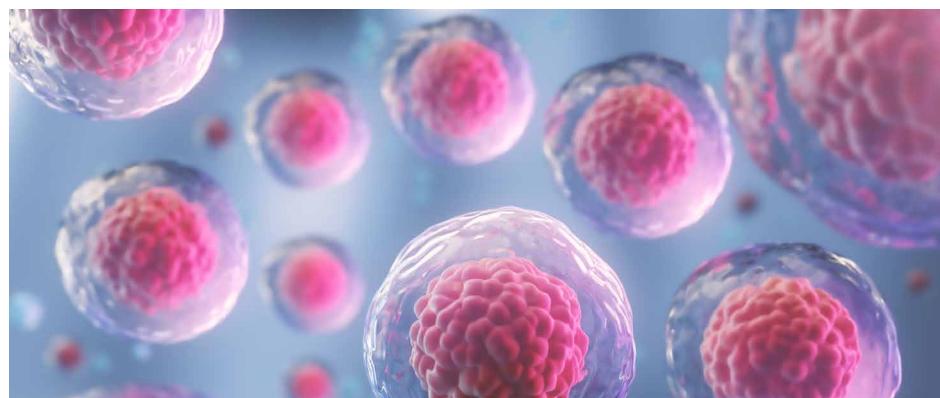


ICP-MS による既知組成細胞培地の元素分析

Agilent 7900 ICP-MS を用いた細胞培地の開発、最適化、
製造、および品質管理用の多元素分析用メソッド



著者

Yulan Bian and Aimei Zou
Agilent Technologies, Inc.

はじめに

細胞培地は、バイオ医薬品、ワクチン、および細胞・幹細胞治療などの複雑な治療法（モダリティ）の製造に用いられる主要な技術です。管理された人工的な環境（通常はバイオリアクタ）で細胞を培養して、ターゲット製品を製造します。適切な培地（天然または合成）を選択することは、この *in vitro* プロセスにおける最も重要なステップのうちの 1 つです。一般に、細胞培地は、アミノ酸、ビタミン、無機塩、炭水化物、脂質、成長因子などで構成されています。天然培地のロット間のばらつき、および天然培地の微生物とウイルスによる汚染に対する懸念により、血清フリーの既知組成細胞培地（CDM）が大いに注目されています。CDM は、バッチごとに処方された濃度の既知培地原材料から生成されています（1）。

無機塩を CDM に追加することにより、その pH と浸透圧の平衡を維持します。さらに重要なのは、金属イオンは不可欠な酵素補因子で、細胞シグナル伝達パスウェイに関与しており、細胞の生物学的プロセスを規制しているということです。例えば、亜鉛、銅、およびマンガンはモノクローナル抗体のグリコシル化に影響を与え（2）、亜鉛には細胞アポトーシス抑制因子としての働きがあります（3）。そのため、CDM 中の金属イオンの一貫性のある組成は、医薬品の歩留まり、品質、および性能にとって非常に重要です。

既知組成の製剤を使用しているにもかかわらず、原材料の供給元が異なること、容器材料から金属が溶出していること、または製造時の汚染等により、CDM の元素含有量が製造バッチ間で変動する場合があります。医薬品の品質と安全性を保証するために、米国薬局方（USP）や医薬品規制調和国際会議（ICH）のような規制機関がガイドラインを公開しています。これらのガイドラインでは、患者がさらされる可能性のある元素不純物などの汚染物の最大濃度を規定しています。ただし、現時点において、CDM 中の元素の品質および安全性を管理するための規制、ガイドライン、および標準メソッドは存在しません。CDM が複雑なバイオ医薬品モダリティで使用されるようになるにつれて、金属の濃度および製品の歩留まりと安全性に対して与える影響への理解を深める必要性が増大する可能性があります。

CDM 中の元素を同定して定量するために、Agilent 7900 ICP-MS を使用した多元素分析メソッドを開発しました。ダルベッコ変法イーグル培地（DMEM）および Ham's F-12 培地という 2 種類の血清フリー培地を選択しました。Ham's F-12 は、基本培地である DMEM とは異なり、鉄、コバルト、亜鉛が添加されていることが知られています。ロット、ブランド、種類が異なる培地の比較分析を実施しました。この実験では、CDM サンプルの分析における Agilent 7900 ICP-MS の感度、安定性、および使いやすさという特長に注目しています。メソッドは、培地組成の開発と最適化および CDM の品質監視に最適です。

