

LC/MSによる 細胞内オルガネラに蓄積した薬剤の検出

Single Cellome™ System SS2000

はじめに

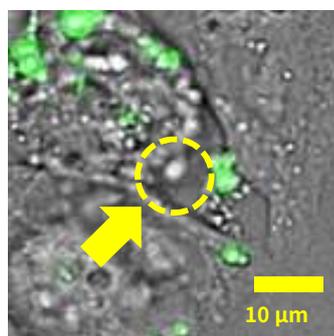
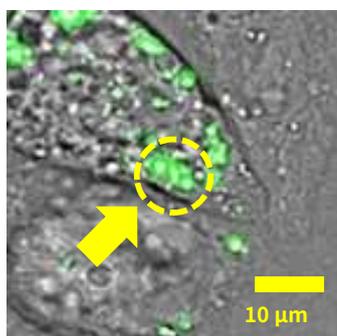
近年、シングルセルを対象とした研究が盛んに行われるようになってきましたが、分析技術のさらなる高感度化により、特定の細胞内成分を1細胞レベルで分析することも可能となりました。

SS2000は共焦点顕微鏡で撮像しながら先端径が数μmのガラスチップにより、1細胞レベルで細胞内成分を採取できる画期的な装置です。本アプリケーションノートでは、薬剤処理した細胞からSS2000で細胞内成分を採取し、LC/MSにて薬剤検出と定量した事例をご紹介します。

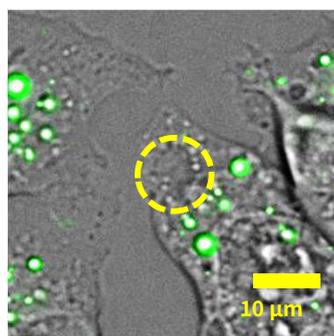
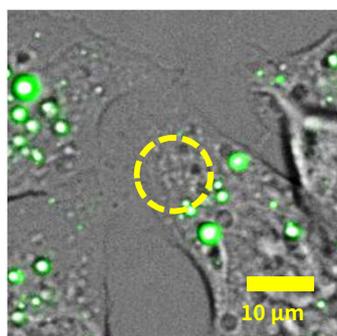


脂肪滴の凝集およびサンプリング

HepG2細胞を不整脈治療剤であるアミオダロンで処理したところ、ホスホリピドーシスにより脂肪滴の凝集が観察されました。¹⁾ 先端内径3 μmのガラスチップで脂肪滴を含む領域および脂肪滴を含まない領域をそれぞれサンプリングしました。



脂肪滴（緑）を含む領域のサンプリング



脂肪滴（緑）を含まない領域のサンプリング

実験条件

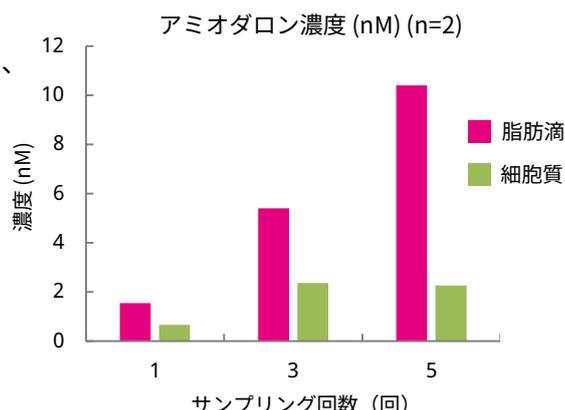
細胞	:	HepG2細胞 (35 mmディッシュ)
薬剤処理	:	終濃度50 μM アミオダロンを含む培地中で4時間培養
標識試薬	:	終濃度1 μM LipiDye (Ex: 405 nm, Em: 525 nm)
サンプリング	:	内径3 μmのチップで脂肪滴もしくは細胞質を採取し、6 μL精製水中に吐出して回収
サンプル内容	:	上記サンプリングを1回、3回、5回繰り返し回収した3種類のサンプル

