SHIMADZU
Excellence in Science

Application News

ICP質量分析計　ICPMS-2030

ICPMS-2030を用いたCHO細胞の培地／培養上清中金属元素のモニタリング

仲 康佑、姜 雨晶、黒田 博隆

ユーザーベネフィット

◆ 培地や培養上清中の金属元素の経時変化を一斉にモニタリングできます。
◆ 培地や培養上清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。

■はじめに

抗体医薬品の原薬は、主にチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞を培養することにより産生されます。培養細胞の代謝や産生抗体の品質は、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細胞の乳酸代謝様式が変化すること[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)]が知られています。そのため、抗体医薬品の品質を一定に保つ上では、培地／培養上清を測定して、複数の金属元素濃度の経時変化を一斉にモニタリングすることが重要と考えられます。

アプリケーションニュースA634[3)], A651[4)]では原子吸光分光法を用いた培地／培養上清の測定例を示しました。一方、微量元素や多元素の一斉モニタリングにおいてはICP-MSが適すると考えられます。そこで、アプリケーションニュース 01-00372[5)]では、ICP-MSの培地／培養上清分析への適用を検討するため、培地をICPMS-2030で測定し、添加回収率や再現性を評価した結果を報告しました。

本アプリケーションニュースでは、CHO細胞の培地／培養上清を希釈して、ICPMS-2030で金属元素をモニタリングした例を紹介します。

■試料

抗体産生のため遺伝子導入されたCHO細胞は、染色体数や導入位置の違いによりクローニング後も細胞増殖能や抗体産生能にバリエーションが生じることが知られています。

今回は、限界希釈により得られたクローンをサブクローニングすることで、２種類の異なる細胞株を取得し、一日おきに培養上清を回収しました(図 1)。なお、培養には共通の培地を使用し、未使用培地をDay0としました。

回収した培地と培養上清は、1 v/v %硝酸で20倍希釈し、分析試料としました。

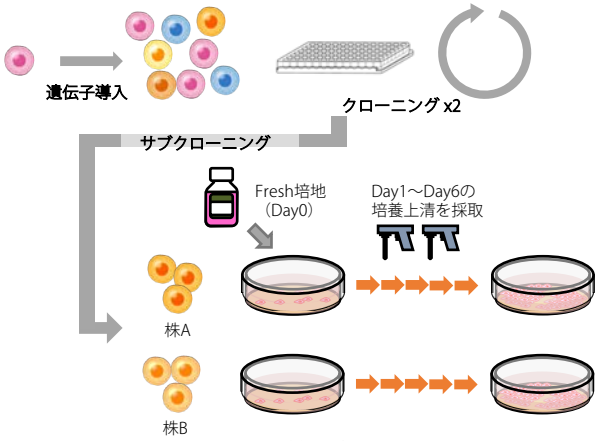


図 1　試料の概要

■測定元素

CHO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元素を中心にCo, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Ni, Se, Znの9元素を測定対象の元素としました。

■検量線試料

市販の単元素標準液を混合し、 1 v/v %硝酸で希釈することで検量線試料を作製しました。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濃度

元素	検量線試料(μg/L)			
	STD 0	STD 1	STD 2	STD 3
Co	0	10	50	100
Cu	0	0.5	2.5	5
Fe	0	100	500	1000
Mg	0	500	2500	5000
Mn	0	0.2	1	2
Mo	0	0.1	0.5	1
Ni	0	0.1	0.5	1
Se	0	0.2	1	2
Zn	0	20	100	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	:	ネブライザー07 UES
ポンプ回転数	:	20 r.p.m.
チャンバー	:	電子冷却サイクロンチャンバー
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

■ 添加回収試験

培養の前期(Day 1)、中期(Day 3)、後期(Day 6)の細胞株Aを使用して、マトリックスの干渉を受けていないか確認するために添加回収試験を行いました。結果と定量下限を表 3に示します。測定値は培養上清中の濃度に換算しています。すべての試料で添加回収率が±20%以内となり、干渉を受けていないことが確認できました。また、測定値は定量下限より十分高く、ICPMS-2030が培地／培養上清中の金属元素をモニタリングするのに十分な感度を有していることが分かります。

■ 分析結果

培地／培養上清中の各元素濃度の経時変化を図 2に示します。

Co, Cu, Fe, Mg, Se, Zn には細胞株間で差がほとんど見られなかった一方で、Mn, Mo, Ni にはある培養日数において1.5倍以上の違いが認められました。