実験方法

サンプル前処理

3 つの異なるロットの DMEM は 2 社のメーカーから購入しました（メーカー A および B と表記）。別の單一ロットの Ham's F-12 培地はメーカー A から入手しました。微量金属グレードの硝酸（純度 $\geq 99.999\%$ ）は Sigma Aldrich から購入しました。Milli-Q 純水装置で生成した抵抗 18.2 M Ω の超純水（UPW）を使用して、サンプルと標準を調製しました。

サンプルは、2 % HNO₃ で 10 倍に希釈して調製しました。各サンプル 5 g を 50 mL Falcon チューブに入れて、2 % HNO₃ で 50 g に希釈しました。

装置構成

分析には、ORS⁴ コリジョン/リアクションセル（CRC）を搭載した Agilent 7900 ICP-MS を使用しました。ORS⁴ をヘリウム（He）モードで操作し、運動エネルギー弁別（KED）を使用して、すべての分析対象イオンでの一般的な多原子イオン干渉を除去しています。KED を使用して、高および低エネルギーの多原子イオンを選択的に除去することにより、分析対象イオンを高速に検出できると同時に、測定の精度が大幅に向上します（4）。

標準の ICP-MS サンプル導入システムを使用しました。このシステムは、ニッケル製サンプリング/スキマコーン、MicroMist ガラス製同軸ネブライザ、石英製スプレーチャンバ（2 °C に冷却）、および内径 2.5 mm インジェクタ付き石英製トーチで構成しました。89 ラックの Agilent I-AS オートサンプラーを使用して、サンプルを Agilent 7900 ICP-MS に導入しました。Agilent ICP-MS MassHunter ソフトウェアにおいて、汎用アプリケーション向けのプリセットメソッドを選択しました。プリセットメソッドは、アプリケーションに必要なプラズマ条件とその他の分析パラメータを自動的に設定するため、メソッド作成が簡素化されます。表 1 の影付きの行のパラメータはソフトウェアにより自動的に設定されており、レンズ電圧はすべての元素で一度だけオートチューンされました。

表 1. Agilent 7900 ICP-MS の使用条件。影付きのパラメータは、ICP-MS MassHunter で汎用プリセットメソッドを選択することにより、自動的に設定しました。

パラメータ	設定値
セルモード	ヘリウム
RF 出力 (W)	1550
スプレーチャンバ温度 (°C)	2
サンプリング深さ (mm)	10
キャリアガス流量 (L/min)	1.08
引き出し 1 (V)	0.0
引き出し 2 (V)	-170.0
オメガバイアス (V)	-90
オメガレンズ (V)	10.6
偏向レンズ (V)	2.0
He ガス流量 (mL/min)	5.0
KED (V)	5.0

結果と考察

検量線、品質管理、および内部標準

Agilent 多元素標準溶液 (p/n 5183-4688) および单一ストロンチウム標準 (p/n 5190-8581) を使用して、中間作業標準と標準溶液を調製しました。内部標準 (ISTD) 溶液は、ICP-MS 用 Agilent 内部標準原液 (p/n 5188-6525) から調製しました。標準オンライン ISTD キットを使用して、ISTD をサンプルに添加しました。

標準溶液を、サンプル溶液とマトリックスを一致させるため 2 % HNO₃ で調製しました。主要元素の検量線範囲は、0、0.005、0.01、0.05、0.25、1、5、20、40 ppm に調製しました。また、微量元素の検量線範囲は、0、0.05、0.1、0.5、2.5、10、50、200、400 ppb に調製しました。主要元素および微量元素の品質管理 (QC) 標準を、それぞれ 10 ppm と 100 ppb に調製しました。ISTD 標準も、2 % HNO₃ で 100 ppb に調製しました。主要元素と微量元素の代表的な検量線を図 1 に示しています。

