

試してみたいくなる！細胞培養に役立つ培地分析 手法とアプリケーションのご紹介

島津製作所 分析計測事業部
ライフサイエンス事業統括部
細胞事業開発室
豊田 健一

目次

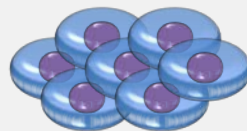
- 培地中の栄養成分/代謝物分析
 - 1. 細胞培養プロファイリングのご紹介
 - 2. アプリケーション例
 - 多成分の経時変化モニタリング例
 - 生体由来原料の分析例
 - マーカー成分の探索例
 - 3. C2MAP (Cell Culture Media Analysis Platform)
- 培地中の金属元素分析

開発の背景



-糖
-アミノ酸
-核酸（ヌクレオシド、塩基含む）
-ビタミン
-無機塩、緩衝剤など

消費



増殖

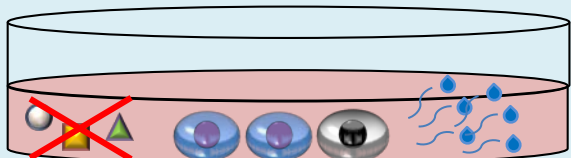
分泌

-乳酸などの有機酸
-各種代謝物

培養上清中の成分濃度は時々刻々と変化するため、
高品質な物質生産や細胞培養の実現には培養環境を適切な状態に保つことが重要

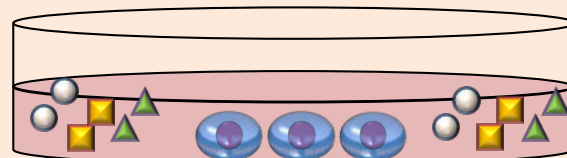
不適切な培養環境

栄養成分が枯渇し、副産物（代謝物）が蓄積した状態



適切な培養環境

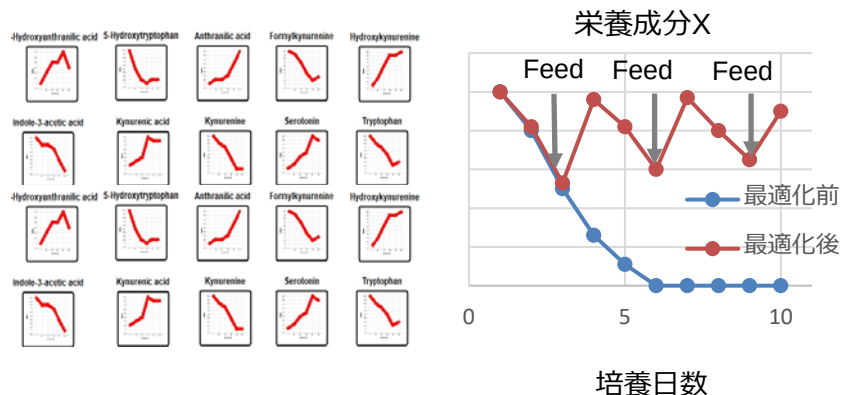
栄養成分の枯渇および副産物の蓄積前に適宜培地交換されていて、栄養成分が十分に保たれた状態



最適な培養環境の実現には
培養上清中の栄養成分／代謝物の多成分モニタリングが必要

培養上清の多成分モニタリング 期待できる用途

消費成分の嗜好を調査



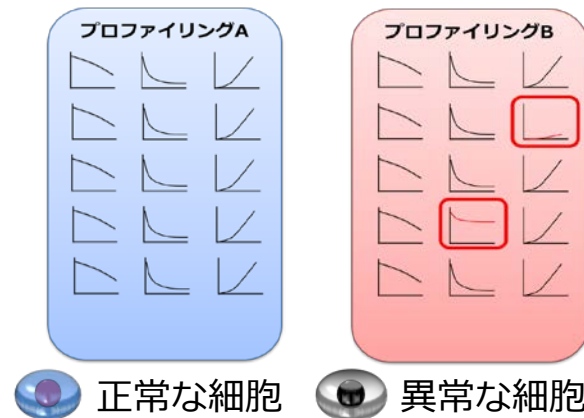
培地
開発

培地組成の最適化

物質
生産

培養プロセス開発

細胞状態に特徴的な消費・分泌成分の探索



細胞治療
研究

マーカー探索

- ✓ 細胞の生育環境を最適化することができ、細胞産物の収量や品質の改善を実現

- ✓ 培養上清中のマーカーにより非侵襲な細胞状態判別を実現

培養上清分析における課題と対策

従来の課題

クラス毎に特化した分析系
煩雑・低スループット

アミノ酸類



ビタミン類



核酸類



- 高感度
- 高速スキャン
- 高速正負切替

島津の対策

多様な化学特性を有する代謝物の
高速一斉分析が可能



培養上清の多成分一斉分析を可能にする分析メソッド開発に着手

分析メソッドのコンセプト

多成分一斉分析

下記より測定対象化合物候補選定
約160化合物

- 培地メーカーが公開している基礎培地成分
アミノ酸、ビタミン、ヌクレオシドetc
- 共同開発先*より、ご提供いただいた情報
*極東製薬工業株式会社様
- 当社分析装置を用いて同定した分泌代謝物