LC/MSによる薬剤検出と定量

SS2000による各採取サンプルをLC/MSにて定量した結果、各サンプルに含まれるアミオダロン濃度を測定することができ、以下のような傾向が見られました。

- ◇回数nに関わらず細胞質採取サンプルより脂肪滴採取サンプルでアミオダロンが多く蓄積していた。
- ◇脂肪滴採取サンプルにおいてはサンプリング回数と検出濃度に相関が見られた。

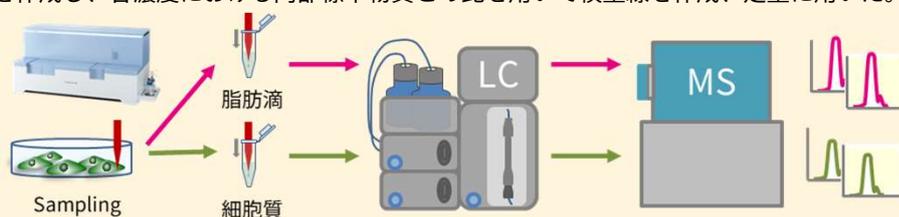
今後サンプリング回数やサンプル数を増やすことで、定量性のあるデータが得られることが期待されます。



実験協力：名城大学 薬学部 分析化学研究室

SS2000 x LC/MS ワークフロー

HPLCにより固定相と移動相の相互作用の差を用いて分離し質量検出器で検出する。今回はアミオダロン標品を用いて希釈系列を作成し、各濃度における内部標準物質との比を用いて検量線を作成、定量に用いた。



実験条件

検量線サンプル調製	：重水素標識アミオダロン (d-AMI) をメタノールで溶解 (2 nM d-AMI溶液) 2 nM d-AMI溶液でアミオダロン希釈、0.5~30 nM間の検量線サンプルを調製
サンプル調製	：エバポレーターで溶媒除去後2 nM d-AMI溶液 60μLで溶解、0.45 μmフィルタでろ過
LC機器	：ExionLC AD システム (SCIEX社)
LC条件	：移動相：A, 0.1%ギ酸含有H ₂ O、B, 0.1%ギ酸含有アセトニトリル グラジエント条件：%B：40%(0 min) →98%(6-9 min) →40%(9.1-12 min) カラム：Waters, ACQUITY UPLC BEH C18 1.7 μm, 2.1×50 mm 注入量：5 μL
MS機器	：QTRAP 6500+ (SCIEX社)
MS条件	：Ionization：ESI positive MS Mode; MRM (AMI：646 > 58、d-AMI：656 > 65)
定量限界	：0.4 nM

細胞内成分のサンプリングとLC/MS

SS2000は共焦点顕微鏡による高精細な画像と精密なチップ位置決め技術により、細胞内の微小領域における選択的サンプリングを可能とします。今回1細胞レベルで特定領域の細胞内成分を選択的に採取したサンプルで、LC/MSにより細胞内オルガネラに蓄積した薬剤を検出することができました。これにより、投与した薬剤の細胞内局在やその濃度を定量できる可能性が示唆されました。SS2000とLC/MSの組み合わせによる、より詳細な生命現象の解明や医薬品開発への貢献が期待されます。

Reference

- 1) N. Anderson, et al. (2006). Drug-induced phospholipidosis. *FEBS Letters*, 580 (23): 5533-5540. doi: 10.1016/j.febslet.2006.08.061

横河電機株式会社 ライフ事業本部 営業・ソリューションセンター

[Ed:01 /d]

〒180-8750 東京都武蔵野市中町 2-9-32

TEL 0422-52-5550

Email : SingleCell@cs.jp.yokogawa.com

URL: [https:// www.yokogawa.co.jp/solutions/products-and-services/life-science/](https://www.yokogawa.co.jp/solutions/products-and-services/life-science/)



記載内容はお断りなく変更することがありますのでご了承ください。

All Rights Reserved, Copyright © 2024, by Yokogawa Electric Corporation