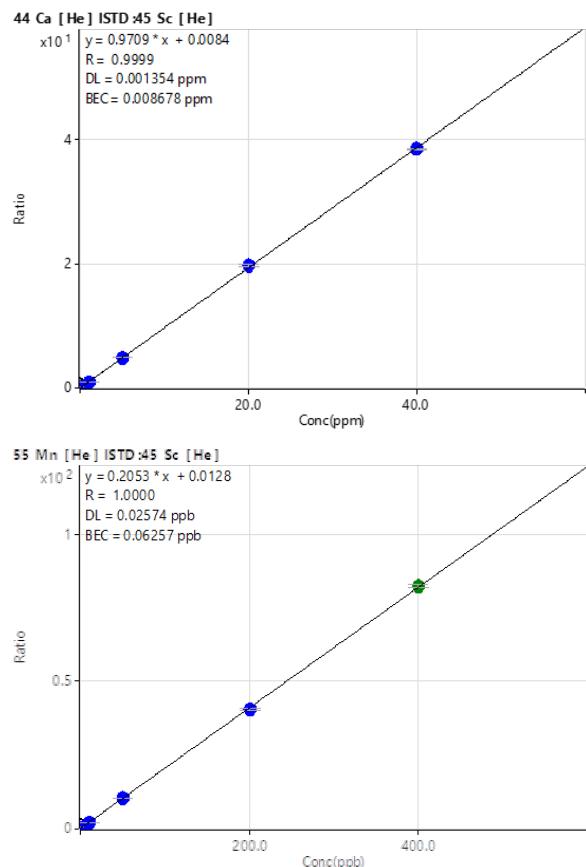


図 1. 主要元素 Ca および微量元素 Mn の代表的な検量線

分析シーケンス

最初に標準溶液を分析し、その後一連のキャリブレーションブランクおよび初期キャリブレーション確認 (ICV) 溶液を分析しました。このサンプルブロックを繰り返して分析し、その後標準溶液を添加したサンプルブロックを分析しました。10 サンプルごとに、継続的キャリブレーション確認 (CCV) サンプルを分析しました。

ICP-MS MassHunter キャリブレーション値から算出した代表的な Agilent 7900 ICP-MS の検出限界 (DL) を表 2 に示します。直線性については、検量線範囲にわたるすべての元素において、良好な直線性 (> 0.999) を達成しました。Agilent 7900 のダイナミックレンジは広いため、主要元素と微量元素を 1 回の分析で測定できます。

表 2. 検出限界と直線性

元素	同位体	単位	DL	R
Mg	24	ppm	0.0002	0.9998
K	39	ppm	0.0023	0.9999
Ca	44	ppm	0.0013	0.9999
Fe	56	ppm	0.0001	0.9998
Al	27	ppb	0.3416	1.0000
V	51	ppb	0.0013	0.9998
Cr	52	ppb	0.0804	0.9997
Mn	55	ppb	0.0257	1.0000
Co	59	ppb	0.0028	0.9998
Ni	60	ppb	0.1056	0.9999
Cu	63	ppb	0.0028	0.9998
Zn	66	ppb	0.0593	0.9999
As	75	ppb	0.0036	0.9999
Se	78	ppb	0.0969	1.0000
Sr	88	ppb	0.0096	0.9998
Cd	114	ppb	0.0004	0.9999
Sb	121	ppb	0.0021	1.0000
Ba	137	ppb	0.0065	1.0000
Tl	205	ppb	0.0003	1.0000
*Pb	208	ppb	0.0005	1.0000

* Pb は通常、最も豊富な 206、207、208 の 3 種類の同位体の合計により報告されています。

添加回収率

CDM 用の認証標準物質が入手できなかったため、サンプルマトリックスを添加して回収率を測定することにより、メソッドの精度を評価しました。メーカー A の DMEM サンプル（ロット 2）および Ham's F-12 サンプルに、微量元素は 5 ppb を添加し、主要元素は 5 ppm を添加しました。添加された細胞培地サンプル中のすべての元素の平均添加回収率の結果は、95 ~ 115 % でした（表 3）。添加回収率データは優れており、CDM 中の主要元素および微量元素の分析における Agilent 7900 ICP-MS 定量メソッドの精度を実証しています。

表 3. DMEM A2 および Ham's F-12 の平均添加回収率の結果 (n = 2)