同一分析条件で測定可能な95化合物を選定

簡便な前処理

- 煩雑な誘導体化などの前処理不要
- サンプルの希釈系列調製が不要

Ready-to-use



- メソッドのインストール
すぐに培地分析が可能

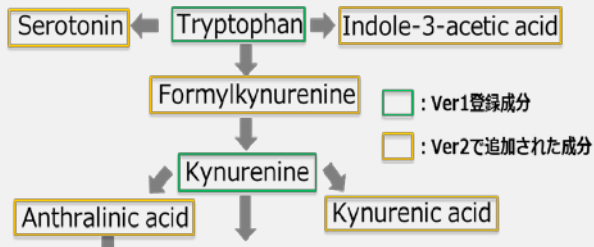
※ カラム等の消耗品類は別途ご準備頂く必要がございます

**培地成分・分泌代謝物 計95化合物を一斉分析可能な
LC/MS/MSメソッドパッケージ細胞培養プロファイリングを2015年4月にリリース**

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

Ver.1 → 2 のコンセプト

例) Tryptophan Metabolism



より網羅的な成分分析実現のため、
アミノ酸や核酸代謝の中間体を追加し、
Ver.2をリリース

製品の特長

① 125成分の高速一斉分析が可能

- Ver. 1 の95成分から125成分に測定対象拡大
1 サンプルあたり20分以内で分析が可能

② 培地分析に最適化されたメソッド

- 分析条件最適化により
高濃度成分（グルタミンやグルコースなど）と
微量成分（ビタミンなど）の同時分析が可能

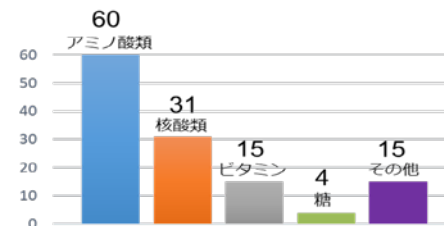
③ データ解析サポート

- 解析サポートソフトを同梱
登録125成分の時系列変化可視化や
Volcano Plotによる2群間比較が可能

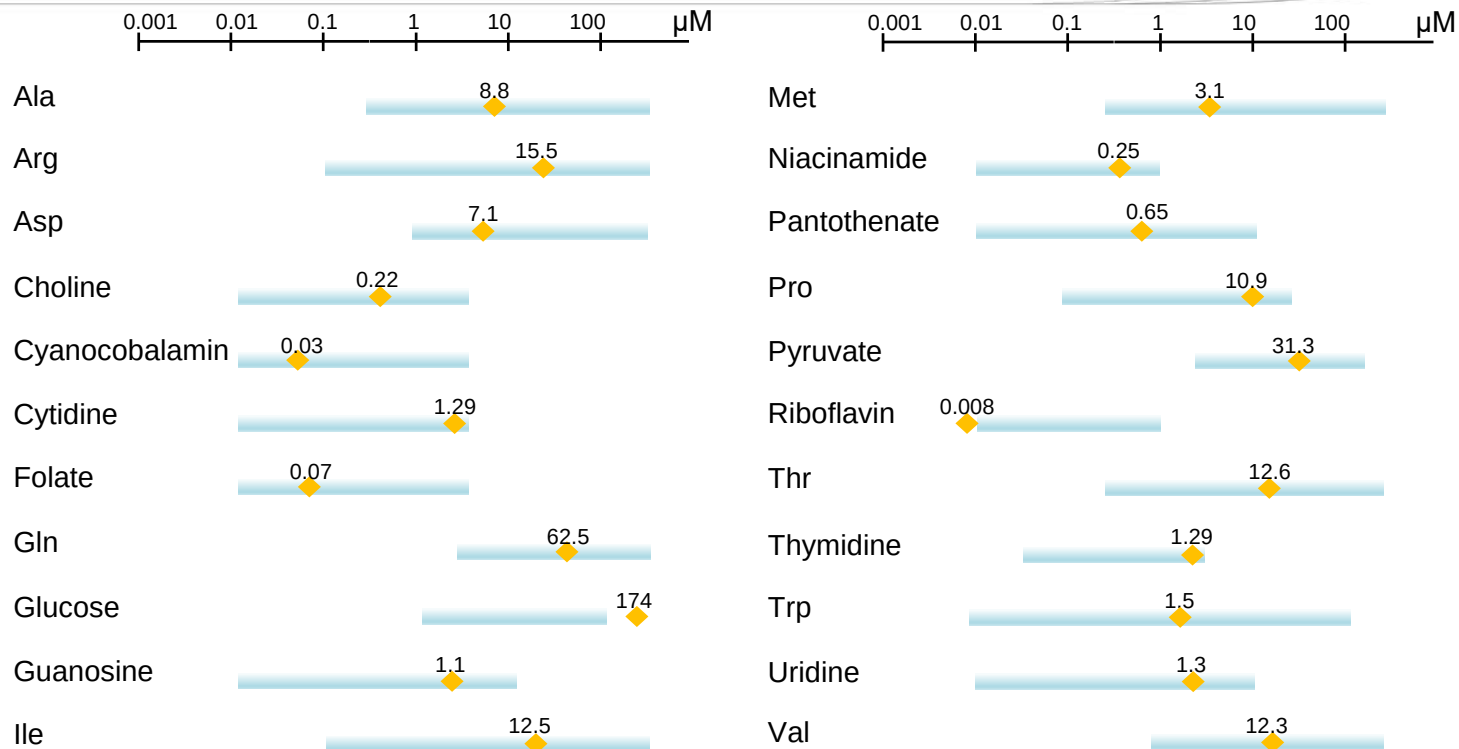
特徴①：125成分の一斉分析が可能

Amino acids and metabolites		Nucleic acids and metabolites	Sugars	Others
1-Methylhistidine	Glycyl-glutamine	3-Aminoisobutyric acid	Gluconic acid	2-Aminoethanol
2-Aminoadipic acid	Histidine	3-Aminopropanoic acid	Hexose (Glucose)	2-ketoglutaric acid
2-Aminobutyric acid	Homocysteine	Adenine	Sucrose	Acotinic acid
3-Hydroxyanthranilic acid	Hydroxykynurenine	Adenosine	Threonic acid	Citric acid
3-Hydroxyisobutyric acid	Hydroxylysine	Adenosine monophosphate	Vitamins	Fumaric acid
3-Methyl-2-oxovaleric acid	Indole-3-acetic acid	Cytidine	4-Aminobenzoic acid	Glyceric acid
3-Methylhistidine	Isoleucine	Cytidine monophosphate	4-Pyridoxic acid	Isocitric acid
