

細胞培養液中の酸素消費測定手法に関する基礎的検討

Basic study on oxygen consumption measurement method in cell culture medium

倉若 美咲樹¹⁾

KURAWAKA Misaki

山崎 優子²⁾

YAMAZAKI Yuko

志村 二三夫³⁾

SHIMURA Fumio

要 旨

酸素は好気性生物が生存する上で不可欠な物質であり、生体内において酸化リン酸化によるエネルギー産生に寄与している。ミトコンドリア機能指標の一つとして酸素消費量があり、酸素の存在により消光するりん光プローブの開発により一度に多数の検体の測定が可能となった。りん光を測定するためには時間分解蛍光を測定できるプレートリーダーの使用が望ましいが、測定可能な機種が限られている。そこで本研究では、汎用性が高い通常の蛍光プレートリーダーで酸素消費によるりん光の検出が可能か、その基礎的手法を検討した。その結果、測定直前の培養液の温度が測定機器の庫内温度よりも低い場合、培養細胞などの酸素を消費するサンプルが存在しない場合でも蛍光強度が増強した。これは液温が高いほど酸素の溶存度が低くなる性質によるものと考えられた。測定機器の庫内温度と同じ温度で20分ブレインキュベートした群では蛍光強度の変化が認められなかった。この手法を用いてポジティブコントロールであるグルコースオキシダーゼの濃度依存的かつ経時的な蛍光強度の増強も確認されたため、ブレインキュベーション操作により安定した測定を可能にしたことが示唆された。続いて、実際に培養肝細胞を用いて検討を行った。測定プレートには、透明底よりもsignal/background比が高い黒色底のものを選択すれば蛍光プレートリーダーでも培養細胞による酸素消費の検出が可能であった。さらに電子伝達系阻害剤やグルコースによる酸素消費の減少が本法により検出された。以上により、りん光プローブを用いた細胞外酸素消費を検出する際、黒色底の測定プレートを用い、蛍光強度測定前に測定機器の庫内と同じ温度で20分ブレインキュベーションによる温度管理を徹底することで、時間分解蛍光測定機能を有さない蛍光プレートリーダーでも培養細胞による酸素消費の検出が可能であることが明らかとなった。

¹⁾ 十文字学園女子大学 人間生活学部 食品開発学科

Department of Food Science, Faculty of Human Life, Jumonji University

²⁾ 十文字学園女子大学 人間生活学部 食物栄養学科

Department of Food and Nutrition, Faculty of Human Life, Jumonji University

³⁾ 十文字学園女子大学大学院 人間生活学研究科 食物栄養学専攻

Department of Food and Nutritional Sciences, Graduate School of Human Life Sciences, Jumonji University

キーワード：酸素消費量、培養肝細胞、りん光プローブ、ミトコンドリア

1. 序

酸素（分子状酸素： O_2 ）は、我々ヒトを含む好気性生物が生存する上で不可欠な物質である。大気中には約21%含まれており、その大半は植物による光合成により産生される¹⁾。生体内に取り込まれた酸素は、主としてミトコンドリアの電子伝達系における最終電子受容体としてはたらき、酸化リン酸化によるアデノシン三リン酸（ATP）の産生に大きく関与している²⁾。

ミトコンドリアはエネルギー産生栄養素の代謝や細胞のアポトーシス調節などを行っており、そのはたらきは多岐に渡る³⁾。そのため、ミトコンドリア機能障害は糖尿病、肥満、悪性新生物、循環器疾患など様々な疾病に関連している⁴⁾。さらに、疾病の治療に用いられるいくつかの薬剤はミトコンドリア機能を障害することが判明している⁵⁾。ミトコンドリア機能測定手法の開発は、代謝や疾病の研究、創薬における素材の探索など多くの研究開発に寄与すると考えられる。

ミトコンドリアの機能を測定する指標として、ATP量、膜電位、ミトコンドリア由来DNA、電子伝達系関連酵素の発現・活性等多岐にわたるが、中でも酸素消費量はミトコンドリア機能の実際を測る指標として重要視されている。生体試料などの酸素分圧や酸素消費量を測定する方法として、クラーク型酸素電極を用いたポーラログラフイー⁶⁾などいくつか開発されている。クラーク型酸素電極を用いたポーラログラフイーは現在も広く活用されているが、特殊な機材が必要であり、測定時の侵襲性や無菌環境の維持が困難である点など、測定には様々な制限が存在する。また、一度に多数のサンプルを測定することが難しいため、機能性素材や創薬素材等のスクリーニング試験には活用しづらい。

近年、蛍光プレートリーダーで培養細胞等による酸素の消費を検出可能なりん光プローブが開発された⁷⁾。分子の発光には「蛍光」と「りん光」の2種類存在するが、りん光は蛍光と比較すると