元素	単位	添加濃度	DMEM A2			Ham's F-12		
			サンプルの測定濃度	標準溶液を添加したサンプルの測定濃度	回収率 (%)	サンプルの測定濃度	標準溶液を添加したサンプルの測定濃度	回収率 (%)
Mg	ppm	5	1.97	7.10	103	1.42	6.57	103
K	ppm	5	22.30	27.90	112	12.68	17.85	103
Ca	ppm	5	6.77	12.27	110	1.21	6.57	107
Fe	ppm	5	< DL	5.29	106	0.01	5.28	105
Al	ppb	5	< DL	5.52	110	< DL	5.06	101
V	ppb	5	0.04	5.25	104	0.01	5.14	103
Cr	ppb	5	< DL	5.15	103	< DL	5.13	103
Mn	ppb	5	0.19	5.31	102	< DL	5.17	103
Co	ppb	5	< DL	5.27	105	4.18	8.91	95
Ni	ppb	5	< DL	4.87	97	< DL	4.86	97
Cu	ppb	5	< DL	5.26	105	0.07	5.32	105
Zn	ppb	5	< DL	5.58	112	19.58	25.33	115
As	ppb	5	< DL	5.60	112	< DL	5.47	109
Se	ppb	5	< DL	5.72	114	< DL	5.48	110
Sr	ppb	5	1.94	6.97	101	0.37	5.49	102
Cd	ppb	5	< DL	4.99	100	< DL	4.98	100
Sb	ppb	5	0.03	5.20	103	0.02	5.15	103
Ba	ppb	5	0.29	5.57	106	0.08	5.37	106
Tl	ppb	5	< DL	5.44	109	< DL	5.42	108
Pb	ppb	5	0.02	5.40	108	< DL	5.40	108

長期安定性試験

図 2 に、8 時間の分析シーケンス全体における ISTD シグナルの安定性を示します。すべてのサンプルの ISTD 回収率は、キャリブレーションブランク標準の値の 80 ~ 120 % 以内でした。標準溶液の中間点を、CCV 標準として使用しました。

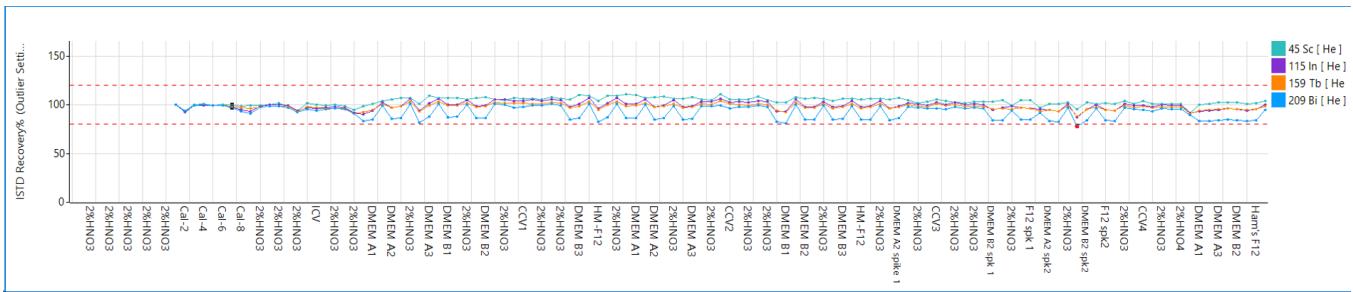


図 2.8 時間にわたり Agilent 7900 ICP-MS で測定した ISTD シグナルの安定性。赤色の点線は $\pm 20\%$ を示しています。

図3に示すように、8時間にわたるすべての元素のCCVの回収率は±10%以内でした。両方の回収率の結果は、長時間の分析にわたる細胞培地サンプルの分析における、Agilent 7900 ICP-MSの長期堅牢性と高いマトリックス耐性および適合性を実証しています。