4-Aminobutyric acid	Kynurenic acid	Cytosine	Ascorbic acid	Lactic acid
4-Hydroxyphenyllactic acid	Kynurenine	Deoxyadenosine	Biotin	Malic acid
4-Hydroxyproline	Leucine	Deoxyadenosine monophosphate	Choline	NAD
5-Glutamylcysteine	Lysine	Deoxycytidine	Cyanocobalamin	O-Phosphoethanolamine
5-Hydroxytryptophan	Methionine	Deoxycytidine monophosphate	Folic acid	Penicillin G
5'-Methylthioadenosine	Methionine sulfoxide	Deoxyguanosine	Lipoic acid	Pyruvic acid
5-Oxoproline	N-Acetylaspartic acid	Deoxyguanosine monophosphate	Niacinamide	Succinic acid
Alanine	N-Acetylcysteine	Guanine	Nicotinic acid	Taurine
Alanyl-glutamine	Ornithine	Guanosine	Pantothenic acid	Internal Standard
Anthranilic acid	Oxidized glutathione	Guanosine monophosphate	Pyridoxal	2-Isopropylmalic acid
Arginine	Phenylalanine	Hypoxanthine	Pyridoxalphosphate	
Argininosuccinic acid	Pipecolic acid	Inosine	Pyridoxine	
Asparagine	Proline	Inosine monophosphate	Riboflavin	
Aspartic acid	Putrescine	Orotic acid		
Citrulline	Saccharopine	Thymidine		
Cystathionine	S-Adenosylhomocysteine	Thymidine monophosphate		
Cysteine	Serine	Thymine		
Cystine	Serotonin	Uracil		
Formylkynurenine	Threonine	Uric acid		
Glutamic acid	Tryptophan	Uridine		
Glutamine	Tyrosine	Uridine monophosphate		
Glutathione	Urocanic acid	Xanthine		
Glycine	Valine	Xanthosine		
		Xanthosine monophosphate		

