

ICPMS-2030を用いた培地中金属元素の分析

仲 康佑、姜 雨晶、黒田 博隆

ユーザーベネフィット

- ◆ 培地中の金属元素の一斉分析ができます。
- ◆ 培地の分解処理がいらず希釈のみで測定でき、前処理は簡便です。
- ◆ 高マトリックスの培地であっても90~110%の良好な添加回収率が得られ、正確な分析を行うことができます。

■はじめに

培地中の金属元素は細胞に取り込まれて、酵素作用や酸化還元反応に寄与するため、細胞培養における重要な要素であることが報告されています。一方で、金属元素は培地製造工程で原料や設備からコンタミネーションするリスクがあるため、Lot間で金属元素濃度が異なる可能性があります。よって均質な細胞培養の実現には培地中の金属元素濃度プロファイルの把握が重要と考えられます¹⁾。

今回は、必須微量元素を中心とした複数元素を、高感度に多元素一斉分析が可能なICPMS-2030で測定しました。ICP-MSでの測定では、培地に含まれる無機塩類や有機化合物(マトリックス)が干渉やインタフェースの詰まりの要因になり、分析値に影響を与えることが考えられます。本アプリケーションニュースではICPMS-2030を用いた培地中の金属元素分析について、添加回収試験や連続分析の安定性の検証を行いましたので報告します。

■測定元素

微量必須元素を中心に培養細胞の増殖能や産生物の品質に影響することが報告されているCo, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Ni, Se, Znを測定しました。

■試料

① 高マトリックス培地の調製

添加回収試験や連続分析の安定性の検証のため、組成が開示されている培地のうち無機塩類濃度が高い培地の一つであるDMEM (+ 4.5 g/L glucose) に、さらに10 g/Lになるように精製タンパク質を添加して、高マトリックス培地を調製しました。

② その他市販培地

組成は未開示ですが、測定例として各細胞種(CHO細胞、iPS/ES細胞、T細胞、間葉系幹細胞)の培養に使用される代表的な培地を用意しました。

■試料の前処理

① 添加回収試験用サンプル

- 未添加試料
培地を1 v/v %硝酸で20倍希釈し調製しました。
- 添加試料
培地に単元素標準液を添加した後、1 v/v %硝酸で20倍希釈し調製しました。

② 連続分析の安定性検証用サンプル

高マトリックス培地に単元素標準液を各測定元素20 µg/Lになるよう添加し、1 v/v %硝酸で希釈し調製しました。20倍、100倍希釈溶液を用意しました。

■検量線試料の調製

市販の単元素標準液を混合し、1 v/v %硝酸で希釈し検量線試料を調製しました。各検量線試料中に含まれる測定元素の濃度を表1に示します。

表1 検量線試料中の測定元素の濃度

元素	検量線試料 (µg/L)					
	STD0	STD1	STD2	STD3	STD4	STD5
Co	0	1	5	20		
Cu	0	0.5	2.5	10		
Fe	0	5	25	100	1000	2000
Mg	0	500	2500	10000		
Mn	0	1	5	20		
Mo	0	0.1	0.5	2		
Ni	0	0.25	1.25	5		
Se	0	0.25	1.25	5		
Zn	0	10	50	200		

■内標準元素補正

内標準元素としてGa, In, Sc, Yを使用し、内標準自動添加キットを用いて測定しました。

■装置と測定条件

表2に使用装置と測定条件を示します。

表2 ICP-MS分析条件

装置	: ICPMS-2030
高周波出力	: 1.2 kW
プラズマガス流量	: 9.0 L/min
補助ガス流量	: 1.1 L/min
キャリアガス流量	: 0.7 L/min
試料導入	: ネプライザー07 UES
ポンプ回転数	: 20 r.p.m.
チャンバー	: サイクロンチャンバー(電子冷却)
プラズマトーチ	: ミニトーチ
サンプリングコーン/ スキマーコーン	: 銅製
セルガス	: He

■ 高マトリックス培地の添加回収試験

高マトリックス培地の添加回収試験を行いました。結果を表3に示します。90～110 %の添加回収率が得られ、マトリックスによる干渉の影響を大きく受けることなく測定可能なことがわかりました。

■ 高マトリックス培地の安定性試験

高マトリックス培地の20倍、100倍希釈溶液を用いて50回連続分析を行いました。結果を図1～4に示します。

20倍希釈溶液では内標準元素の強度が30 %程度低下し、インターフェースが徐々に詰まり始めている様子が見られます(図1)が、内標準法による分析値の変動は95～107 %に収まりました(図2)。