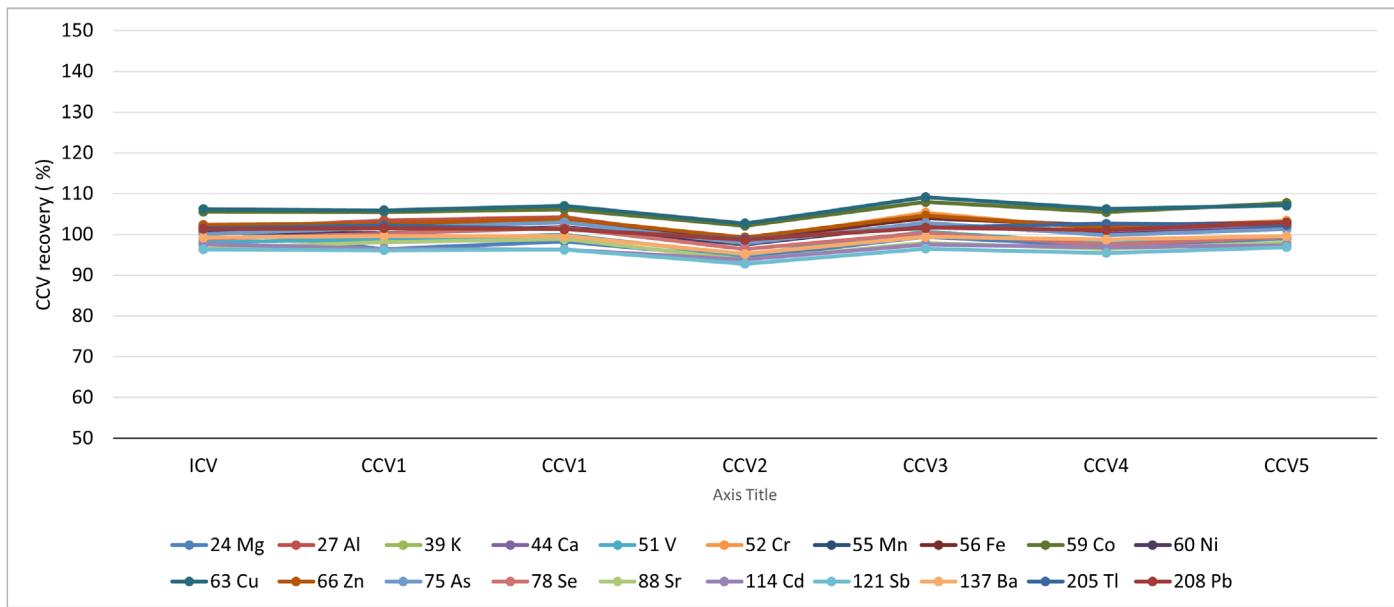


図 3. 8 時間の分析にわたるすべての元素の CCV 回収率

サンプルの定量結果

DMEM および Ham' s F-12 サンプル中のすべての元素の定量結果（希釈係数で補正）を表 4 に示します。検出されなかった元素については DL が報告されています。

表 4. 2 つのブランドの 3 ロットの DMEM および Ham's F-12 の平均定量結果 (n = 4)