細胞培養プロファイリング Ver.2 登録成分



特長②-1：培地含有量を考慮した感度設定



◆ MEMα 培地における前処理後計算濃度

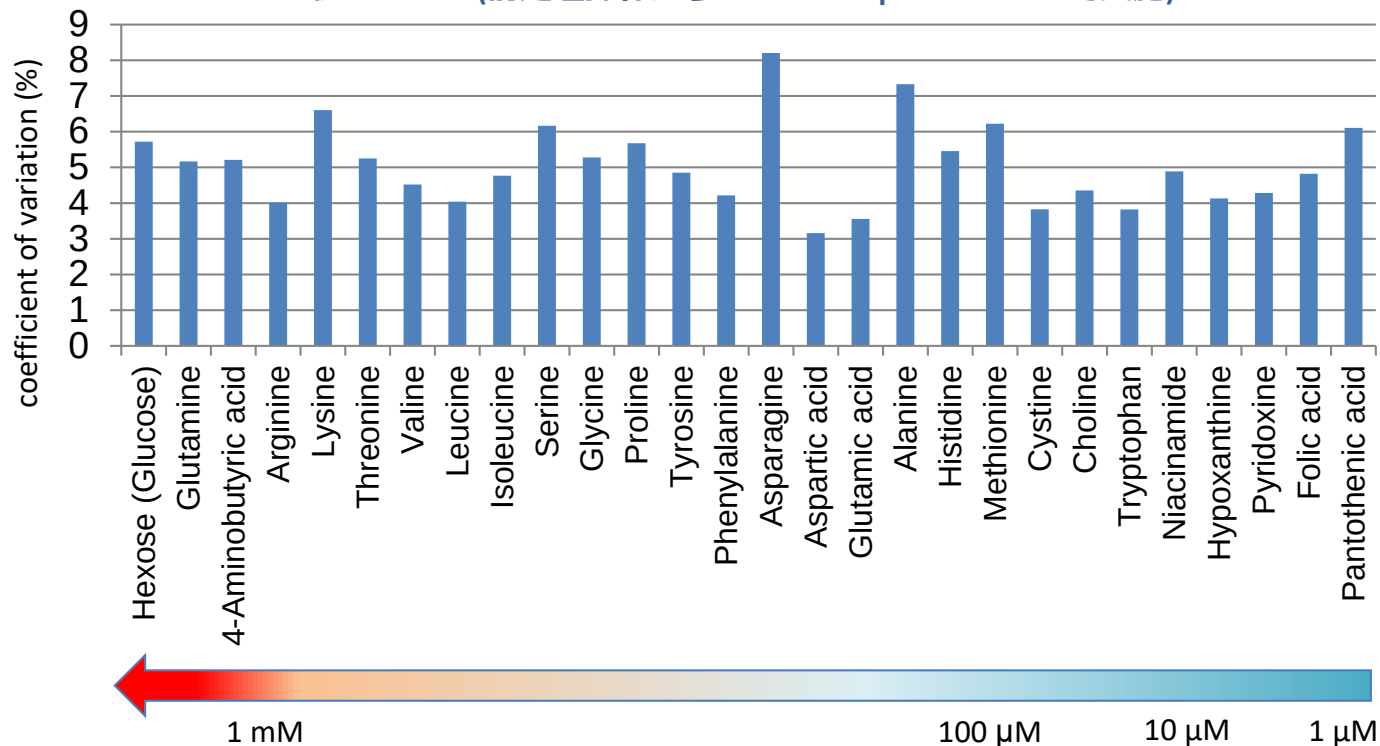
直線性を示した領域 *

*実験値であり、保証値ではありません。

1 runで多成分を同時に測定可能

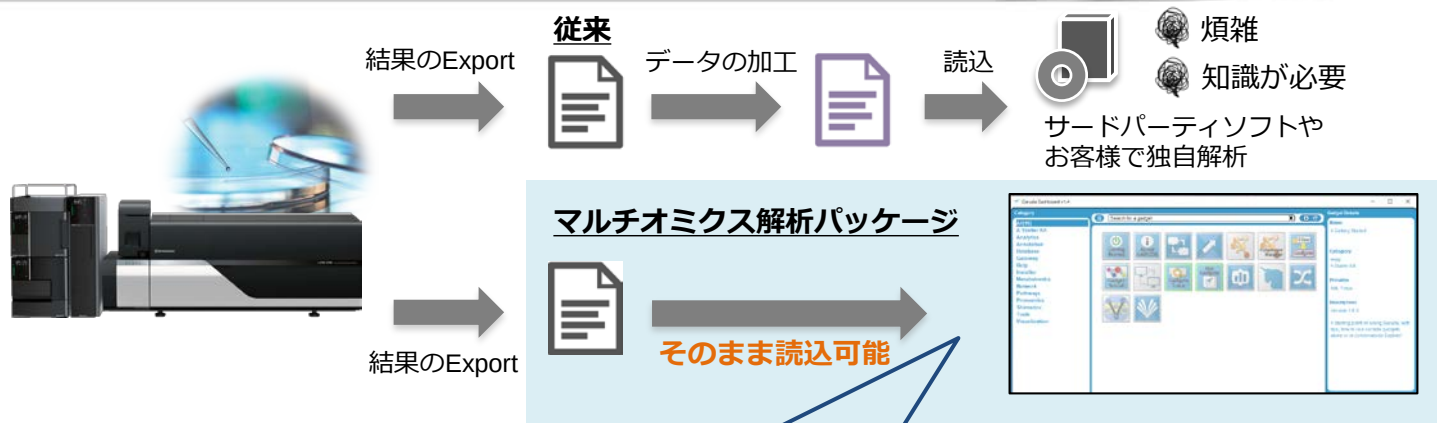
特長②-2：分析再現性

例. mTeSR1 (前処理操作からTechnical replicates: N = 6で実施)



