

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7151933号
(P7151933)

(45)発行日 令和4年10月12日(2022.10.12)

(24)登録日 令和4年10月3日(2022.10.3)

(51)国際特許分類 F I
C 1 2 Q 1/02 (2006.01) C 1 2 Q 1/02
G 0 1 N 33/50 (2006.01) G 0 1 N 33/50 Z

請求項の数 14 (全35頁)

(21)出願番号	特願2022-511501(P2022-511501)	(73)特許権者	000004455 昭和電工マテリアルズ株式会社 東京都千代田区丸の内一丁目9番2号
(86)(22)出願日	令和2年9月25日(2020.9.25)	(74)代理人	100083806 弁理士 三好 秀和
(86)国際出願番号	PCT/JP2020/036253	(74)代理人	100101247 弁理士 高橋 俊一
(87)国際公開番号	WO2021/199459	(74)代理人	100095500 弁理士 伊藤 正和
(87)国際公開日	令和3年10月7日(2021.10.7)	(74)代理人	100098327 弁理士 高松 俊雄
審査請求日	令和4年7月28日(2022.7.28)	(72)発明者	丸山 優史 東京都千代田区丸の内一丁目6番6号 株式会社日立製作所内
(31)優先権主張番号	特願2020-62243(P2020-62243)	(72)発明者	佐久間 広貴
(32)優先日	令和2年3月31日(2020.3.31)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)		
早期審査対象出願			

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 細胞支持体由来成分を含む試料を評価する方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

細胞支持体由来成分、細胞を含む細胞懸濁液、細胞懸濁液から得られる評価用試料、細胞培養に用いるためのマイクロキャリア及び液体を含む試料、並びに、マイクロキャリアを処理した後の液体を含む試料からなる群から選択される少なくとも1つを含む試料と、水酸基、アミノ基、ニトロ基、及びカルボニル基からなる群から選ばれる官能基を少なくとも1つ有する芳香族化合物、及び蛍光色素からなる群から選択される少なくとも1つと、を含む混合物を用いて、試料を評価する(ただし、評価対象から抗体を除く)、方法。

【請求項2】

多糖類細胞支持体由来成分、酸、並びに、水酸基、アミノ基、ニトロ基、及びカルボニル基からなる群から選ばれる官能基を1つ以上有する芳香族化合物を含む混合物を用いて、細胞支持体由来成分を測定することを含む、請求項1に記載の方法。

10

【請求項3】

可溶性の細胞支持体の存在下で培養され、細胞支持体の溶解後に回収される細胞を含む細胞懸濁液を評価する方法であって、

前記細胞懸濁液から得られる評価用試料、酸、並びに、水酸基、アミノ基、ニトロ基、及びカルボニル基からなる群から選ばれる官能基を1つ以上有する芳香族化合物を含む混合物を用いて、細胞懸濁液を評価することを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

多糖類細胞支持体由来成分、酸、並びに、水酸基、アミノ基、ニトロ基、及びカルボニ

20

ル基からなる群から選ばれる官能基を1つ以上有する芳香族化合物を含む混合物を加熱すること、及び

加熱後の混合物中の反応生成物を蛍光又は吸光分析すること、を含み、細胞支持体由来成分を測定することを含む、請求項2に記載の方法。

【請求項5】

多糖類細胞支持体由来成分、酸、並びに、水酸基、アミノ基、ニトロ基、及びカルボニル基からなる群から選ばれる官能基を1つ以上有する芳香族化合物を含む混合物を加熱すること、及び

加熱後の混合物中の反応生成物を定量すること、を含み、

前記混合物において、前記芳香族化合物の質量は、前記多糖類細胞支持体由来成分の質量の少なくとも200倍であり、細胞支持体由来成分を測定することを含む、請求項2に記載の方法。

10

【請求項6】

前記反応生成物の定量に蛍光又は吸光分析を用いる、請求項5に記載の方法。

【請求項7】

前記混合物中の前記芳香族化合物の濃度は、1mg/mL～100mg/mLである、請求項4～6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項8】