元素	単位	DMEM						HAM's F-12	
		ブランド A			ブランド B				
		ロット 1	ロット 2	ロット 3	ロット 1	ロット 2	ロット 3		
Mg	ppm	19.33 ± 0.72	19.75 ± 0.13	20.00 ± 0.76	17.3 ± 0.41	17.79 ± 0.09	18.58 ± 0.30	14.23 ± 0.31	
K	ppm	220.18 ± 2.62	223.00 ± 1.25	222.98 ± 1.25	223.31 ± 5.38	218.29 ± 1.15	220.56 ± 2.46	126.88 ± 3.23	
Ca	ppm	70.25 ± 0.99	67.70 ± 0.30	68.35 ± 2.61	65.40 ± 1.25	66.47 ± 0.26	69.27 ± 0.65	12.06 ± 0.29	
Fe	ppm	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.12 ± 0.003	
Al	ppb	< 3.41	< 3.41	< 3.41	< 3.41	< 3.41	< 3.41	< 3.41	
V	ppb	0.20 ± 0.01	0.35 ± 0.01	0.34 ± 0.02	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.02	0.09 ± 0.01	0.13 ± 0.01	
Cr	ppb	< 0.80	< 0.80	< 0.80	< 0.80	< 0.80	< 0.80	< 0.80	
Mn	ppb	< 0.25	1.93 ± 0.08	3.36 ± 0.17	1.64 ± 0.09	1.98 ± 0.09	3.16 ± 0.07	< 0.25	
Co	ppb	< 0.03	< 0.03	< 0.03	< 0.03	< 0.03	< 0.03	41.81 ± 4.23	
Ni	ppb	< 1.05	< 1.05	< 1.05	< 1.05	< 1.05	< 1.05	< 1.05	
Cu	ppb	< 0.03	< 0.03	< 0.30	0.76 ± 0.09	< 0.030	< 0.030	0.74 ± 0.001	
Zn	ppb	< 0.59	< 0.59	< 0.59	21.64 ± 1.01	21.07 ± 0.33	23.28 ± 0.54	195.83 ± 1.74	
As	ppb	0.20 ± 0.03	0.23 ± 0.02	0.25 ± 0.01	< 0.03	< 0.03	< 0.03	< 0.03	
Se	ppb	< 0.96	< 0.96	< 0.96	< 0.96	< 0.96	< 0.96	< 0.96	
Sr	ppb	30.97 ± 0.69	19.36 ± 0.26	21.01 ± 0.86	21.85 ± 0.8	21.62 ± 0.24	23.61 ± 0.22	3.69 ± 0.06	
Cd	ppb	< 0.004	< 0.004	< 0.004	0.05 ± 0.002	0.05 ± 0.002	0.04 ± 0.004	< 0.004	
Sb	ppb	0.21 ± 0.01	0.29 ± 0.02	0.33 ± 0.01	0.21 ± 0.02	0.20 ± 0.02	0.26 ± 0.02	0.21 ± 0.01	
Ba	ppb	3.02 ± 0.05	2.93 ± 0.07	3.07 ± 0.05	0.91 ± 0.06	0.89 ± 0.03	0.57 ± 0.08	0.76 ± 0.05	
Tl	ppb	< 0.003	< 0.003	< 0.003	< 0.003	< 0.003	< 0.003	< 0.003	
Pb	ppb	0.10 ± 0.03	0.16 ± 0.008	0.22 ± 0.005	0.20 ± 0.005	0.28 ± 0.005	0.18 ± 0.008	< 0.005	

細胞培地中の主要元素

表 4 の結果は、2 つのブランドの DMEM 中の主要元素の濃度プロファイルが類似していることを示しています。ロット間の結果を見てみると、DMEM 中の主要元素の濃度には一貫性があり、同じブランドのロット間のばらつきは < 4 % でした。図 4 に示すように、ブランド A はブランド B と比較して、ロット間の一貫性が多少良好なように見えます。主要元素を緩衝塩の形で培地に追加して、その pH と浸透圧を維持しています。ロット間で培地の pH と浸透圧の一貫性を維持することは、細胞が成長するための安定した細胞培地環境を生成するための基本的な要素です。

種類が異なる培地を比較してみると、DMEM と Ham's F-12 の主要元素のプロファイル間に明らかな違いが認められます。データが示すように、Ham's F-12 には Fe が添加されているのに対して、DMEM では Fe は検出されませんでした。Ham's F-12 では DMEM と比較して、K と Ca の濃度が非常に低くなっています。この違いは、それぞれの培地の固有の使用法によるものであると考えられます。DMEM は汎用の基本培地であるのに対して、Ham's F-12 は元々チャイニーズハムスター卵巣と肺細胞のクローニング用途で開発されており、イオン性が低い環境の場合にメリットがあります。

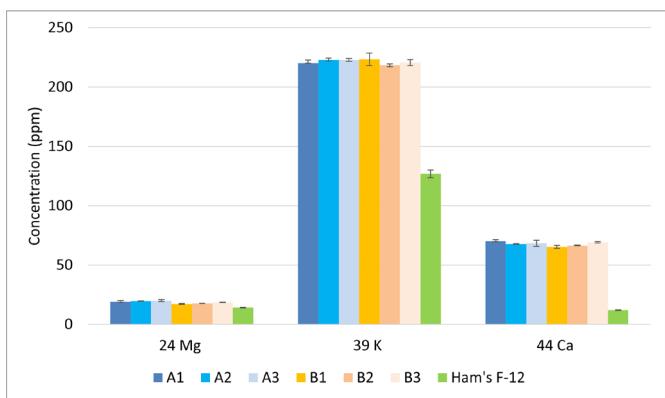


図 4. すべての細胞培地サンプル中の Mg、K、および Ca の比較。A1、A2、および A3 は、メーカー A の DMEM のロットを表しています。B1、B2、および B3 は、メーカー B の DMEM のロットを表しています。