発光寿命が著しく長く、自家蛍光などの非特異的蛍光が消光した後もりん光は発光し続けるため、バックグラウンドが低く抑えられて感度良く測定できるという特徴を持つ⁸⁾。酸素の検出に利用されるりん光プローブにはいくつか種類があるが、ルテニウム（II）錯体や中心金属に白金（Pt（II））を有する金属ポルフィン類がしばしば利用されている^{9, 10)}。これらのプローブは、酸素分子と物理的に衝突することによりエネルギーが酸素分子に受け渡され消光される性質を持つ。そのため、プローブ周囲の酸素の低下に伴い、りん光を発するようになる¹⁰⁾。96または384-wellプレートに細胞やミトコンドリア抽出物などのサンプルとりん光プローブ入り培養液を加え、ウェル上部にミネラルオイルを滴下して気相からの酸素の侵入を防ぐことにより、培養細胞等のサンプルによる酸素消費を蛍光強度の増強として検出することが可能となる（Fig. 1）。MitoXpress Xtra（Agilent Technologies Inc., CA, USA）は、りん光プローブの一種であるPt（II）コプロポルフィンをベースとした酸素消費検出試薬である⁹⁻¹¹⁾。細胞膜を通過しないため、培養液に添加することにより培養液中の酸素レベルをモニタリングすることができる。同類の試薬として、Extracellular Oxygen Consumption Assay（abcam plc., Cambridge, UK）、Oxygen Consumption Rate Assay Kit（Cayman Chemical Company, MI, USA）等、各社から販売されている。これらのりん光プローブを用いる場合、時間分解蛍光プレートリーダーによる測定が推奨されているが、使用できる機種が限られてしまう。通常の蛍光プレートリーダーで測定した報告¹²⁾も存在するが、時間分解蛍光よりも検出感度が下がるため、実験条件を整えなければ酸素消費の検出が困難となる。

本研究では、りん光プローブ試薬として市販されているExtracellular Oxygen Consumption Assayと時間分解機能を有さない通常の蛍光プレートリーダーで培養細胞による酸素消費の検出が可能か検討を行った。その結果、時間分解機能を有さ

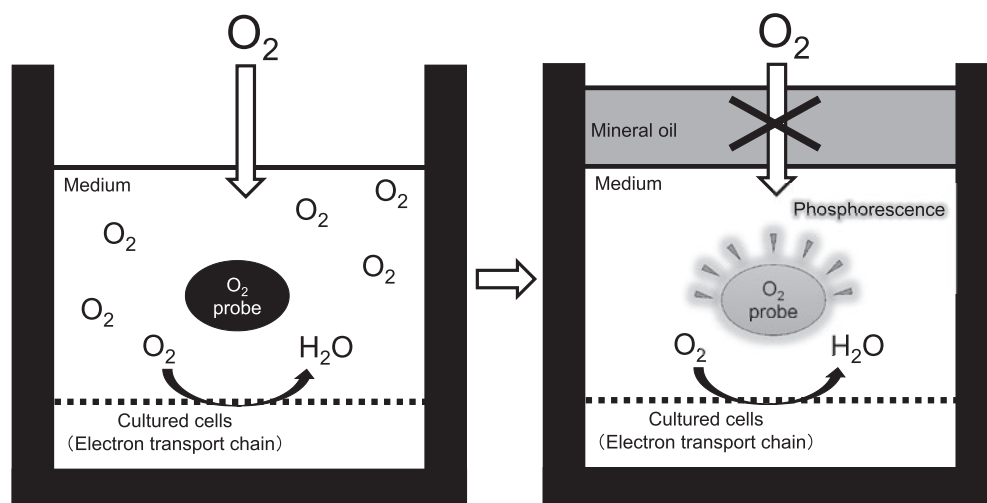


Fig. 1 酸素検出りん光プローブとマイクロプレート、ミネラルオイルを用いた酸素消費の検出手法の図解
酸素分子が培養液に溶存している状態では、プローブと酸素分子が衝突して消光状態となる。上部をミネラルオイルでシーリングすることにより気相からの酸素透過の大部分を防ぐことができる。培養細胞や単離したミトコンドリアサンプル等が酸素を消費し、しだいに培養液中の酸素濃度が低下する。その結果、プローブに衝突する培養液中の酸素分子が減少し、プローブはりん光を発する。このりん光の増強を「サンプルの酸素の消費」として検出する。

ない通常の蛍光プレートリーダーでも実験条件を整えることにより検出が可能であること、さらに本法において測定前の操作における試薬類と測定機器内、細胞培養プレートの温度管理が、酸素消費量の測定結果に多大な影響を与えることを見出した。検討結果の実際を報告する。

2. 実験材料ならびに方法

2.1. 試薬等

ヒト肝細胞ガン由来細胞株HepG2は理化学研究所バイオリソース研究センター（茨城，日本）から購入した。酸素消費検出試薬である Extracellular Oxygen Consumption Assay は abcam plc. (Cambridge, UK) から購入した。Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), ウシ胎児血清 (FBS), リン酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH 7.4), Penicillin-Streptomycin, 透明底96-well 黒色マイ

クロプレート (カタログNo. 165305), 黒色底96-well 黒色マイクロプレート (カタログNo. 137101) は Thermo Fisher Scientific, Inc. (MA, USA) から購入した。アンチマイシン A はフナコシ株式会社 (東京, 日本) から購入した。その他の一般試薬類は富士フィルム和光純薬工業株式会社 (大阪, 日本) から購入した。

