

Application News

No. C106A

LC/MS
Liquid Chromatography Mass Spectrometry

トリプル四重極型 LC/MS/MS を用いた 哺乳動物細胞の培養上清一斉分析

Simultaneous Analysis of Mammalian Cell Culture Supernatant Using Triple Quadrupole LC/MS/MS

発酵による有用物質生産や抗体医薬品の製造において、培養プロセス最適化や培養工程管理に、pH、溶存ガス、炭素源（グルコース）、窒素源（グルタミン）等のモニターが実施されています。細胞培養中の培地成分は上記以外にもビタミンや核酸関連化合物、さらには細胞から分泌される代謝物など様々な化合物から構成されるため、培地に含まれる成分の一斉分析は、より詳細にバイオプロセスを考察する上で有用な情報を与えることが期待されます。そこで、高速トリプ

ル四重極型質量分析計 LCMS-8050 による培地成分および分泌代謝物の一斉分析システム「細胞培養プロファイリングメソッドパッケージ」を開発しました。

ここでは、「細胞培養プロファイリングメソッドパッケージ」を用いて、ハイブリドーマの培養経過に伴う培養上清成分の変化を分析した例をご紹介します。

T. Suzuki

■登録化合物一覧 List of compounds

No.	化合物名	分類	No.	化合物名	分類	No.	化合物名	分類
1	2-Isopropylmalic acid	標準物質	33	N-Acetylaspartic acid	アミノ酸	65	Cytidine	核酸関連
2	Gluconic acid	糖	34	N-Acetylcysteine	アミノ酸	66	Cytidine monophosphate	核酸関連
3	Glucosamine	糖	35	Ornithine	アミノ酸	67	Deoxycytidine	核酸関連
4	Hexose (Glucose)	糖	36	Oxidized glutathione	アミノ酸	68	Guanine	核酸関連
5	Sucrose	糖	37	Phenylalanine	アミノ酸	69	Guanosine	核酸関連
6	Threonic acid	糖	38	Pipecolic acid	アミノ酸	70	Guanosine monophosphate	核酸関連
7	2-Amino adipic acid	アミノ酸	39	Proline	アミノ酸	71	Hypoxanthine	核酸関連
8	4-Aminobutyric acid	アミノ酸	40	Serine	アミノ酸	72	Inosine	核酸関連
9	4-Hydroxyproline	アミノ酸	41	Threonine	アミノ酸	73	Thymidine	核酸関連
10	5-Glutamylcysteine	アミノ酸	42	Tryptophan	アミノ酸	74	Thymine	核酸関連
11	5-Oxoproline	アミノ酸	43	Tyrosine	アミノ酸	75	Uracil	核酸関連
12	Alanine	アミノ酸	44	Valine	アミノ酸	76	Uric acid	核酸関連
13	Alanyl-glutamine	アミノ酸	45	4-Aminobenzoic acid	ビタミン	77	Uridine	核酸関連
14	Arginine	アミノ酸	46	Ascorbic acid	ビタミン	78	Xanthine	核酸関連
15	Asparagine	アミノ酸	47	Ascorbic acid 2-phosphate	ビタミン	79	Xanthosine	核酸関連
16	Aspartic acid	アミノ酸	48	Biotin	ビタミン	80	Penicillin G	抗生物質
17	Citrulline	アミノ酸	49	Choline	ビタミン	81	2-Aminoethanol	その他
18	Cystathionine	アミノ酸	50	Cyanocobalamin	ビタミン	82	2-Ketoisovaleric acid	その他
19	Cysteine	アミノ酸	51	Ergocalciferol	ビタミン	83	3-Methyl-2-oxovaleric acid	その他
20	Cystine	アミノ酸	52	Folic acid	ビタミン	84	4-Hydroxyphenyllactic acid	その他
21	Glutamic acid	アミノ酸	53	Folinic acid	ビタミン	85	Citric acid	その他
22	Glutamine	アミノ酸	54	Lipoic acid	ビタミン	86	Ethylenediamine	その他
23	Glutathione	アミノ酸	55	Niacinamide	ビタミン	87	Fumaric acid	その他
24	Glycine	アミノ酸	56	Nicotinic acid	ビタミン	88	Glyceric acid	その他
25	Glycyl-glutamine	アミノ酸	57	Pantothenic acid	ビタミン	89	Histamine	その他
26	Histidine	アミノ酸	58	Pyridoxal	ビタミン	90	Isocitric acid	その他
27	Isoleucine	アミノ酸	59	Pyridoxine	ビタミン	91	Lactic acid	その他
28	Kynurenine	アミノ酸	60	Riboflavin	ビタミン	92	Malic acid	その他
29	Leucine	アミノ酸	61	Tocopherol acetate	ビタミン	93	O-Phosphoethanolamine	その他
30	Lysine	アミノ酸	62	Adenine	核酸関連	94	Putrescine	その他
31	Methionine	アミノ酸	63	Adenosine	核酸関連	95	Pyruvic acid	その他
32	Methionine sulfoxide	アミノ酸	64	Adenosine monophosphate	核酸関連	96	Succinic acid	その他

HPLC 条件, HPLC Conditions

分析カラム : 逆相カラム
 移動相 A : 0.1 % ギ酸/水
 移動相 B : 0.1 % ギ酸/アセトニトリル
 モード : グラジェント溶出
 流速 : 0.35 mL/min.