高濃度成分から微量成分まで再現性良く分析可能

特長③：付属ソフトによるデータ解析サポート



ご紹介する機能



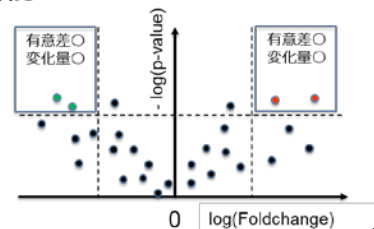
VANTED

登録の125成分に対応したテンプレートに分析結果をインポートすることで、登録成分の時系列変化を一覧することが可能



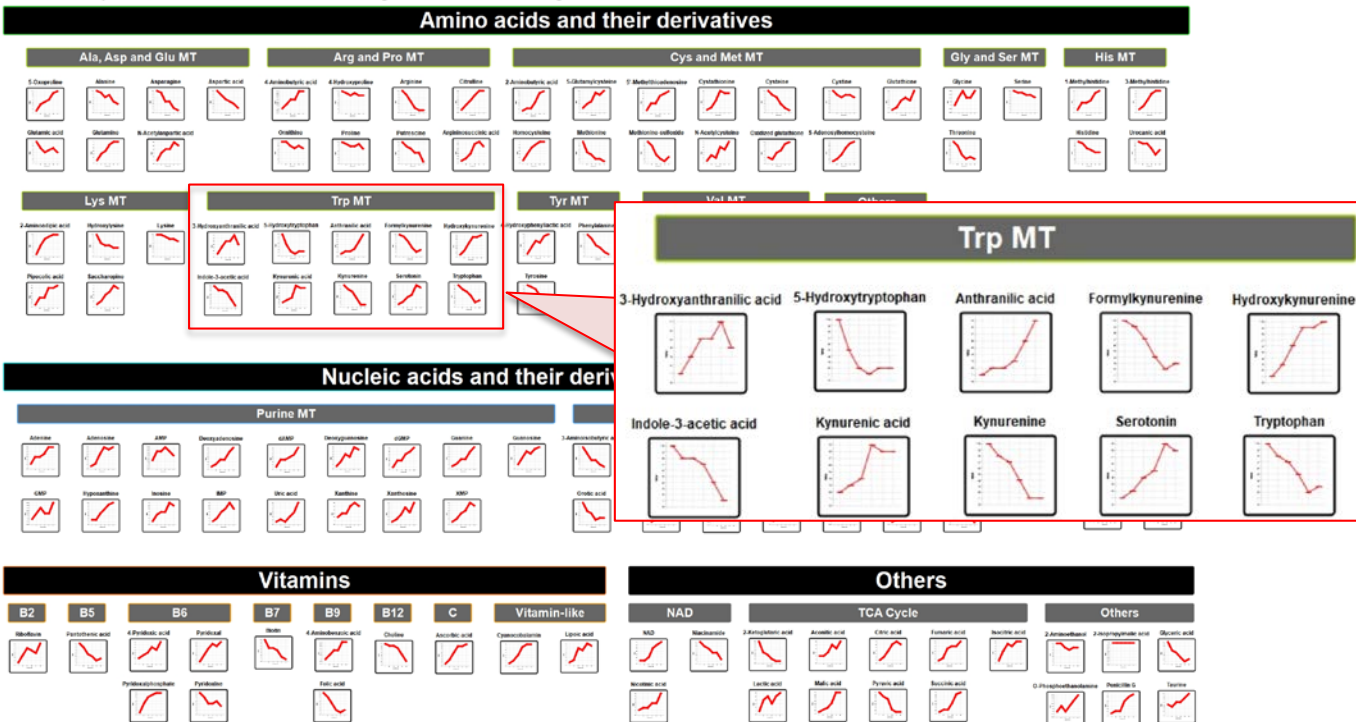
Volcano Plot

2群間の差を可視化するツール
相対比が大きく、かつばらつきの小さい成分を
効率よく抽出可能



特長③-1 : VANTED (経時変化の可視化)

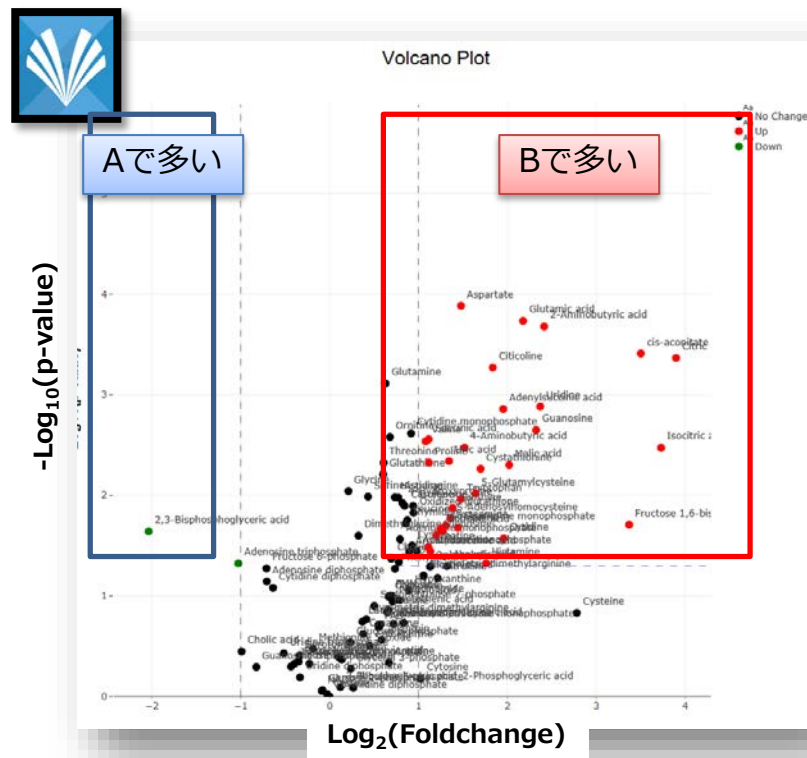
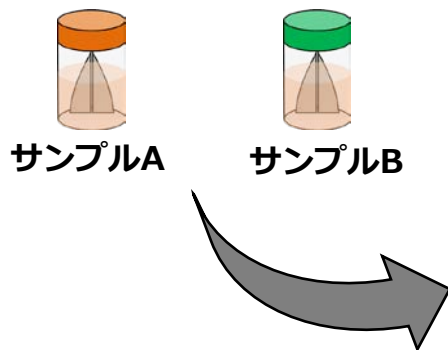
Metabolic Map for Shimadzu LC/MS/MS Method Package for Cell Culture Profiling Ver. 2



登録125化合物の経時変化を一覧可能

特長③-2 : Volcano Plot

サンプル間で差のある成分の探索



二群間で差のある成分を簡便に抽出可能

目次

➤ 培地中の栄養成分/代謝物分析

1. 細胞培養プロファイリングのご紹介

2. アプリケーション例

- 多成分の経時変化モニタリング例
- 生体由来原料の分析例
- マーカー成分の探索例

3. C2MAP (Cell Culture Media Analysis Platform)

➤ 培地中の金属元素分析

分析までの流れ

ex)



細胞が混入しないようにして上清を回収

//

培地／培養上清サンプル: 100 μ L
内標溶液*: 20 μ L
アセトニトリル: 200 μ L

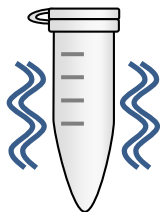
※ 混合比は、サンプルにより異なる

*0.5 mM 2-Isopropylmalic acid aq.

