

Application News

原子吸光分光光度計 AA-7000F/AAC/GFA-7000A/ASC-7000

原子吸光分光光度計を用いた 細胞培養上清中の金属元素モニタリング

No. A651

姜雨晶、黒田博隆

ユーザーベネフィット

- ◆ 原子吸光分光光度計を用いることにより、希釈のみの前処理で細胞培養上清を分析できます。
- ◆ フレーム法と電気加熱法の切替えが容易なオートアトマイザチェンザ(AAC)を用いることで、微量(ppb)~高濃度(ppm)まで幅広い濃度の金属元素を簡単に分析できます。

■はじめに

抗体医薬品は、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、培養液中の金属元素濃度変化に影響を受けることが近年報告されています。例えば、培養液中のCu濃度に応じてCHO細胞の乳酸代謝の経路が変化すること¹⁾ や、抗体の糖鎖構造が培地中のMn/Zn 比に応じて変化すること²⁾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、培養液中の金属元素濃度の経時変化をモニタリングすることが重要と考えられます。

当社ではこれまでに、細胞を含まない培養前の培地中の 金属元素を希釈のみの前処理で、原子吸光法により分析し た例を示しています³⁾。本稿では、細胞培養中に経時的に採 取した培地(培養上清)中の金属元素分析にも本手法が適応可 能であることを検証しました。

■細胞の培養と試料の準備

125mLの培養フラスコを用いて、CHO細胞を4日間振とう 培養しました(120 rpm)。培養開始直後の培養液を1 mL回収後、24時間ごとに1 mL採取しました。採取した各培養液を遠心分離(5 min, 4 $^{\circ}$)した後、培養上清を別チューブへ分注することで、培養上清試料を準備しました。

図1に細胞の培養と試料準備について手順を示します。

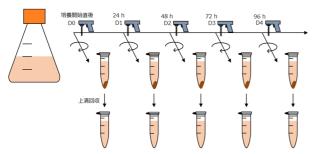


図1 細胞の培養と試料の準備

■装置と分析条件

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ネスアトマイザ(フレーム法と電気加熱法の自動切換えが可能)、およびオートサンプラを用いました。

原子化法に関して、高濃度に培養液に含まれることが既知の元素(Mg, Zn)はフレーム法、それ以外の微量元素(Cu, Mn, Co, Fe)は電気加熱法を用いました。

フレーム法と電気加熱法による測定時の分光器と原子化に関する主な条件を表1と表2に示します。

表1 フレーム法の分析条件

元素	Zn	Mg		
分析波長	213.9 nm 285.2 nm			
スリット幅	0.7 nm			
点灯モード	BGC-D2			
ランプ電流値	8 mA			
フレームタイプ	空気ーアセチレン			
アセチレン流量	2.0 L/min	1.8 L/min		
積分時間	3 s			
繰り返し 測定回数	3回			

表 2 電気加熱法の分析条件

及2 电水/加热/本*/2/2/1/1水门					
元素	Cu	Mn	Со	Fe	
分析波長	324.8 nm	279.5 nm	240.7 nm	248.3 nm	
スリット幅	0.7 nm	0.2 nm	0.2 nm	0.7 nm	
点灯モード	BGC-D2				
ランプ電流値	8 mA	10 mA	12 mA	12 mA	
灰化温度	800℃				
原子化温度	2500°C	2200℃	2300℃	2300℃	
チューブ・タイプ	プラットホーム型チュープ				
試料注入量	5 μL 10 μL				
信号処理	ピーク高さ	ピ−ク面積	ピーク高さ		
繰り返し 測定回数	2回(最大3回)				

■測定方法

各試料:

測定元素ごとに希釈しました。

(硝酸濃度が0.07mol/L (0.5 v/v%)になるように調製)

検量線標準液:

1000 mg/L 標準液を希釈して調製しました。 (硝酸濃度を0.07mol/L (0.5 v/v%)になるように調製)

■測定結果

1) フレーム法

各試料の測定結果を表3に示します。培地のみをDOとし、 培養初日から4日目の上清をD1~D4に略記します。

ZnとMgの検量線と培養上清中濃度の経時変化を図2と3 に示します。

表3 フレーム法の測定結果

		Zn	Mg
希釈倍率			500倍
1	市 秋	20倍	3001百
D0	実濃度(mg/L)*1	5.2	53
	SD*2	0.039	0.29
	%RSD*3	0.74	0.54
D1	実濃度(mg/L)	5.2	50
	SD	0.065	0.08
	%RSD	1.3	0.16
D2	実濃度(mg/L)	4.5	48
	SD	0.072	0.43
	%RSD	1.6	0.90
D3	実濃度(mg/L)	4.3	47
	SD	0.060	0.07
	%RSD	1.4	0.14
D4	実濃度(mg/L)	4.1	53
	SD	0.042	0.21
	%RSD	1.0	0.45

- *1 測定値を細胞培養上清原液に換算した値です。
- *2 繰り返し測定の実濃度(mg/L)の標準偏差
- *3 繰り返し測定の実濃度(mg/L)の相対標準偏差 (%RSD=SD÷実濃度×100)

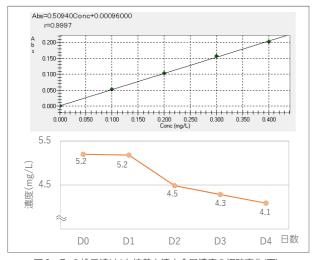


図 2 Znの検量線(上)と培養上清中金属濃度の経時変化(下)