2.2. 細胞培養

培養細胞による酸素消費量の検討にはヒト肝細胞ガン由来細胞株HepG2を用いた。HepG2細胞は10% FBS と Penicillin Streptomycin を含む DMEM 中でCO₂インキュベーターにて培養した (37°C, 5% CO₂)。1日もしくは2日おきに DMEM を交換し, 対数増殖期に継代を行った。

2.3. stock 試薬等の調製

Extracellular Oxygen Consumption Assay の酸

素検出りん光プローブは、説明書の通り1バイアル(70 µg)に対しPBSを1 mL添加し、これをstock液とした。グルコースオキシダーゼ(GOX)は1 mg/mLとなるようPBSで調製した。アンチマイシンAは50 mMとなるようジメチルスルホキシド(DMSO)で調製した。いずれのstock液も用事までアルミホイルで遮光しながら-20°Cで冷凍保存した。

2. 4. 酸素消費に伴う蛍光強度の測定

実験時の培養液にはKrebs-Henseleit-HEPES buffer (pH 7.4, 1.2 mM MgSO₄, 1.2 mM KH₂PO₄, 4.7 mM KCl, 118.2 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂ · 2H₂O, 25 mM NaHCO₃, 10 mM HEPES, 0.1%牛血清アルブミン:KHH buffer)を用いた¹³⁾。また、実験のサンプルとしてアンチマイシンAやグルコースを培養液に添加する場合は、終濃度をそれぞれ1 µM, 11 mMとした。

実験前日に透明底または黒色底96-well黒色マイクロプレートにHepG2細胞を 1.25×10^5 cells/cm²になるように播種した。実験当日にDMEMをアスピレートし、PBSで2回洗浄した。その後、酸素検出りん光プローブstock液を各種KHH bufferで15倍希釈(終濃度:4.67 µg/mL)した培養液を各wellに150 µLずつ添加し、アルミホイルでプレートを遮光してからミネラルオイルとGOX stock液とともに37°Cで20分プレインキュベーションした。プレインキュベーション後、37°Cに設定したヒートブロック上でGOX stock液を1 wellあたり0.49 µL(終濃度:3.3 µg/mL)に加え、マイクロプレートミキサーで素早く混和した。試薬に付属しているミネラルオイルを2滴滴下し、37°Cに設定したVarioskanTM LUXマルチモードマイクロプレートリーダー(Thermo Fisher Scientific, Inc., MA, USA)を用いて励起波長Ex 380 nm, 蛍光波長Em 650 nmにおける蛍光プレートリーダーの表示値を相対蛍光強度(Relative fluorescence unit: RFU)として1分おきに測定した。また、各サンプル・各時間の

RFUから各サンプルの最小RFUを減算したのち、曲線下面積(Area under the curve: AUC)を算出した。

2. 5. 統計解析

統計ソフトはIBM SPSS Statistics ver. 26 for Japan(日本アイ・ビー・エム株式会社, 東京, 日本)を用いた。平均値の差を検定するために、等分散性の検定を行った後、対応のないt検定による比較を行った($P < 0.05$)。

3. 結果と考察

3. 1. りん光プローブに関する基礎的検討

本研究で用いるりん光プローブは、時間分解蛍光測定機能を有さない通常の蛍光プレートリーダーでも検出が可能か、まず初めに培養細胞等を用いなくて下記項目の検討を行った。

3. 1. 1. 測定開始時の液温の違いによる蛍光強度の変化

試薬プロトコルには、実験で使用する培養液や試薬は37°Cにプレインキュベーションし、操作中はプレートを加温しながら操作するよう記載されている。一方で、実験開始時の培養液の液温の違いによる蛍光強度の変化を調べた文献は調べた中では見受けられなかった。そこで、実験で使用する培養液とプレートを4°C, 25°C(室温), 37°C(蛍光強度測定機器庫内温度)で20分プレインキュベートし、培養細胞などの酸素を消費するサンプルが存在しない状態で蛍光強度の経時変化を測定した。

その結果、4°C群や25°C群では、酸素を消費するサンプルが存在しないにもかかわらず、蛍光強度の上昇が見られた(Fig. 2A, 2B)。一方、37°C群では蛍光強度が一定であった(Fig. 2C)。測定開始時の培養液の液温が蛍光強度に影響を与えている可能性が示唆された。

分子状酸素は非極性分子であるが、水溶液や有

機溶媒にもわずかに溶解する。溶媒が液体で溶質が酸素などの気体である場合、一定の温度において気体の溶存度はその圧力に比例する（ヘンリーの法則）¹⁴⁾。大気圧下における水への酸素の溶存度は4℃で13.11 mg/L、40℃で6.48 mg/Lとその差はおよそ2倍である¹⁵⁾。また、ミネラルオイルによるシーリングはFig. 1で示したように気相からの酸素透過の大部分を防ぐことが過去の文献より実験的に証明されている¹⁶⁾。しかしながら、マイクロプレートの素材として広く用いられているポリスチレンは酸素分子を透過するため、上部をミネラルオイルでシーリングしていてもプレートの壁面や底面から一定の酸素分子が入り出てくることも報告されている^{16, 17)}。

