

原子吸光法による細胞培地中金属元素の 直接分析

抗体医薬品の原薬は、主に CHO 細胞を培養することにより産生されます。培養中の細胞代謝や産生される抗体の一次構造は、培地の栄養成分（糖やアミノ酸など）および金属元素の濃度に影響を受けることが近年報告されています。例えば培地中の金属元素について、Zn は細胞内に取り込まれて少なくとも 300 種の酵素や転写因子の補因子として働くこと¹⁾、IgG に付加される糖鎖の構成糖が培地中の Mn/Zn 比に応じて変化すること²⁾などが挙げられます。そのため抗体医薬品の品質を一定に保つうえでは、培地中の金属元素濃度をモニタリングすることが重要と考えられます。

これまで培地中金属元素の測定においては、ICP-MS やキレート定量法といった手法が用いられてきました。しかし、ICP-MS はイニシャル/ランニングコストが高く、キレート定量法では、特異性の高いキレート剤を配位させる必要があるため元素ごとにサンプルの前処理が必要であり、煩雑さに課題があります。

そこで我々は安価かつ簡便に複数の金属元素を分析できる原子吸光法を用いて、培地中の金属元素を測定しましたので、その内容を紹介します。

Y. Jiang, H. Kuroda

装置原理と特長

原子吸光法は、高温で元素を原子化し、原子化時に特定の波長の光が吸光されることを利用して元素濃度を定量する手法です。

原子化法に関しては主に 2 種類があり、電流を流すことで加熱する電気加熱法と可燃性ガスの炎で加熱するフレイム法に分けられます。電気加熱法とフレイム法の特長を表 1 に抜粋しています。

今回の測定は、まず高感度に測定が可能な電気加熱法で分析後、培地中に高濃度で含まれる元素についてはフレイム法でも評価しました。

表 1 原子化法の比較

	フレイム法	電気加熱法
感度	ppb~ppm	ppt~ppb
原子化効率	約 10 %	90 %以上
必要試料量/1 分析	1~2 mL	5~50 μ L
分析時間/1 分析	5~10 sec.	2~5 min.
再現性	RSD 1 %程度	RSD 3 %程度

試料

CHO 細胞用培地 (3 種*、A, B, C)

* ベンダーの違い

装置と測定条件

測定には、島津原子吸光分光光度計 AA-7000 とグラファイトファーンレスアトマイザ (フレイム法と電気加熱法の自動切換えが可能)、そしてオートサンプラを用いました。

電気加熱法とフレイム法測定時の分光器と原子化に関する主な条件を表 2 と 3 に示します。

表 2 電気加熱法の分光器および原子化条件

	分析波長	スリット幅	灰化温度	原子化温度	点灯モード	チューブタイプ
Cu	324.8 nm	0.7 nm	800 °C	2500 °C	BGC-D2	パイロ化チューブ
Mn	279.5 nm	0.2 nm		2200 °C		
Co	240.7 nm	0.2 nm		2300 °C		
Fe	248.3 nm	0.2 nm		2300 °C		
Zn	213.9 nm	0.7 nm	400 °C	2200 °C		

表 3 フレイム法の分光器および原子化条件

	分析波長	スリット幅	点灯モード	フレイムタイプ	アセチレン流量
Fe	248.3 nm	0.2 nm	BGC-D2	空気-アセチレン	2.2 L/min
Zn	213.9 nm	0.7 nm			2.0 L/min

■ 測定方法

各細胞培地は測定元素ごとに表 4 に示したように希釈し、硝酸濃度を 0.5 w/v% に調製しました。

各元素の標準液は、原子吸光分析用の 1000 mg/L 標準液をそれぞれ希釈し、硝酸濃度を 0.5 w/v% に調製しました。

全ての分析は検量線法で行いました。

■ 測定結果

表 5 に各細胞培地の測定結果と添加回収率を示します。添加回収試験は元素ごとに一定濃度の標準液を添加し、濃度測定を行いました。添加回収率は、添加試料と無添加試料の濃度差を添加濃度で除することで求めました。

細胞培地中の Fe と Zn に関して、電気加熱法とフレーム法で得られた結果は同等でしたので、ここでは例としてフレーム法の測定結果を示します。

定量下限 (LOQ) の目安として、金属元素がほとんど含まれない培地を 10 回繰り返し測定で得られた標準偏差 (SD) から算出された $10 \sigma_{bl}$ の値を表記しています。

図 1 に電気加熱法、図 2 にフレーム法で得られた検量線をそれぞれ示します。各検量線が $r = 0.999$ 以上と良好な相関関係が得られました。

図 3 に電気加熱法による培地の測定時のピークプロファイルの抜粋を示します。

表 4 細胞培地の希釈倍率

	電気加熱法					フレーム法	
	Cu	Mn	Co	Fe	Zn	Fe	Zn
A	10 倍	20 倍	10 倍	2000 倍	200 倍	10 倍	2 倍
B		10 倍	20 倍	500 倍	500 倍	2 倍	
C			10 倍		1000 倍		