上清: 50 μ L
超純水: 450 μ L



分注



混合



遠心



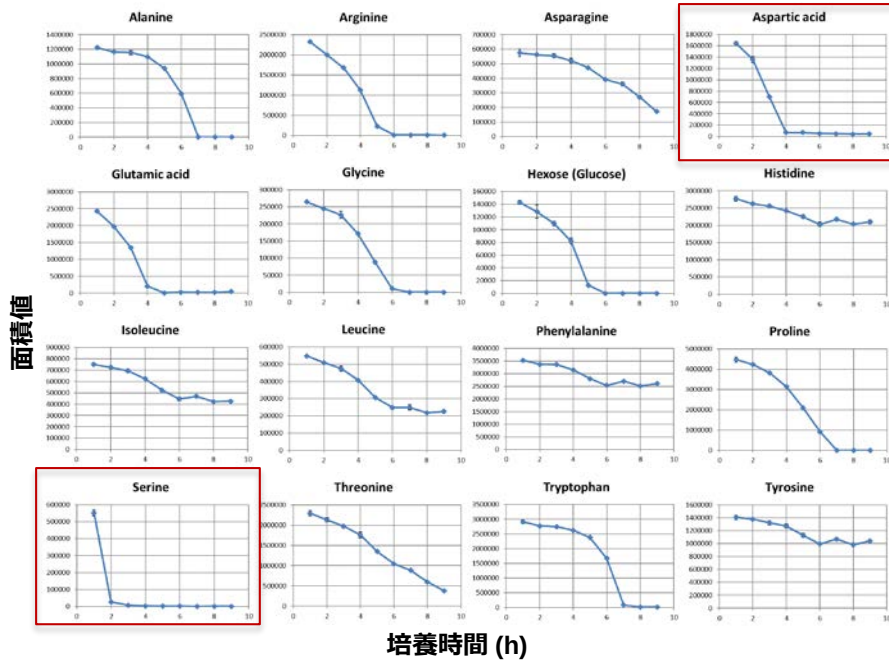
希釈

細胞培養
プロファイリング Ver.2

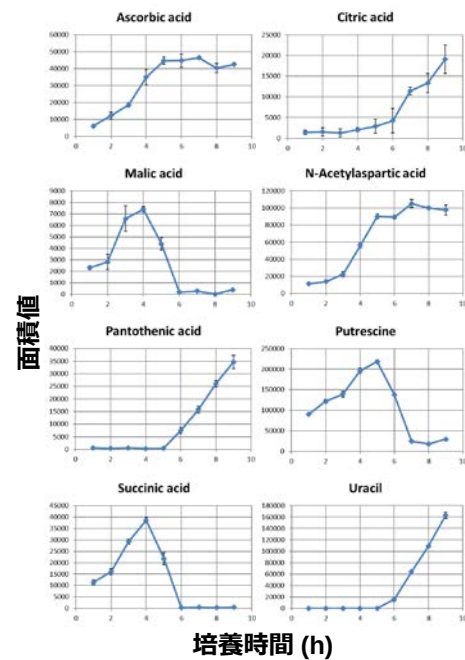
多成分の経時変化をモニタリング可能

培地組成の最適化/
培養プロセス開発

培地成分



分泌代謝物



株名: BW25113 培地: M9 + アミノ酸混合物・グルコース

最適な培地組成や培養プロセス開発に寄与

生体由来原料も分析可能

培地
開発

培地組成の最適化



FBSなど添加物：
組成・含有量が不明

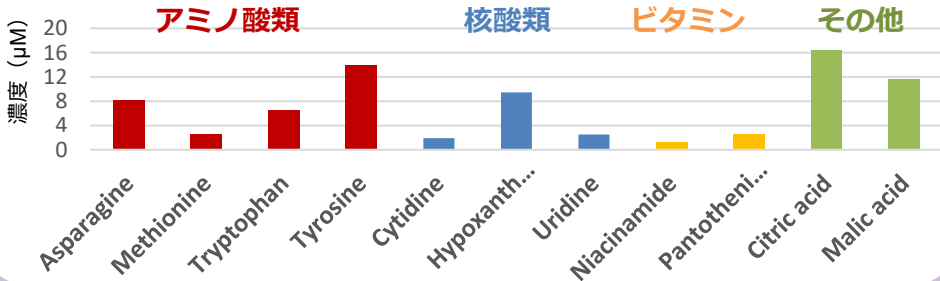
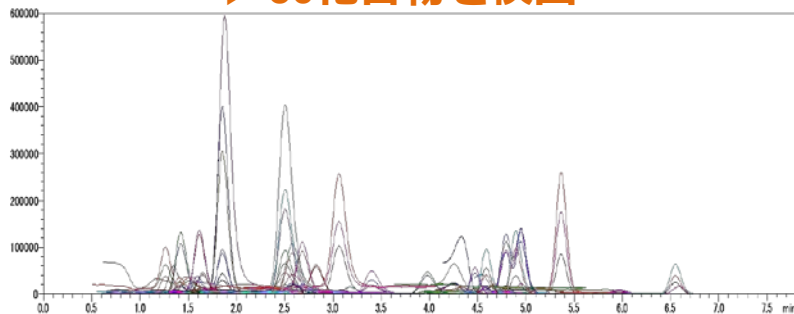