表 3　添加回収試験の測定結果

単位：μg/L

	元素	Co	Cu	Fe	Mg	Mn	Mo	Ni	Se	Zn
試料	定量下限	2	2	0.8	10	0.6	0.2	0.6	0.8	1
	添加濃度	200	10	2000	10000	4	2	2	4	400
D1	未添加試料	366	13.6	2780	14600	5.2	1.22	1.0	5.4	880
	添加試料	568	24.0	4760	24400	9.2	3.18	3.0	10.2	1280
	添加回収率 (%)	101	104	99	98	100	98	100	120	100
D3	未添加試料	380	14.6	2880	15000	8.2	4.68	1.0	5.6	910
	添加試料	578	25.0	4860	25000	11.8	6.86	3.2	10.0	1300
	添加回収率 (%)	99	104	99	100	90	109	110	110	98
D6	未添加試料	430	13.6	3140	16300	6.2	0.90	1.2	4.8	950
	添加試料	618	23.0	5060	26000	10.2	2.96	3.2	8.8	1320
	添加回収率 (%)	94	94	96	97	100	103	100	100	93

＊定量下限 (培地／培養上清中換算) = 10σ x 希釈率 (σ : 検量線ブランク溶液の標準偏差)
＊添加回収率 (%) = (添加試料 - 未添加試料) / 添加濃度 × 100

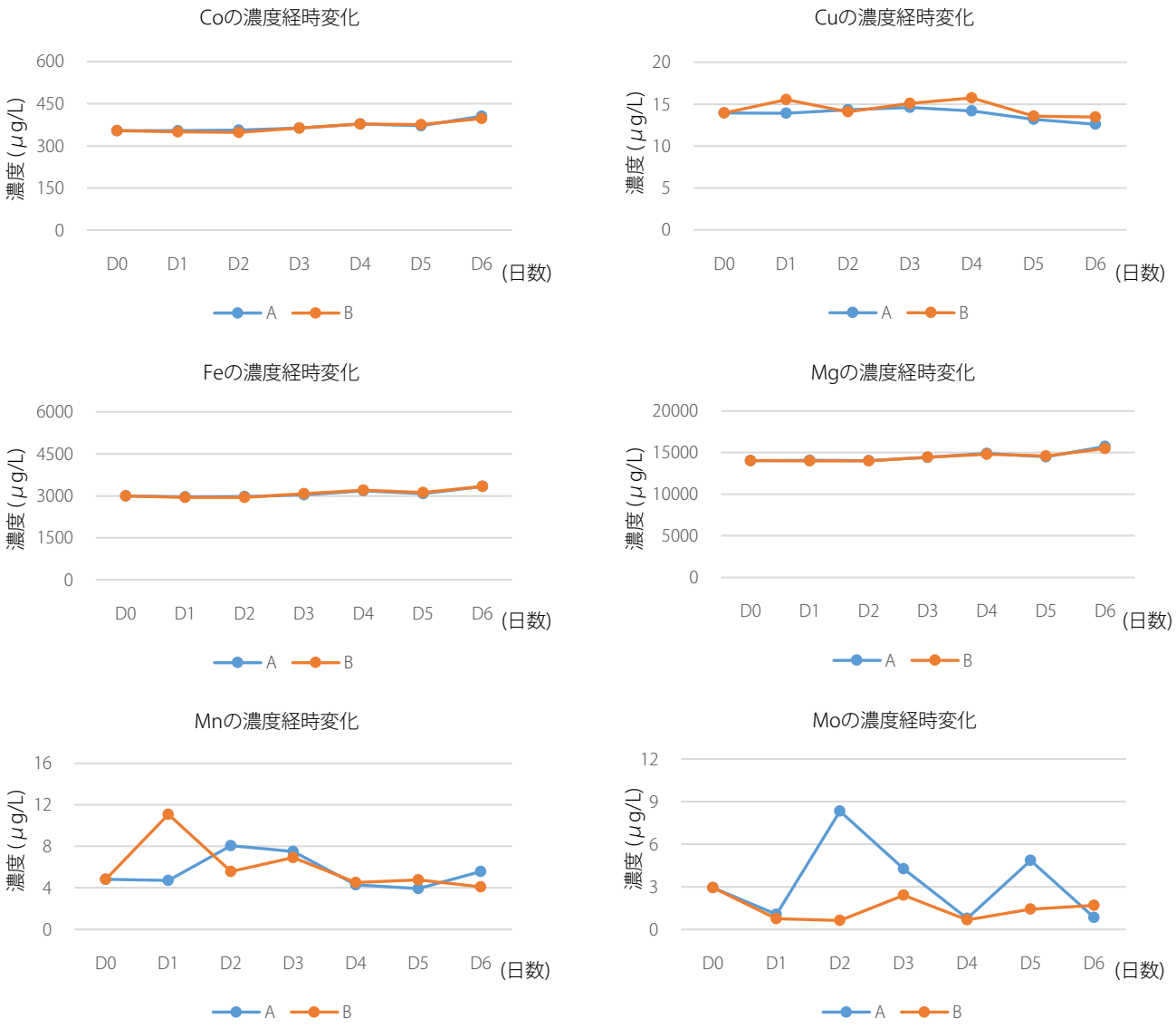
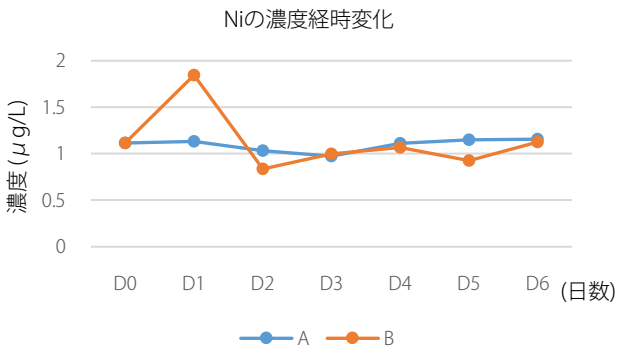
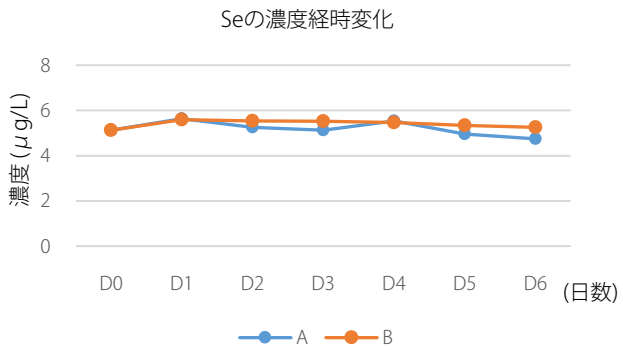