100倍希釈溶液では内標準元素の強度(図3)、分析値(図4)いずれもほとんど変動が見られませんでした。

■ 各細胞種の培地の測定

つづいて、さまざまな種類の培地測定例として、各細胞種(CHO細胞、iPS/ES細胞、T細胞、間葉系幹細胞)の培養に使用される代表的な培地(組成未開示)について測定し、併せて添加回収試験を行いました(表4)。全ての培地で90～110 %の添加回収率が得られました。

表3 高マトリックス培地の添加回収試験

単位: µg/L

元素	Co	Cu	Fe	Mg	Mn	Mo	Ni	Se	Zn
検出限界	0.006	0.04	0.01	0.08	0.01	0.007	0.008	0.01	0.02
添加濃度	1	0.5	5	500	1	0.1	0.25	0.25	10
未添加試料	0.02	1.27	0.84	940	0.05	0.039	0.103	0.13	1.9
添加試料	1.03	1.72	5.78	1430	1.03	0.148	0.359	0.39	12.0
回収率(%)	101	90	99	98	98	109	102	104	101

回収率 (%) = (添加試料 - 未添加試料) / 添加濃度 × 100
 検出限界 = 3σ (σ : 検量線ブランク溶液の標準偏差)

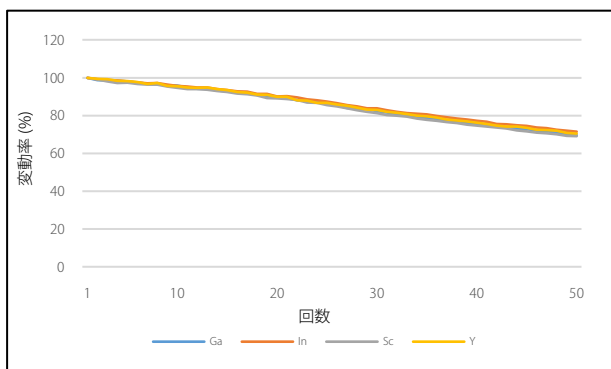


図1 内標準元素強度変動(20倍希釈)

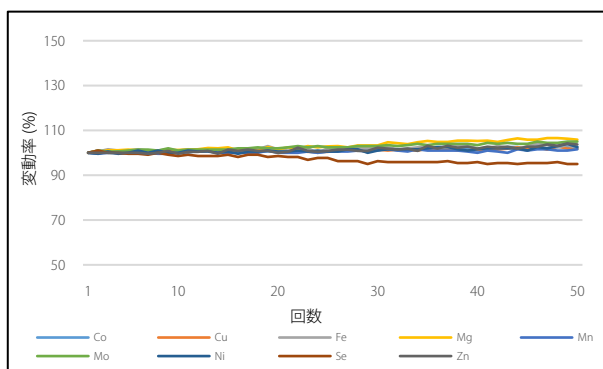


図2 内標準法による分析値変動(20倍希釈)

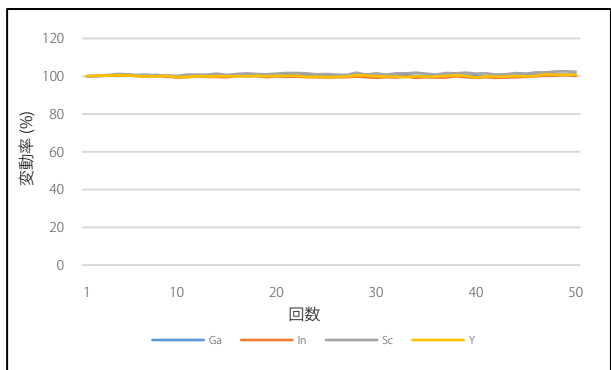


図3 内標準元素強度変動(100倍希釈)

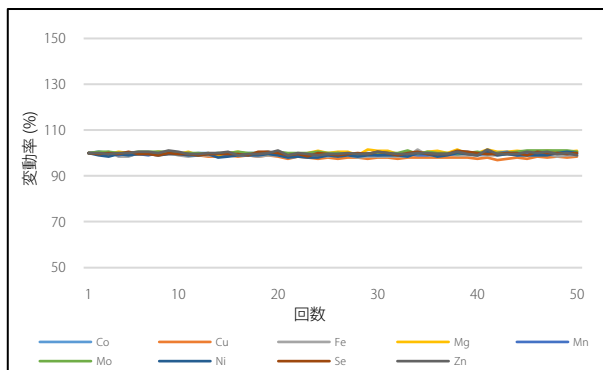


図4 内標準法による分析値変動(100倍希釈)

