに変換することにより行われます。この方法は、急性処理またはモジュレーター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。不均一なサンプルに特に有用です。図 16 では、図 15A の膵島 OCR データの、グルコース（または培地）注入前の最終測定である測定 4 をベースラインとして設定し、グルコース反応を基礎シグナルに対する割合として評価しています。グルコース、オリゴマイシン、およびロテノン/アンチマイシン A に対する反応において、データの一貫性が向上していることが観察されます。

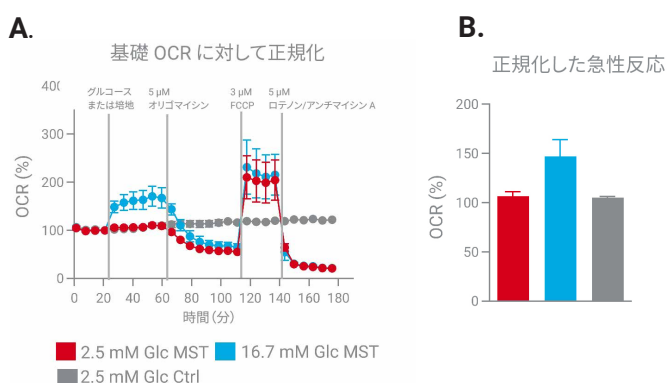


図 16. ラット膵島を使用して急性グルコース注入を用いた Agilent Seahorse XF ミトストレステスト（20 個の膵島/ウェル）。A. 基礎 OCR（測定 4）に対して正規化した OCR カイネティクス。B. 基礎 OCR に対して正規化したグルコース注入に対する急性反応の棒グラフ。

その他の正規化オプション

本研究では評価しませんが、使用できる別の方法が存在します。これらの方法として、例えば、タンパク質や DNA 含有量の溶解および定量による正規化を目的とした、アッセイ後の膵島またはスフェロイドの処理があります。ただし、これらの方法は変動をもたらす場合があり、追加の処理時間が必要になる可能性があります。

膵島は、主にインスリンを産生および分泌しており、多くの処理がインスリン RNA/タンパク質に影響を与える可能性があります。したがって、インスリンの変化により影響を受ける可能性があるため、膵島アッセイにおいて、正規化の指標として総 RNA やタンパク質を使用することは推奨されません。

結論

Agilent Seahorse XF Flex アナライザーと、目的に合うように設計された Agilent Seahorse 3D キャプチャマイクロプレート-S を組み合わせることにより、感度と効率が大幅に向上し、ウェルあたりわずか 10 個の膵島で堅牢な代謝プロファイリングが可能になります。従来の Agilent Seahorse XFe24 アナライザーおよび Agilent Seahorse XF24 膵島キャプチャマイクロプレートは、ウェルあたり 40 ~ 70 個の膵島を必要としましたが、新しい XF Flex システムは、希少または貴重な膵島の調製に最適であり、1 回の実験あたりの条件数および replicate 数を増やすことができるようになります。感度が向上したことにより、小さい膵島グループでも微妙な代謝の違いを検出できるようになります。さらに、HCT116-H2B-GFP がんスフェロイドを用いたデータの例は、このシステムが他のタイプの小さい 3D 材料にも適用できることを示しています。

膵島生理学の研究、化合物のスクリーニング、ドナー膵島の生存率評価のいずれの場合でも、XF Flex システムは、データ品質を損なうことなく、より少ない労力でより多くの成果を上げることができます。

参考文献

- Corbin, K.L.; West, H.L.; Brodsky, S.; Whitticar, N.B.; Koch, W.J.; Nunemaker, C.S. A Practical Guide to Rodent Islet Isolation and Assessment Revisited. *Biol Proced Online*. **2021**, 23(1), 7. DOI: 10.1186/s12575-021-00143-x
- Li, D.; Kong, W.; Hong, Y.; Zhang, W.; Sun, B.; Wang, X.; Wang, K. Protocol for isolation and transplantation of rat pancreatic islets in the kidney capsule to treat diabetes. *STAR Protoc*. **2025**, 6(1), 103486. DOI: 10.1016/j.xpro.2024.103486
- Liu, B.; Hua, D.; Shen, L.; Li, T.; Tao, Z.; Fu, C.; Tang, Z.; Yang, J.; Zhang, L.; Nie, A.; Jiang, Y.; Wang, J.; Li, Y.; Gu, Y.; Ning, G. NPC1 is required for postnatal islet β cell differentiation by maintaining mitochondria turnover. *Theranosti cs*. **2024**, 14(5), 2058-2074. DOI: 10.7150/thno.90946

このアプリケーションで使用されている製品

アジレント製品

[Agilent Seahorse XF Flex アナライザー](#) 

[Agilent Seahorse FluxPak-XF Flex 3D キャプチャ-S 用](#) 

[Agilent Seahorse XF Flex 3D キャプチャマイクロプレート用スクリーン挿入ツール](#) 

[Agilent Seahorse XF 3D ミトストレステストキット](#) 

[Agilent Seahorse XF ミトストレステストキット](#) 

[Agilent Seahorse XF DMEM アッセイ培地パック](#) 

[Agilent BioTek Cytation イメージング・マルチモードプレートリーダー](#) 

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタマコンタクトセンタ

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おりません。
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。

RA251017.531

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2025

Printed in Japan, October 31, 2025

5994-8739JAJP

販売店