以上を踏まえると、事前操作などで培養液の液温やプレート温度が蛍光プレートリーダー庫内の温度を下回った場合、蛍光強度測定中に加温されることにより溶存できなくなった培養液中の酸素分子が培養プレートを通り、培養液中の酸素分

子が減少した分のりん光を発している事が考えられた。

事前操作の温度管理の有無により、液温上昇分の蛍光強度の増強を「培養細胞等による酸素の消費」として誤ってとらえてしまう可能性が高い。また、培養液を事前に37℃に加温していたとしても、室温や季節、実験者の手技やサンプル数によっては操作の過程で冷却されることも想定される。ミネラルオイルを滴下する前に、蛍光測定時と同様の37℃で20分間プレインキュベートの操作を加えることにより、培養液やプレートの温度を一定にし、液温変化による酸素溶存度の変化を最小限にすることが重要であることが示唆された。また、実験の信頼性の確保のためにも、培養細胞を用いないウェルを必ず作成し、蛍光強度が一定であることを確かめておく必要があると考えられる。以降の操作においては、ミネラルオイルを滴下する前に37℃で20分プレインキュベーションの操作を加えて実験を行った。

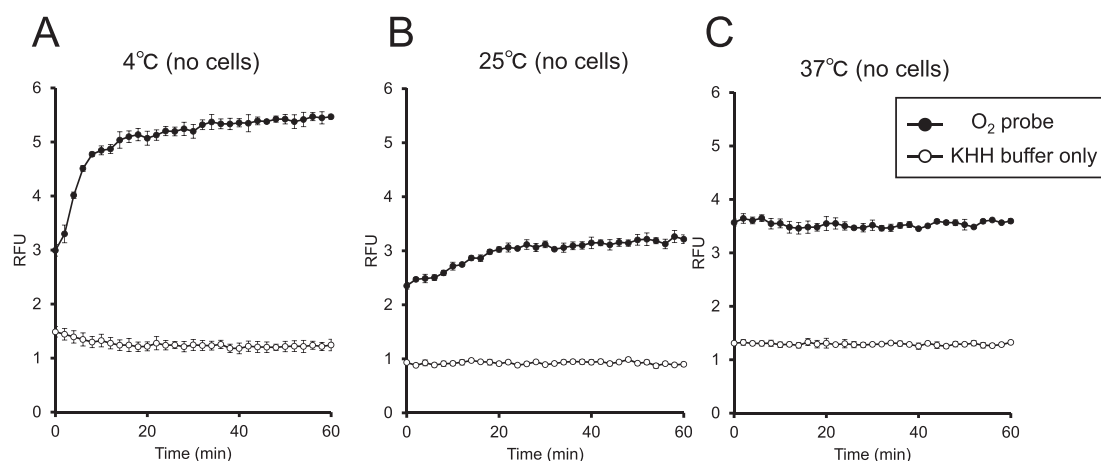
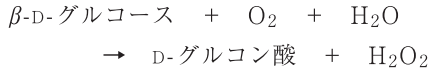


Fig. 2 蛍光強度測定開始時の培養液の液温による蛍光強度の変化

培養細胞のない96-well黒色プレートに、酸素検出りん光プローブを加えたKrebs-Henseleit-HEPES buffer (KHH buffer) を添加し、測定前に4℃、25℃、37℃で20分間プレインキュベートした。ミネラルオイルを2滴滴下し、庫内温度を37℃に設定した蛍光プレートリーダーで相対蛍光強度 (RFU) を測定した。グラフは2分おきのRFU経時変化として示した。A: 4℃, B: 25℃, C: 37℃。平均値±標準誤差 (n = 3)。

3. 1. 2. GOX濃度による蛍光強度の差異の検出

GOXは β -D-グルコースを酸化してD-グルコン酸と過酸化水素を生成する酵素である.



一連の反応に酸素を消費するため、りん光プローブで酸素消費を検出する際にポジティブコントロールとして用いられる¹⁶⁾. 時間分解蛍光測定機能を有さない通常の蛍光プレートリーダーでGOX濃度依存性や経時的な蛍光強度の変化を検出できるか検討を行った. 試薬プロトコルには、培養液150 μL に対し1 mg/mL GOX stock液を10 μL , すなわち終濃度66.7 $\mu\text{g/mL}$ を推奨してい

る. 本研究では試薬プロトコルよりも低い濃度(0.7, 3.3, 6.7 $\mu\text{g/mL}$)も加えて通常の蛍光プレートリーダーでもGOX濃度による蛍光強度の差異を検出できるか検討した. その結果, GOX濃度依存的かつ経時的な蛍光強度の増加が確認された(Fig. 3). 以降の操作においてGOXを用いる際は、蛍光強度の経時変化を確認するため、終濃度が3.3 $\mu\text{g/mL}$ GOXとなるよう試薬プロトコルから変更して実験を行った.