細胞培地中の微量元素

図 5 に示すように、2 つのブランドの DMEM 間の最も顕著な違いは、ブランド B には Zn が存在しているが、ブランド A には存在していないという点です。文献によると、Zn は重要な細胞生化学プロセスに関係しています (3)。ブランド B の DMEM サンプル中の Zn の濃度は、Zn を添加すると培地の性能が向上したことを示しています。幹細胞生成に対応している Sr (5) は、すべての DMEM サンプルで類似した濃度で検出されていました。

2 種類の細胞培地中の Co、Zn、および Sr の濃度には明確な違いが認められました (図 5)。Co および Zn は、CHO 細胞およびその他のがん細胞の成長を促進するための無機栄養素として使用されているため、Ham's F-12 中のこれらの元素の濃度は比較的高いと予想されました。Ham's F-12 では Sr も検出されましたが、DMEM と比較して低い濃度でした。

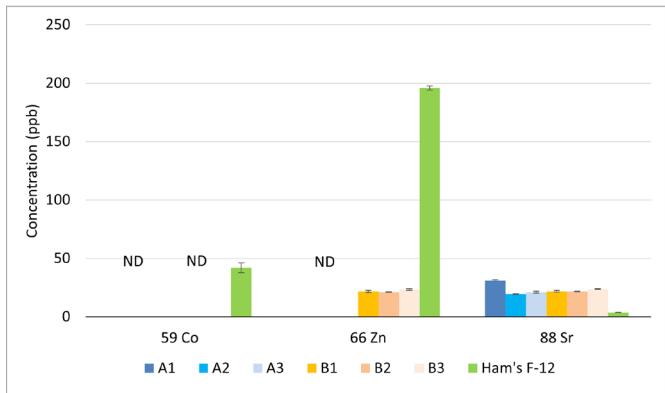


図 5. DMEM および Ham's F-12 細胞培地サンプル中の Co、Zn、および Sr の比較。ND = 不検出を意味しており、濃度が DL よりも低い場合です。

V、Mn、As、Cd、Sb、Ba、Pb のように低 ppb または ppb 未満の濃度で検出されたその他の元素は、培地を調製するのに使用された原材料から混入した不純物である可能性があります。DMEM 中のこれらの元素の濃度をロット間で比較してみたところ、ある程度の一貫性が認められました。例えば、3 ロットのブランド A の DMEM において、As と Ba がそれぞれ約 0.2 および 3.0 ppb で検出されていました。多数のロットから十分なデータが採取できれば、統計的信頼度に基づいて微量元素の参照プロファイルを作成し、細胞培地の QC の基準として機能させることができます。

IntelliQuant で得られた半定量データ

ICP-MS MassHunter のプリセットメソッドはスキャンを選択している限り、IntelliQuant Quick Scan 取り込みを He モードで使用して、サンプルのフル質量スペクトルデータを自動的に取り込むことができます (6)。IntelliQuant では特別な設定も検量線も必要ないため、分析が簡略化されます。IntelliQuant は、わずか 2 秒の追加測定時間ですべてのサンプルのフル質量スペクトルデータを自動的に取り込むことができ、分析者はサンプル中に存在する元素を即座に確認できます。IntelliQuant データは He モードで取り込まれるため、分析対象成分で一般的な多原子イオン干渉を発生させずに、データの品質を保証できます。

この実験では、細胞培地サンプルごとに IntelliQuant データを取り込みました。図 6 に示すように、このデータは周期表ヒートマップとして表示できます。元素の色の濃さは測定濃度値を表しており、色が濃いほど濃度が高いことを示しています。Na、K、P、S、Cl などの元素は定量メソッドに含まれていませんでしたが、IntelliQuant により DMEM 中で同定されて半定量されました。分析者は IntelliQuant データを使用して、サンプル間のばらつきを即座に確認し、サンプル中に存在する元素を同定できます。HAM's F-12 では DMEM B3 と比較して Fe、Co、Cu、および Zn が高濃度で検出されました (図 6)、これは定量結果と一致していました (表 4)。