表 5 各細胞培地の測定結果

		電気加熱法 (µg/L)			フレーム法 (mg/L)	
		Cu	Mn	Co	Fe	Zn
A	実濃度 *1	<5 *2	28	218	19	0.47
	添加回収率	128 %	113 %	93 %	100 %	95 %
B	実濃度 *1	<5 *2	<4 *2	467	3.4	0.73
	添加回収率	93 %	110 %	106 %	107 %	93 %
C	実濃度 *1	<5 *2	<4 *2	37.8	1.5	0.34
	添加回収率	93 %	118 %	91 %	112 %	101 %

*1 測定値を細胞培地原液に換算した値です。

*2 定量下限以下を示します。

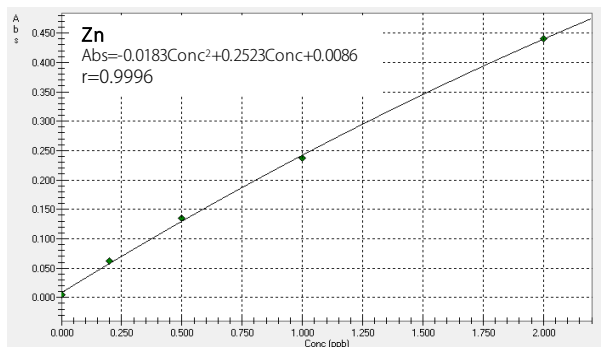
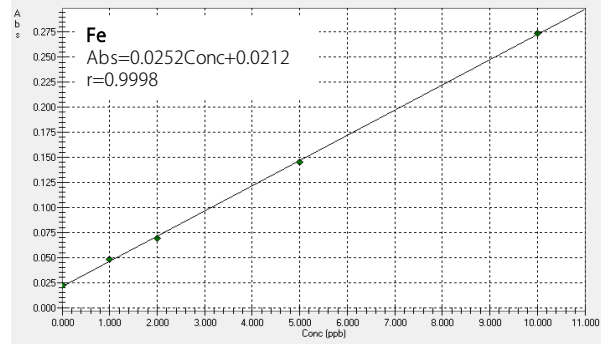
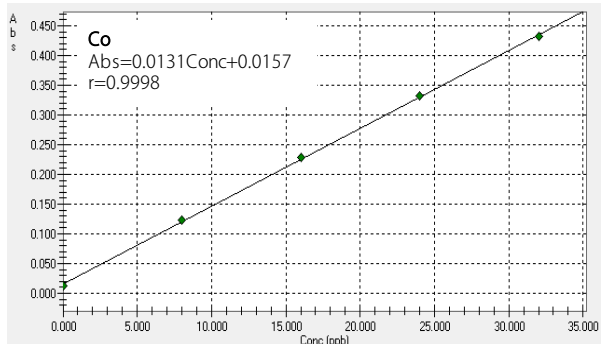
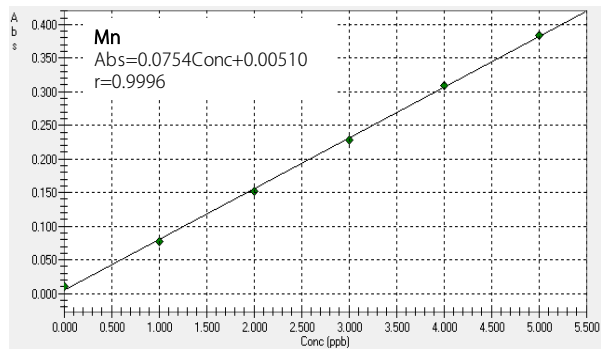
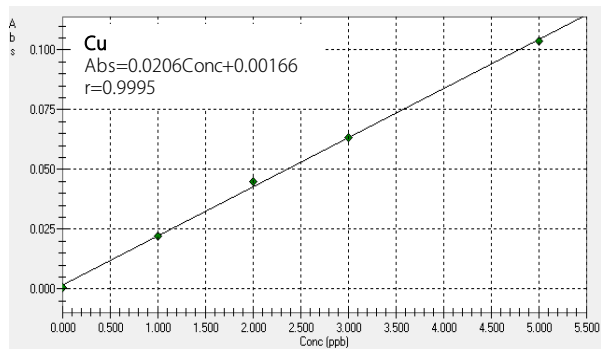


図1 電気加熱法の検量線

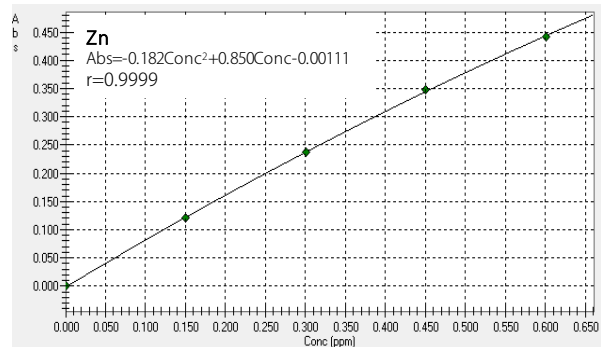
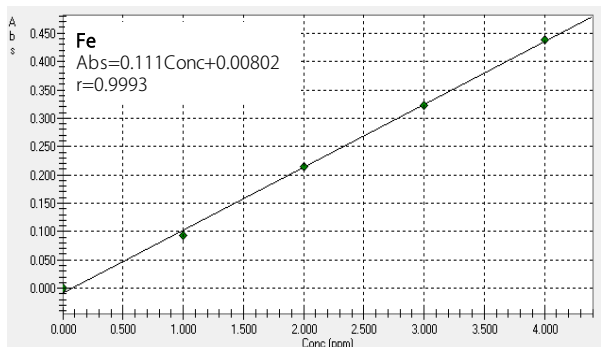