3. 2. 培養細胞による酸素消費の検出

上述の検討により、蛍光強度測定前のプレインキュベート操作を追加することにより、蛍光強度が安定することが明らかとなり、ポジティブコン

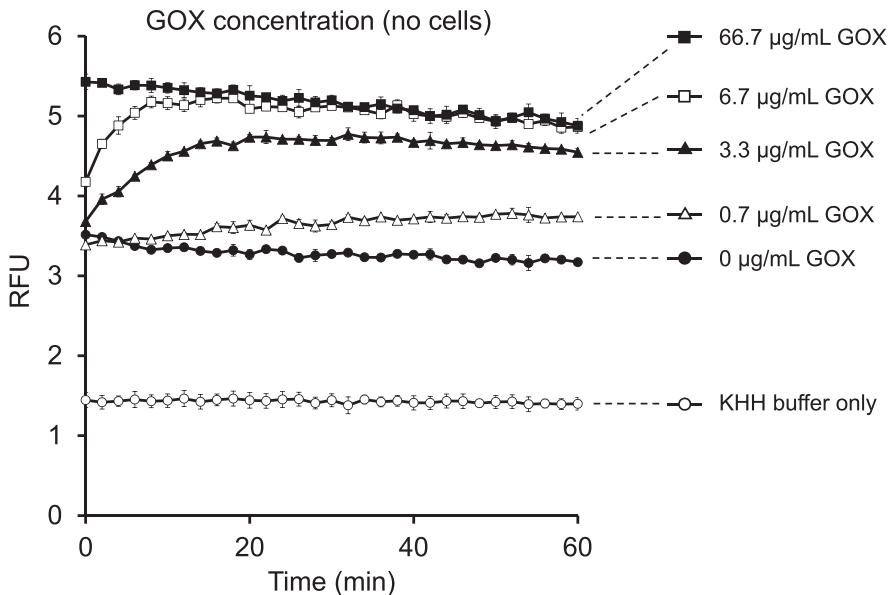


Fig. 3 グルコースオキシダーゼ (GOX) 濃度による蛍光強度の経時変化

培養細胞のない96-well黒色プレートに、酸素検出りん光プローブを加えたKrebs-Henseleit-HEPES buffer (KHH buffer)を添加し、37°Cで20分間プレインキュベートした. GOX濃度が0, 0.7, 3.3, 6.7, 66.7 $\mu\text{g/mL}$ になるようにGOX stock液を加えた後にミネラルオイルを2滴下し、庫内温度を37°Cに設定した蛍光プレートリーダーで相対蛍光強度 (RFU) を測定した. グラフは2分おきのRFU経時変化として示した. 平均値 \pm 標準誤差 ($n = 4$).

コントロールであるGOX濃度依存的かつ経時的な蛍光強度の増強も確認された。続いて、本法を用いて実際の培養細胞による酸素消費を検出可能か、検討を行った。

3. 2. 1. 測定プレートの種類による蛍光強度の差異

蛍光強度を測定する際は、壁面が黒色のマイクロプレートを用いることが一般的である。黒色プレートにはFig. 4Aで示したような透明底プレートとFig. 4Bのような黒色底プレートが販売されている。透明底プレートでは顕微鏡を用いて細胞の様子を観察することができるが、蛍光強度を測

定する際は黒色底の方が高いsignal/background比を得られる¹⁸⁾。これら2種類のプレートを用いて培養細胞による酸素消費の検出を行った。その結果、どちらのプレートもポジティブコントロールであるGOX群の蛍光強度の増強を確認することができたが、培養細胞による酸素消費は黒色底マイクロプレートで確認された (Fig. 4C, 4D)。以上の結果により、培養細胞による酸素消費を検出する際は、黒色底のマイクロプレートを用いれば培養細胞による酸素消費を検出できることが示唆された。以降の実験では、黒色底マイクロプレートを用いて検討を行った。