図 2　CHO培養上清の測定結果 (原液中の濃度に換算)





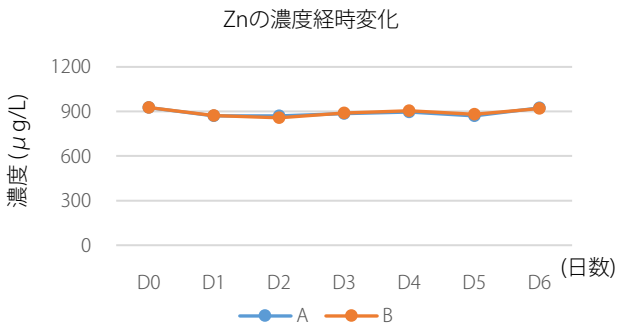


図２　CHO培養上清の測定結果（原液中の濃度に換算）（続き）

■まとめ

CHO細胞の培地／培養上清を希釈してICPMS-2030で測定し、細胞増殖能や抗体産生能に影響すると報告のある金属元素を中心にモニタリングした例を報告しました。今回の結果のように多元素のモニタリングは、条件間で特徴的な指標を見出すことに役立つと考えられます。

【謝辞】
本測定を行うにあたり、試料をご提供いただいた大阪大学大学院 工学研究科 生物工学専攻 生物化学工学領域の皆様に感謝いたします。

■関連製品

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

<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
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」
4) アプリケーションニュース A651 「原子吸光分光光度計を用いた細胞培養上清中金属元素モニタリング」
5) アプリケーションニュース 01-0372 「ICPMS-2030を用いた培地中金属元素の分析」

株式会社 島津製作所

01-00374-JP　初版発行：2022年 8月

島津コールセンター　0120-131691

本文中に記載されている会社名および製品名は、各社の商標および登録商標です。
本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。

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。

最新版は、島津製作所>分析計測機器の以下のサイトより閲覧できます。
https://www.an.shimadzu.co.jp/apl/index.htm
会員制情報サービス Shim-Solutions Club にご登録いただきますと、毎月の最新情報をメールでご案内します。
新規登録は、https://solutions.shimadzu.co.jp/ よりお願いします。

© Shimadzu Corporation, 2022