細胞培養MP 125成分
を分析



検量線を用いた濃度
算出

> 60化合物を検出



組成や含有量が不明な試料の組成分析/濃度算出が可能

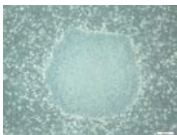
iPS細胞の未分化マーカー探索 ～細胞状態に特徴的な成分を抽出～

細胞治療
研究

マーカー探索

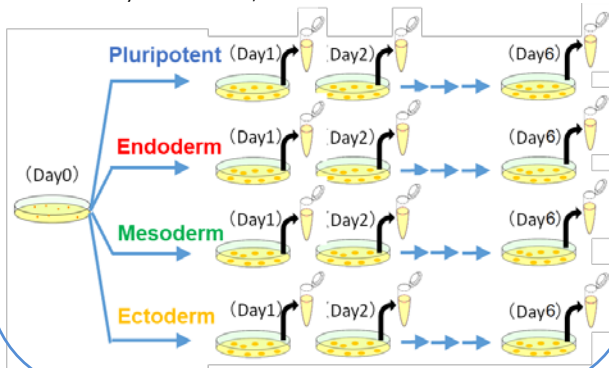
培養条件

hiPSCs

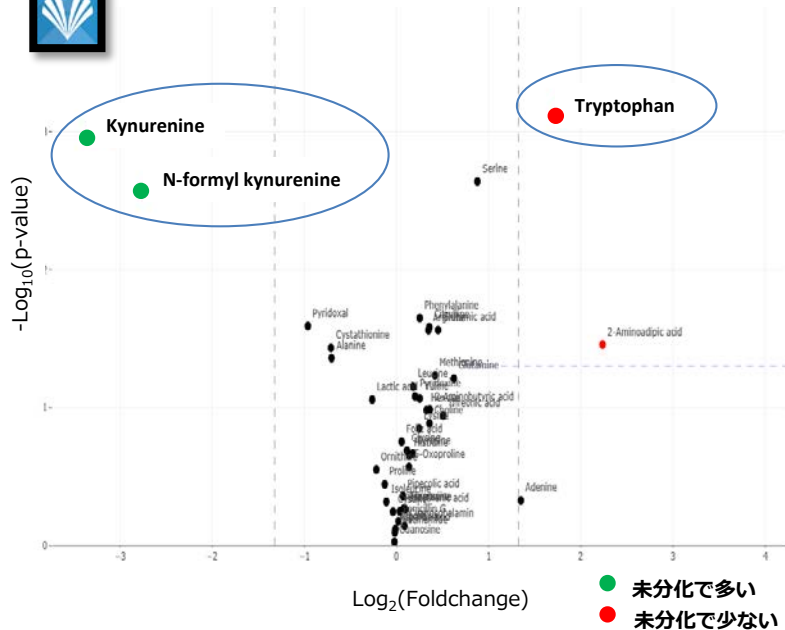


Provided by iPS PORTAL, Inc

細胞株	ヒトiPS細胞 (PFX#9株)
培地	TeSR-E8™



未分化 vs 外胚葉 (Day4)



付属の解析ソフトを用いて、細胞状態に特徴的な成分を簡便に抽出可能

※未分化 vs 内胚葉, 未分化 vs 中胚葉でも、上記 3 成分についても同様の結果を取得

iPS細胞の未分化マーカー探索

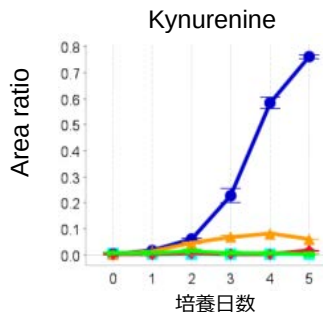
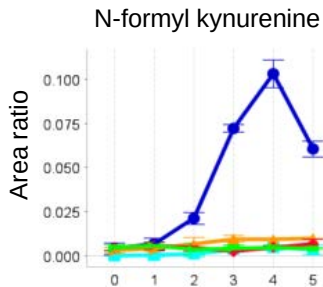
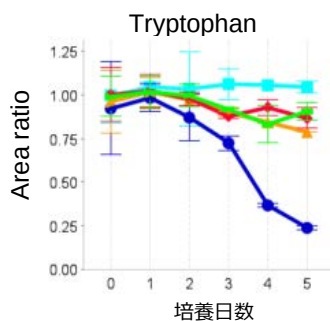
～細胞非侵襲にマーカーを探索可能～

細胞治療
研究

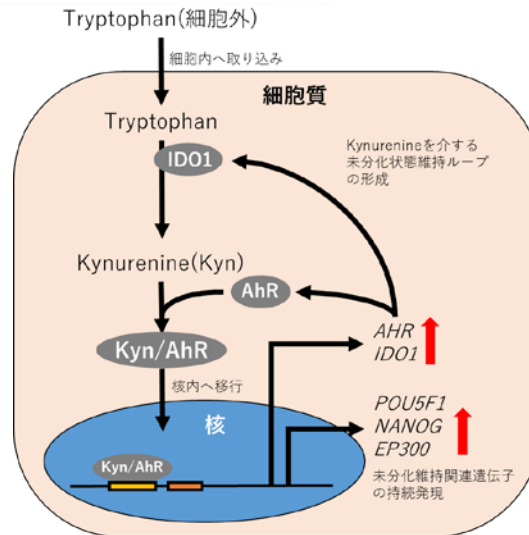
マーカー探索



VolcanoPlotで差が認められた成分の
経時変化をVANTEDにより確認



- 未分化維持
- 内胚葉分化
- 中胚葉分化
- 外胚葉分化
- コントロール (培地のみ)



明らかになった未分化維持のメカニズム

(参考文献)

Kynurenine signaling through the aryl hydrocarbon receptor maintains the undifferentiated state of human embryonic stem cells
Science Signaling 25 Jun 2019: Vol. 12, Issue 587, eaaw3306

培養上清から未分化維持に密接に関わるマーカー成分を見出すことに成功

目次

➤ 培地中の栄養成分/代謝物分析

1. 細胞培養プロファイリングのご紹介

2. アプリケーション例

- 多成分の経時変化モニタリング例
- 生体由来原料の分析例
- マーカー成分の探索例

3. C2MAP (Cell Culture Media Analysis Platform)

➤ 培地中の金属元素分析

細胞培地分析プラットフォーム C2MAPシステム (Cell Culture Media Analysis Platform)

C2MAPシステム

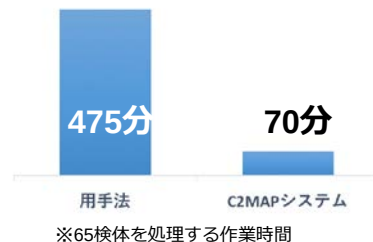
全自動前処理装置
C2MAP-2030前処理部のみ切り離した場合
(C2MAP前処理モジュール)

Features

サンプル前処理から測定まで自動化

- 最大65サンプルを自動で前処理・分析
作業工数を従来の1/7に削減可能

オペレーターの作業時間比較
(用手法 vs C2MAPシステム)