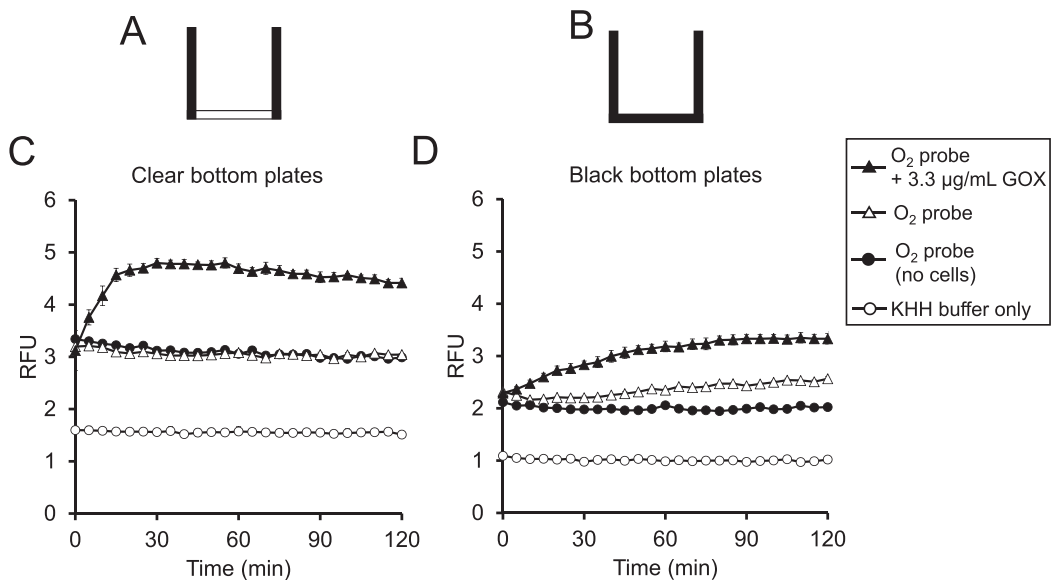


Fig. 4 測定プレートの種類による蛍光強度の差異

実験前日にHepG2をDMEM中に懸濁させ、2種類の96-wellプレートA（壁面：黒、底面：透明）、B（壁面：黒、底面：黒）に 1.25×10^5 cells/cm²になるように播種した。翌日に酸素検出りん光プローブを加えたKrebs-Henseleit-HEPES buffer (KHH buffer) を添加し、37°Cで20分間プレインキュベートした。ポジティブコントロール群に3.3 µg/mLになるようにグルコースオキシダーゼ (GOX) stock液を加え、ミネラルオイルを2滴滴下し、庫内温度を37°Cに設定した蛍光プレートリーダーで相対蛍光強度 (RFU) を測定した。A：壁面が黒色、底面が透明のプレート図、B：壁面も底面も黒色のプレート図、C：底面が透明のプレートを用いた際の5分おきのRFU経時変化、D：底面が黒色のプレートを用いた際の5分おきのRFU経時変化。平均値±標準誤差 (n = 3 - 4)。

3. 2. 2. 培養細胞の酸素消費に対するアンチマイシンAの影響

培養細胞による酸素消費量を測定する際、ネガティブコントロールとしてミトコンドリア呼吸鎖複合体Ⅲの阻害剤であるアンチマイシンAがよく用いられる^{19, 20)}。本法と通常の蛍光プレートリーダーを用いてアンチマイシンAによる影響が検出できるか検討した。その結果、アンチマイシンA添加群で蛍光強度の増強が抑制された (Fig. 5A)。また、0-60分の曲線下面積を算出したところ、アンチマイシンA添加群で有意な減少が確認された (Fig. 5B)。

3. 2. 3. 培養細胞の酸素消費に対するグルコースの影響

生体において、グルコースは最も基本的なエネ

ルギー源である。酸素を用いない解糖系でピルビン酸まで代謝された後、ミトコンドリアにおける酸化リン酸化により完全に酸化されるか、もしくは乳酸となり細胞外へ排出される²⁾。これらを踏まえ、培養細胞の酸素消費に対するグルコースの影響について検討した。その結果、グルコース添加群よりも非添加群の方が、蛍光強度が大きく増強した (Fig. 6A)。さらに0-60分の曲線下面積を算出したところ、グルコース非添加群で有意な増加が認められた (Fig. 6B)。過去の報告²¹⁾によると、培養液中のグルコース濃度を25 mMから5 mMに減少させることでHepG2による酸素消費量が14-32%増加している。使用しているグルコース濃度は異なるが、本研究でも同様の結果を得られた。

HepG2細胞はヒト肝細胞ガン由来細胞株であ

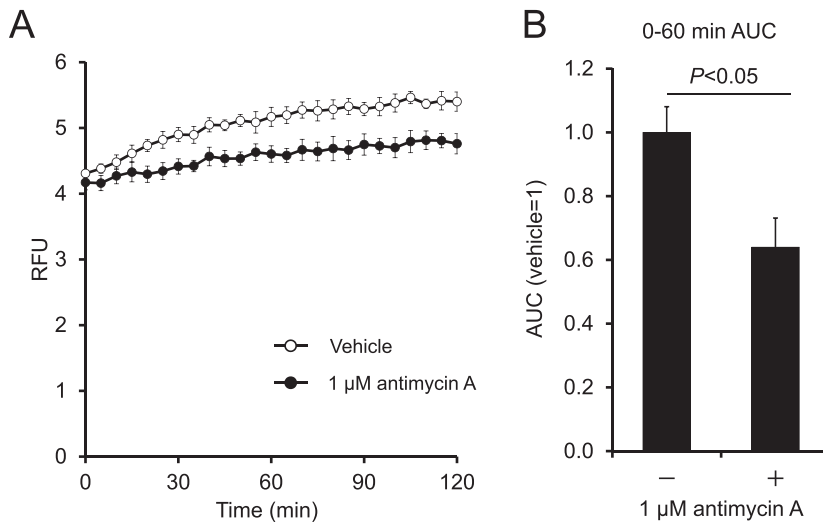


Fig. 5 培養細胞の酸素消費に対するアンチマイシンAの影響

実験前日にHepG2をDMEM中に懸濁させ、96-well黒色プレートに 1.25×10^5 cells/cm²になるように播種した。翌日に酸素検出用蛍光プローブを加えたKrebs-Henseleit-HEPES buffer (KHH buffer)を添加し、37°Cで20分間プレインキュベートした。アンチマイシンAは終濃度1 μMとなるように添加した。その後、ミネラルオイルを2滴滴下し、庫内温度を37°Cに設定した蛍光プレートリーダーで相対蛍光強度 (RFU) を測定した。その後、0-60分間の曲線下面積 (AUC) を算出した。A: 5分おきのRFU経時変化, B: 0-60分間の曲線下面積。平均値±標準誤差 (n = 4)。対応のないt検定で平均値の差を検定した ($P < 0.05$)。