図2 フレーム法の検量線

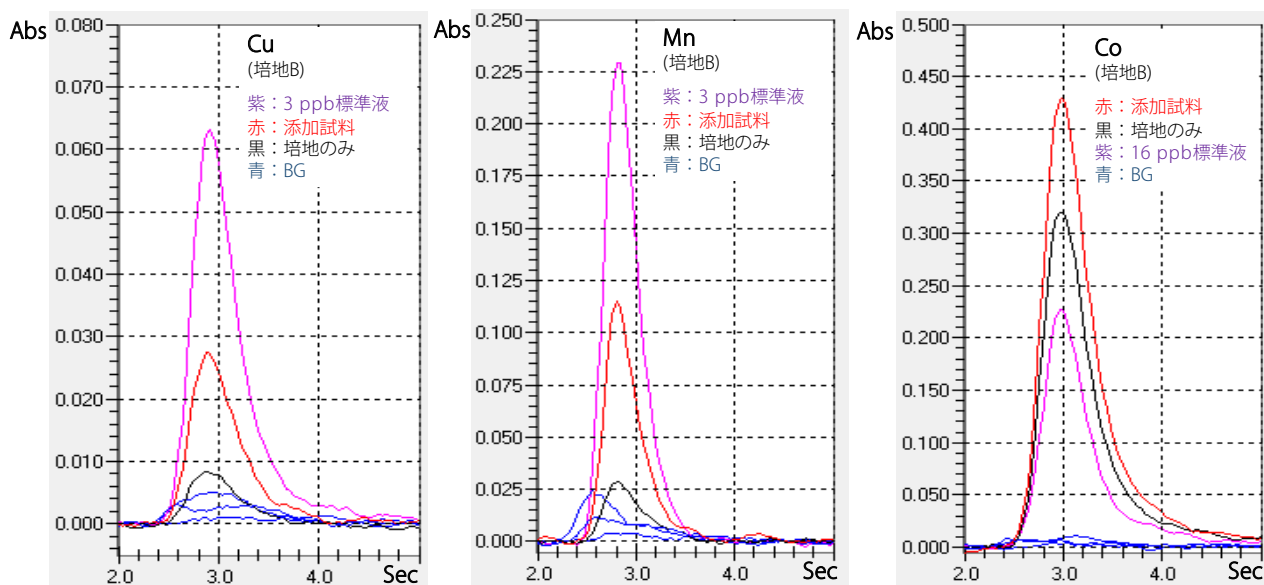


図3 電気加熱法でサンプル測定時のピークプロファイル抜粋

■ まとめ

3種類のCHO細胞培地に対して、原子吸光法（電気加熱法・フレーム法）により金属元素濃度を測定しました。培地を希釈するだけで、原子吸光法により金属元素を測定可能であることが示されました。さらに、CHO細胞培地について、ベンダーごとに特定の金属元素濃度に違いが認められました。

以上より、原子吸光法は培地中金属元素を簡便に測定する手法となることが明らかになりました。

今回の添加回収試験では、添加回収率は概ね良好でしたが、培地によってはミネラル成分と有機物の存在が添加回収率に影響を与える可能性があります。その場合は希釈率の変更や定量法を標準添加法にすることで改善する場合があります。

<参考文献>

- 1) Marreiro et al., "Zinc and Oxidative Stress: Current Mechanisms", *Antioxidants*, 2017
- 2) Prabhu et al., "Zinc supplementation decreases galactosylation of recombinant IgG in CHO cells", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018

■ 関連製品

アプリケーションニュース C186A では、培地中の有機成分を測定する手法を紹介します。当社は本稿で紹介した金属分析とあわせて、培地分析トータルソリューションを提案します。

当社 LC/MS/MS と組み合わせることで培地成分および分泌代謝物に含まれるアミノ酸をはじめとして、糖・ビタミン・有機酸など 125 成分を 1 検体あたり 20 分以内で一斉分析できます。



LC/MS/MS メソッドパッケージ 細胞培養プロファイリング Ver.2

株式会社 島津製作所

分析計測事業部
グローバルアプリケーション開発センター

初版発行：2020年8月

島津コールセンター ☎ 0120-131691
(075) 813-1691

※本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。
改訂版は下記の会員制 Web Solutions Navigator で閲覧できます。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/>

会員制 Web の閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。