柔軟なシステム構成に対応

- 前処理部を切り離すことで、前処理装置と
LCMSをそれぞれ別室に設置可能

目次

➤ 培地中の栄養成分/代謝物分析

1. 細胞培養プロファイリングのご紹介

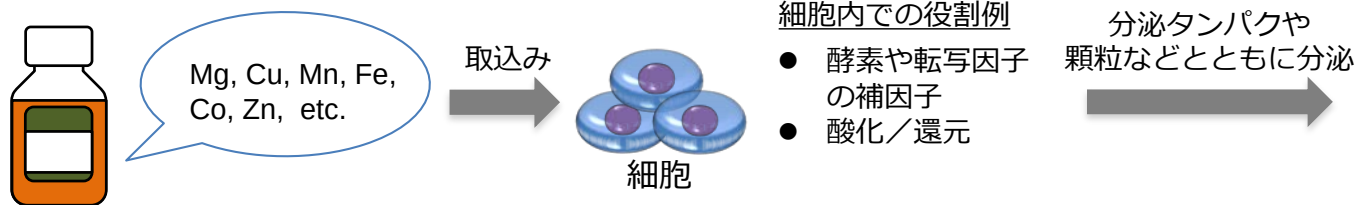
2. アプリケーション例

- 多成分の経時変化モニタリング例
- 生体由来原料の分析例
- マーカー成分の探索例

3. C2MAP (Cell Culture Media Analysis Platform)

➤ 培地中の金属元素分析

培地中金属元素 測定の意味／測定技術



金属元素は細胞によって取込み／分泌されるため、
培地中の金属元素濃度もまた高品質な物質生産や細胞培養に重要

金属元素の測定技術

従来

元素ごとに前処理が必要

Zn — キレート剤A

Cu — キレート剤B

Fe — キレート剤C

原子吸光法



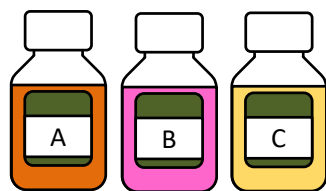
特長

- ・ 簡便な前処理*
- ・ 少量の試料で分析可能 (5 ~ 20 μ L)
- ・ 測定時間：2 ~ 3分／元素

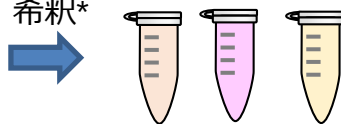
* 試料が培地の場合

原子吸光を用いた分析フロー／分析例

原子吸光を用いた分析までの工程



希釈*



10 μ L注入

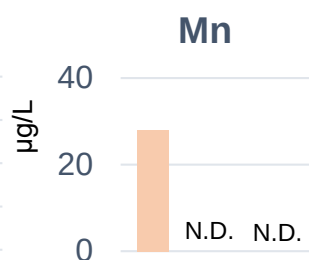
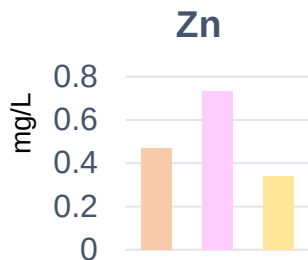
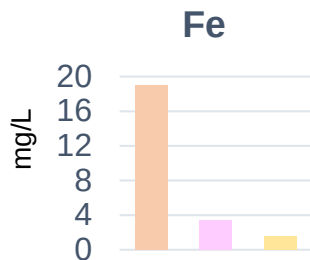


原子吸光分光光度計 AA-7000

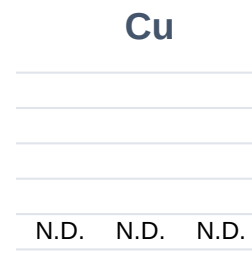
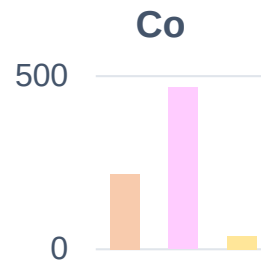
*金属元素安定化のため、
硝酸0.5 w/v%に調製

測定結果の抜粋

● 培地A ● 培地B ● 培地C * CHO細胞培地



* 定量下限：4 μ g/L



* 定量下限：5 μ g/L

原子吸光を用いることで簡便な前処理だけで測定が可能

Webinar まとめ

➤ 培地中の栄養成分/代謝物分析

• 細胞培養プロファイリング Ver2

- ✓ 125成分の一斉分析
- ✓ 培地分析に最適化
- ✓ 効率的なデータ解析



• C2MAP

- ✓ 前処理から測定まで自動化



➤ 培地中の金属元素分析



培地組成の最適化



培養プロセス開発



マーカー探索

誰でも簡単に培地／培養上清の多成分モニタリングを実施可能
高品質な物質生産や細胞培養の実現を支援

Webサイトのご案内

Webinarをご視聴頂き、有難うございました。

- 弊社Webサイトでは、各種アプリケーションのダウンロードも可能です。
是非お立ち寄りください。

<https://www.an.shimadzu.co.jp/bio/cell/download.htm>

- また製品やアプリケーションの最新情報をお知らせするメールマガジンもございますので、ご希望の方は下記にご連絡ください。

cell-biz@group.shimadzu.co.jp



C2MAPおよびLCMSは、株式会社島津製作所の商標です。

本発表で紹介する製品は研究用です。医薬品医療機器法に基づく医療機器あるいは体外診断用医薬品として承認・認証を受けておりません。治療診断目的およびその手続き上での使用はできません。



もっと詳しい情報を知りたい場合は...

島津 細胞

で検索！