る²²⁾。ガン細胞は培養液にグルコースが十分に存在すると、好氣的条件下においても酸素を利用しない解糖系にATP産生を依存する傾向があり、Warburg効果（好氣的解糖）とも呼ばれている^{23, 24)}。以上より、グルコース添加群では酸素を利用しない解糖系のみでATPを産生していたが、グルコース非添加群では、細胞内に貯蔵されている中性脂肪を β 酸化し、ミトコンドリアによる酸化的リン酸化によってATPを確保する必要があったため、グルコース添加群よりも酸素を多く消費したのではないかと考えられた。

4. 結語

りん光プローブを用いた細胞外酸素消費を検出する際、測定プレートには黒色底のマイクロプ

レートを用いること、さらにミネラルオイルで培養液上部をシーリングする前に測定機器の庫内と同じ温度で20分プレインキュベーションにより温度管理を徹底することで、時間分解蛍光測定機能を有さない通常の蛍光プレートリーダーでも培養細胞による酸素消費を検出可能であることが明らかとなった。

本研究の一部は、令和2年度プロジェクト研究「肝細胞における細胞外ビルビン酸のグルコース利用促進作用とその機構」、令和3年度プロジェクト研究「生体内に存在する有機酸の新規機能性の探索とその機構の解析」、JSPS科研費 若手研究「肝細胞における細胞外ビルビン酸のグルコース利用促進作用とその機構（課題番号：20K19646）」の助成により行われたものである。

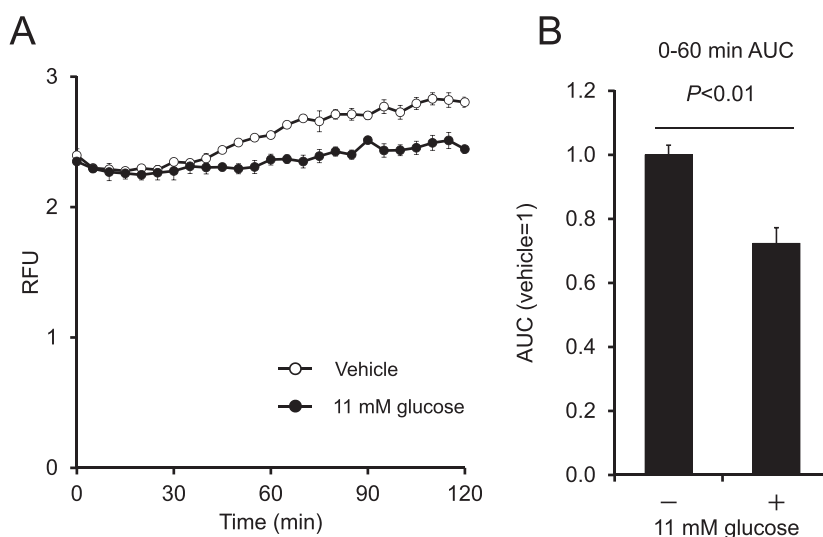


Fig. 6 培養細胞の酸素消費に対するグルコースの影響

実験前日にHepG2をDMEM中に懸濁させ、96-well黒色プレートに 1.25×10^5 cells/cm²になるように播種した。翌日に酸素検出りん光プローブを加えたKrebs-Henseleit-HEPES buffer (KHH buffer)を添加し、37°Cで20分間プレインキュベートした。グルコースは終濃度11 mMとなるように添加した。その後、ミネラルオイルを2滴滴下し、庫内温度を37°Cに設定した蛍光プレートリーダーで相対蛍光強度 (RFU) を測定した。その後、0 - 60分間の曲線下面積 (AUC) を算出した。A: 5分おきのRFU経時変化, B: 0 - 60分間の曲線下面積。平均値 \pm 標準誤差 (n = 4)。対応のないt検定で平均値の差を検定した ($P < 0.05$)。