MS 条件, MS Conditions (LCMS-8050)

イオン化法 : ESI (Positive/Negative)
 ネブライズガス流量 : 3.0 L/min.
 ドライングガス流量 : 10.0 L/min.
 ヒーティングガス流量 : 10.0 L/min.
 DL 温度 : 250 °C
 ヒートブロック温度 : 400 °C
 インターフェイス温度 : 300 °C

ハイブリドーマをDMEMで5日間培養しました（詳細な培養条件はTable 1に記載）。播種後、24時間毎に培養上清をサンプリングしました。培養上清に分析データ補正のための標準物質として、2-Isopropylmalic acidを加えました。これに、アセトニトリルを添加し除蛋白を行いました。有機

溶媒沈殿後の遠心上清を超純水で適宜希釈したものを試料として、1 μLの注入量にて一斉分析を行いました。細胞の増殖曲線と生存率はFig. 1に、各サンプリング時間における面積比（測定化合物の面積を標準物質の面積値で除した値）をプロットした結果はFig. 2に示しました。

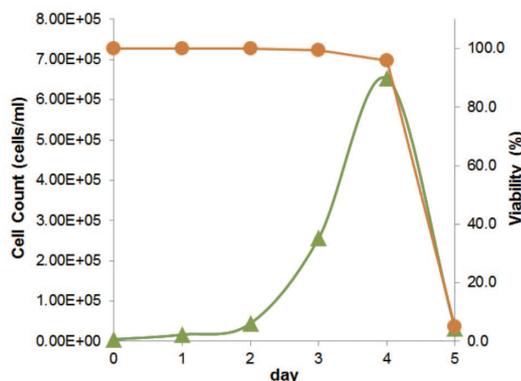


Fig. 1 増殖曲線と生存率
Cell Count and Viability

Table 1 培養条件
Culture Conditions

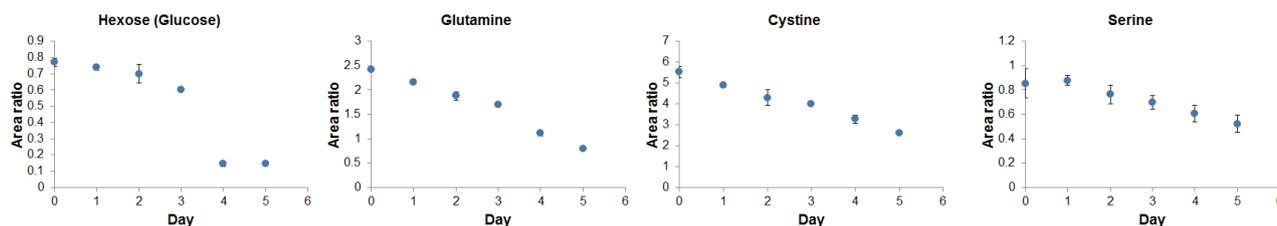
細胞	: SJK-287-38 (ATCC® CRL-1644™)
培地	: DMEM (Low Glucose) + 10 % FBS + Gln, NaHCO ₃
条件	: 37 °C, 5 % CO ₂ , 120 rpm
スケール	: 24 mL (N = 4)

培養上清サンプルおよびデータは極東製薬工業株式会社様よりご提供いただきました。

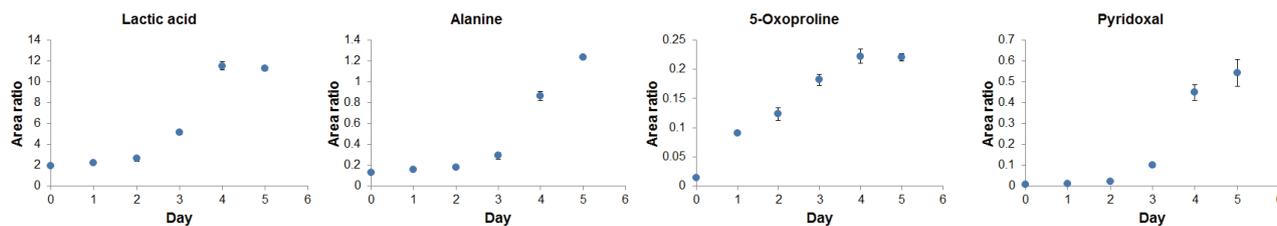
以下に結果の一例を示します。主要な炭素源と窒素源であるグルコースとグルタミンおよびいくつかの amino 酸は、細胞増殖に伴いシグナル強度の減少が認められました (A)。グルコース消費の結果、老廃物として分泌される乳酸は培養時

間経過とともにシグナルが増加しました (B)。乳酸以外にもいくつかの化合物でシグナル強度の増加傾向が認められました (B)。必須 amino 酸といくつかのビタミンについては、培養経過に伴う強度変化はほとんど認められませんでした (C)。

(A) 培養経過に伴いシグナルが減少した化合物の一例



(B) 培養経過に伴いシグナルが増加した化合物の一例



(C) 培養経過に伴うシグナル強度変化が認められない化合物の一例

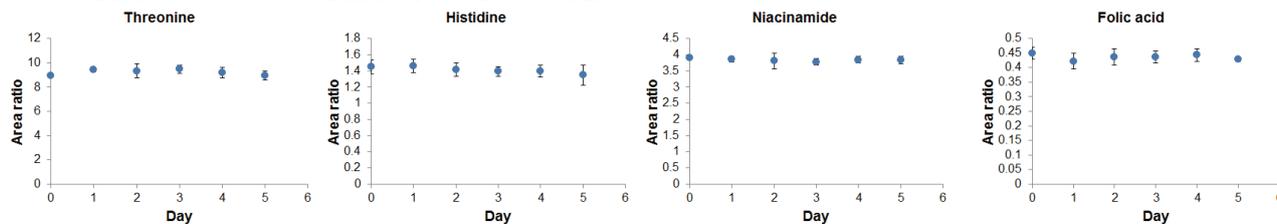


Fig. 2 培養経過に伴う培養上清成分の強度変化
Changes in Culture Supernatant Components During Cultivation with Time

A改訂版発行：2016年7月
初版発行：2015年3月

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

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。