表4 各細胞種用培地の添加回収試験

単位: µg/L

培地	元素	Co	Cu	Fe	Mg	Mn	Mo	Ni	Se	Zn
	検出下限	0.006	0.04	0.01	0.08	0.01	0.007	0.008	0.01	0.02
CHO細胞用	未添加試料	10.0 (200)	N.D. (N.D.)	880 (17600)	1400 (28000)	1.23 (24.6)	0.010 (0.20)	0.038 (0.76)	0.12 (2.4)	26.8 (536)
	添加試料	14.7	0.52	1880	1900	2.20	0.107	0.296	0.39	36.1
	添加濃度	5	0.5	1000	500	1	0.1	0.25	0.25	10
	回収率 (%)	94	104	100	100	97	97	103	108	93
iPS/ES細胞用	未添加試料	1.20 (24.0)	0.08 (1.6)	3.99 (79.8)	1020 (20400)	0.01 (0.2)	0.015 (0.30)	0.029 (0.58)	0.24 (4.8)	7.7 (154)
	添加試料	2.21	0.57	8.86	1540	0.96	0.113	0.278	0.51	17.6
	添加濃度	1	0.5	5	500	1	0.1	0.25	0.25	10
	回収率 (%)	101	98	97	104	95	98	100	108	99
T細胞用	未添加試料	0.03 (0.6)	0.21 (4.2)	2.26 (45.2)	910 (18200)	0.05 (1.0)	0.025 (0.50)	0.076 (1.52)	0.24 (4.8)	4.5 (90)
	添加試料	1.02	0.69	7.18	1400	1.03	0.127	0.301	0.50	14.6
	添加濃度	1	0.5	5	500	1	0.1	0.25	0.25	10
	回収率 (%)	99	96	98	98	98	102	90	104	101
間葉系幹細胞用	未添加試料	2.00 (40.0)	0.10 (2.0)	0.14 (2.8)	880 (17600)	0.01 (0.2)	0.034 (0.68)	0.054 (1.08)	0.13 (2.6)	0.03 (0.6)
	添加試料	3.01	0.57	5.08	1390	0.97	0.127	0.305	0.38	9.88
	添加濃度	1	0.5	5	500	1	0.1	0.25	0.25	10
	回収率 (%)	101	94	99	102	96	93	100	100	99

回収率 (%) = (添加試料 - 未添加試料) / 添加濃度 × 100

検出限界 = 3σ (σ: 検量線ブランク溶液の標準偏差)

N.D.: 検出限界未満

0内: 培地中に換算した濃度

■ まとめ

本アプリケーションニュースでは、ICPMS-2030を用いて希釈のみの前処理で、培地中金属元素の一斉分析を行いました。

高マトリックス培地の添加回収試験では良好な結果が得られ、培地中のマトリックス濃度が高くても正確な分析が可能であることが分かりました。また、20倍希釈溶液の連続分析では内標準法による分析値の変動は大きくなかったものの、内標準元素の強度の低下が見られました。高マトリックスの培地を長時間連続分析する場合、本アプリケーションニュースで紹介した100倍希釈での分析のように希釈倍率を高めて分析することで分析値がより安定し、インターフェースの洗浄等のメンテナンス頻度を少なくすることができると考えられます。

各細胞種用の代表的な培地の添加回収試験でも、良好な結果が得られ、様々な細胞種の培地で正確な分析が可能であることが分かりました。



ICP質量分析計 ICPMS-2030

■ 関連装置

当社は、培地/培養上清中のアミノ酸・核酸・ビタミン・分泌代謝物といった有機成分の分析ソリューションについてもご提供しております。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では、培地成分および細胞からの分泌代謝物から成る合計125成分を20分以内で一斉分析可能です。

アプリケーションニュース C209 では、本手法を用いた培地/培養上清の分析例をご紹介します。



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

<参考文献>

- 1) Ryan J. Graham et al., "Consequences of trace metal variability and supplementation on Chinese hamster ovary (CHO) cell culture performance : A review of key mechanism and considerations", Biotechnology and Bioengineering, 2019