参考文献

- 1) 独立行政法人 環境再生保全機構. 大気環境の情報館 私たちの暮らし：大気.
https://www.erca.go.jp/yobou/taiki/kids/aozora/kurashi_04.html (2021年9月21日閲覧).
- 2) 石崎 泰樹, 丸山 敬 監訳 (2019) リッピンコットシリーズ イラストレイテッド生化学, 原書7版, p 91-135. 丸善出版, 東京.
- 3) Jonathan R. Friedman, Jodi Nunnari (2014) Mitochondrial form and function. *Nature* 505: 335-343.
- 4) Alexis Diaz-Vegas, Pablo Sanchez-Aguilera, James R Krycer, Pablo E Morales, Matias Monsalves-Alvarez, Mariana Cifuentes, Beverly A Rotherme, Sergio Lavandero (2020) Is mitochondrial dysfunction a common root of noncommunicable chronic diseases?. *Endocrine reviews* 41: 491-517.
- 5) Iain P. Hargreaves, Mesfer Al Shahrani, Luke Wainwright, Simon J. R. Heales (2016) Drug-induced mitochondrial toxicity. *Drug Safety* 39: 661-674.
- 6) Leland C. Clark JR., Richard Wolf, Donald Granger, Zena Taylor (1953) Continuous recording of blood oxygen tensions by polarography. *Journal of Applied Physiology* 6: 189-193.
- 7) Dmitri B. Papkovsky (2004) Methods in optical oxygen sensing: protocols and critical analyses. *Methods in Enzymology* 381: 715-735.
- 8) 吉原 利忠, 飛田 成史 (2017) りん光寿命計測による細胞・組織内酸素濃度定量. *ファルマシア* 53巻 : 220-224.
- 9) Dmitri B. Papkovsky, Ruslan I. Dmitriev (2013) Biological detection by optical oxygen sensing. *Chemical Society Reviews* 42: 8700-8732.
- 10) Ruslan I. Dmitriev, Dmitri B. Papkovsky (2012) Optical probes and techniques for O₂ measurement in live cells and tissue. *Cellular and Molecular Life Sciences* 69: 2025-2039.
- 11) Yvonne Will, James Hynes, Vladimir I. Ogurtsov, Dmitri B. Papkovsky (2006) Analysis of mitochondrial function using phosphorescent oxygen-sensitive probes. *Nature Protocols* 1: 2563-2572.
- 12) Lue Sun, Takashi Moritake, Kazuya Ito, Yoshitaka Matsumoto, Hironobu Yasui, Hidehiko Nakagawa, Aki Hirayama, Osamu Inanami, Koji Tsuboi (2017) Metabolic analysis of radioresistant medulloblastoma stem-like clones and potential therapeutic targets. *PLoS One* 20: e0176162.
- 13) Atushi Kawano, Hiromichi Nakamura, Shu-ichi Hata, Miki Minakawa, Yutaka Miura, Kazumi Yagasaki (2009) Hypoglycemic effect of aspalathin, a rooibos tea component from *Aspalathus linearis*, in type 2 diabetic model db/db mice. *Phytomedicine* 16: 437-443.
- 14) 北原 重登, 塚本 貞次, 野中 靖臣, 水崎 幸一 著 (2021) 食を中心とした化学, 第5版, p 58-59. 東京化学社, 東京.
- 15) セントラル科学株式会社. 「酸素の溶解度」.
https://aqua-ckc.jp/doc/CP04-200-01-006_DO.pdf
(2021年8月19日閲覧).
- 16) Sarina Arain, Svenja Weiss, Elmar Heinzle, Gernot T. John, Christian Krause, Ingo Klimant (2005) Gas sensing in microplates with optodes: Influence of oxygen exchange between sample, air, and plate material. *Biotechnology and Bioengineering* 90: 271-280.
- 17) John Alderman, James Hynes, Suzanne M. Floyd, Jan Krüger, Rosemary O'Connor, Dmitri B. Papkovsky (2004) A low-volume platform for cell-respirometric screening based on quenched-luminescence oxygen sensing. *Biosensors and Bioelectronics* 19: 1529-1535.
- 18) 株式会社パーキンエルマージャパン. マイクロプレートQ & A.

- <https://www.perkinelmer.co.jp/assays/tabid/2302/Default.aspx> (2021年9月21日閲覧).
- 19) James Hynes, Lisa D. Marroquin, Vladimir I. Ogurtsov, Katerina N. Christiansen, Gregory J. Stevens, Dmitri B. Papkovsky, Yvonne Will (2006) Investigation of drug-induced mitochondrial toxicity using fluorescence-based oxygen-sensitive probes. *Toxicological Sciences* 92: 186–200.
- 20) Cristina Sánchez-González, Laura Formentini (2021) An optimized protocol for coupling oxygen consumption rates with β -oxidation in isolated mitochondria from mouse soleus. *STAR Protocols* 2: 100735.
- 21) Willem G.E.J.Schoonen, Joe C.R.Stevenson, Walter M.A. Westerink G, JeanHorbach (2012) Cytotoxic effects of 109 reference compounds on rat H4IIE and human HepG2 hepatocytes. III: Mechanistic assays on oxygen consumption with MitoXpress and NAD(P)H production with Alamar Blue™. *Toxicology in Vitro* 26: 511–525.
- 22) David P. Aden, Alice Fogel, Stanley Plotkin, Ivan Damjanov, Barbara B. Knowles (1979) Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature* 282: 615–616.
- 23) Otto Warburg (1956) On the origin of cancer cells. *Science, New Series* 123: 309–314.
- 24) Maria V Liberti, Jason W Locasale (2016) The Warburg effect: how does it benefit cancer cells?. *Trends in Biochemical Sciences* 41: 211–218.