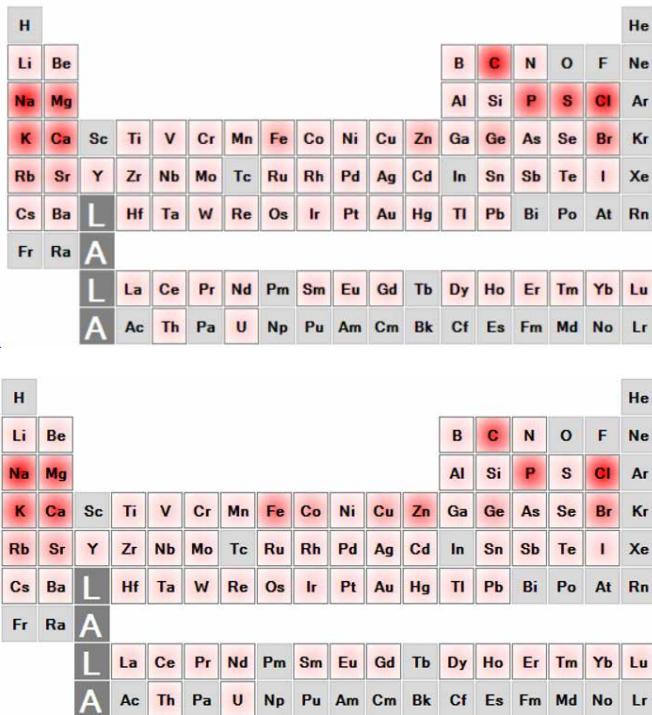


図 6. DMEM B3 サンプル（上側）および Ham's F-12（下側）の ICP-MS IntelliQuant データの周期表ヒートマップ表示

結論

この実験では、既知組成細胞培地（CDM）中の微量元素および主要元素の分析における、Agilent 7900 ICP-MS の優れた堅牢性、感度、および安定性について示しました。事前定義した汎用のプリセットメソッドを使用して、DMEM および Ham's F-12 の分析のメソッド作成を簡素化したと同時に、オートチューン機能を使用して、オペレータの経験には関係なく再現性の高い性能を実現しました。

データはすべて、Agilent 7900 と ORS⁴ を He-KED モードで使用して取り込みました。これによりすべての分析対象成分に対して一般的な多原子干渉を効果的に除去しました。標準溶液を添加した細胞培地サンプル中のすべての元素に対して、95 ~ 115 % の間の添加回収率を達成しており、定量メソッドの精度が実証されました。IntelliQuant 半定量データもメソッドの一部として、He-KED モードで取り込み、サンプル中に存在するすべての元素とその濃度を「周期表ヒートマップ」として表示しました。8 時間にわたり ISTD および CCV の測定値が安定していたのは、ICP-MS プラズマが堅牢であり、機器のマトリックス耐性が高かったためでした。機器の安定性はラボの生産性にとって重要です。これは QC エラーが低減され、サンプルを再分析する必要がなくなるためです。

CDM の元素組成を完全に理解することは、培地メーカーが細胞増殖培地の組成を最適化して、既存の製品の品質保証をするのに役に立ちます。CDM の高い品質と一貫性のある組成は、最終生物製剤製品の安全性、歩留まり、および有効性に影響を与える重要な要素です。

参考文献

1. Tatsuma Yao, Yuta Asayama, Animal - cell culture media: History, characteristics, and current issues. *Reproductive Medicine and Biology*, 16(2), 2017, 99–117
2. Melissa M. St. Amand et al. Identification of manipulated variables for a glycosylation control strategy. *Biotechnology and Bioengineering*, 111(10), 2014, 1957–1970
3. Ryan J. Graham et al. Zinc supplementation improves the harvest purity of β -glucuronidase from CHO cell culture by suppressing apoptosis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104, 2020, 1097–1108
4. Octopole Collision/Reaction Cell and Helium mode, Agilent publication, [5994-1172EN](#)
5. V. Nardone et al. In Vitro Effects of Strontium on Proliferation and Osteoinduction of Human Preadipocytes. *Stem Cells International* (Special Issue), 2015, 12
6. Agilent ICP-MS IntelliQuant Software, Agilent publication, [5994-1677EN](#)

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カストマーコンタクトセンタ

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

DE68217309

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2022

Printed in Japan, October 25, 2022

5994-5355JAJP