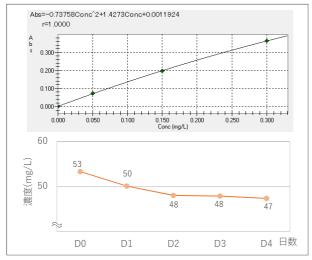


図3 Mgの検量線(上)と培養上清中金属濃度の経時変化(下)

2) 電気加熱法

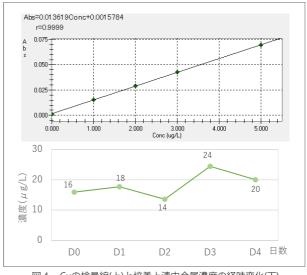
各試料の測定結果と添加回収率を表4に示します。各元素 の検量線と培養上清中濃度の経時変化を図4~7に示します。 添加回収試験は元素ごとに一定濃度の標準液を添加する ことで実施しました。その結果、概ね100±10%以内となり 良好な添加回収率でした。

また、参考として図8に電気加熱法測定時のピークプロ ファイルの抜粋を示します。Mnのピークプロファイルが標 準液と試料溶液で異なることから、試料成分の影響が推察 されます。標準液と試料溶液でピーク形状が異なるため、 Mnのみ信号処理をピーク面積としました。

表 4 電気加熱法の測定結果

		Cu	Mn	Со	Fe
希釈倍率		20倍	20倍	40倍	40倍
D0	実濃度 (μg/L) ^{*1}	16	11	250	409
	SD*2	0.44	0.00	6.4	2.0
	%RSD*3	2.8	0.00	2.6	0.49
	添加回収率*4	120%	101%	97%	102%
	実濃度(μg/L)	18	12	256	420
D1	SD	0.15	0.82	11	1.6
	%RSD	0.83	5.2	4.3	0.38
	添加回収率	98%	86%	93%	102%
	実濃度(μg/L)	14	9	259	387
D2	SD	0.59	0.63	1.5	2.5
	%RSD	4.3	7.1	0.58	0.65
	添加回収率	101%	101%	99%	100%
	実濃度(μg/L)	24	11	258	373
D3	SD	0.00	0.12	12	5.7
	%RSD	0.0	1.1	4.5	1.5
	添加回収率	106%	93%	96%	115%
D4	実濃度(μg/L)	20	17	268	382
	SD	1.5	0.38	11	9.2
	%RSD	7.3	2.2	4.0	2.4
	添加回収率	94%	109%	95%	99%

- *1 測定値を細胞培養上清原液に換算した値です。
- *2 繰り返し測定の実濃度(µg/L)の標準偏差
- *3 繰り返し測定の実濃度(µg/L)の相対標準偏差 (%RSD=SD÷実濃度×100)
- *4 添加回収率=添加試料と無添加試料の濃度差/添加濃度



Cuの検量線(上)と培養上清中金属濃度の経時変化(下)

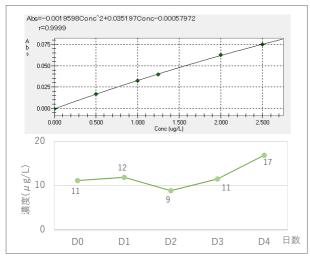


図 5 Mnの検量線(上)と培養上清中金属濃度の経時変化(下)

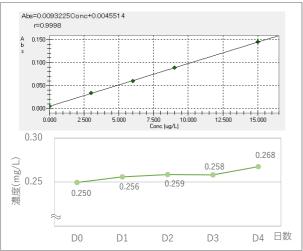


図6 Coの検量線(上)と培養上清中金属濃度の経時変化(下)

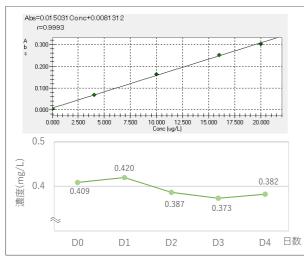


図7 Feの検量線(上)と培養上清中金属濃度の経時変化(下)

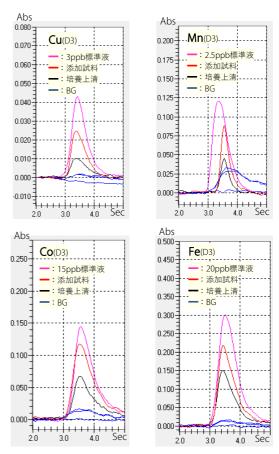


図8 試料測定時のピークプロファイル(抜粋)

■まとめ

原子吸光法(フレーム法・電気加熱法)により、培養上清中の金属元素濃度を測定しました。その結果、培養上清を希釈するだけの簡便な前処理で、数ppb~数10ppmの広い濃度範囲の分析が可能であることが分かりました。

以上より、原子吸光法は培地だけでなく培養上清の分析にも適用可能であることが示されました。微量から高濃度までの広い濃度範囲で、金属元素濃度のモニタリングに使用できます。

■参考文献

- 1) Inn H Yuk et al., "Effects of copper on CHO cells: Insights from gene expression analyses", Biotechnology Progress, 2014
- 2) Prabhu et al., "Zinc supplementation decreases galactosylation of recombinant IgG in CHO cells", Applied Microbiology and Biotechnology, 2018
- 3) アプリケーションニュース A634 原子吸光法による細胞培地中金属元素の直接分析

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・

初版発行:2021年1月

島津コールセンター 🔯 0120-131691