可溶性の細胞支持体の存在下で培養され、細胞支持体の溶解後に回収される細胞を含む細胞懸濁液の評価方法であって、

20

前記細胞懸濁液から得られる評価用試料を用意すること、

前記評価用試料、酸、並びに、水酸基、アミノ基、ニトロ基、及びカルボニル基からなる群から選ばれる官能基を1つ以上有する芳香族化合物を含む混合物を調製すること、前記混合物を加熱すること、及び

加熱後の混合物中の反応生成物を蛍光又は吸光分析すること、を含み、細胞懸濁液を評価することを含む、請求項3に記載の方法。

【請求項9】

可溶性の細胞支持体の存在下で培養され、細胞支持体の溶解後に回収される細胞を含む細胞懸濁液の評価方法であって、

前記細胞懸濁液から得られる評価用試料を用意すること、

30

前記評価用試料、酸、並びに、水酸基、アミノ基、ニトロ基、及びカルボニル基からなる群から選ばれる官能基を1つ以上有する芳香族化合物を含む混合物を調製すること、前記混合物を加熱すること、及び

加熱後の混合物中の反応生成物を定量すること、を含み、

前記芳香族化合物の質量は、前記細胞支持体から加水分解されて生じる糖類の質量の少なくとも200倍であり、細胞懸濁液を評価することを含む、請求項3に記載の方法。

【請求項10】

前記反応生成物の定量に蛍光又は吸光分析を用いる、請求項9に記載の方法。

【請求項11】

前記混合物中の前記芳香族化合物の濃度は、1mg/mL～100mg/mLである、請求項8～10のいずれか1項に記載の方法。

40

【請求項12】

細胞を含む細胞懸濁液に、疎水部を有するポリマを染色可能な蛍光色素を添加すること、

前記蛍光色素を添加した細胞懸濁液に励起光を照射して蛍光分析すること、及び

前記蛍光分析から、前記細胞懸濁液を評価することを含む、

細胞懸濁液を評価することを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項13】

細胞培養に用いるためのマイクロキャリアと液体を含むか、又は前記マイクロキャリアを処理した後の液体を含む試料を用意すること、

前記試料に、疎水部を有するポリマを染色可能な蛍光色素を添加し蛍光分析すること、

50

及び

前記蛍光分析から、前記マイクロキャリアを評価することを含み、
マイクロキャリアを評価することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記蛍光色素は、ポルフィリン色素、フタロシアニン色素、ポリフェニレンビニレン色素、ピレン色素、キサンテン色素、クマリン色素、及び D C M 色素からなる群から選択される少なくとも 1 種を含む、請求項 1 2 又は 1 3 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は、細胞支持体由来成分を含む試料を評価する方法に関し、詳しくは、細胞支持体由来成分を測定する方法、細胞懸濁液を評価する方法、マイクロキャリアを評価する方法、細胞懸濁液に関する。

【背景技術】

【0002】

近年、再生医療等の分野で用いる目的で、細胞を大量に培養することが行われている。細胞を効率よく大量に培養するために、細胞増殖時の足場として細胞支持体、例えば球状のマイクロキャリアが用いられることがある。例えば、特許文献 1 には、ポリガラクトン酸を主体とする可消化基体であるマイクロキャリアが開示されており、細胞の採取時に、マイクロキャリアを消化して、細胞をマイクロキャリアから分離させることが開示されている。非特許文献 1 には、マイクロキャリアを用いて細胞を大量培養する方法において、細胞が通過しマイクロキャリアを保持するフィルタを用いて細胞をマイクロキャリアから分離させることが開示されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

【文献】特表 2018 - 520662 号公報

【非特許文献】

【0004】

【文献】Tristan Lawson, et al., "Process development for expansion of human mesenchymal stromal cells in a 50 L single-use stirred tank bioreactor", Bioc hemical Engineering Journal, 120 (2017), pp. 49-62

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

培養された細胞を利用する際には、細胞支持体を消化又は溶解して細胞支持体から分離した細胞を、回収する。しかしながら、細胞支持体の残留物が細胞と共に回収されることがある。フィルタを用いて細胞をマイクロキャリアから分離する方法においても、マイクロキャリアの残留物が細胞と共に回収されることがある。

【0006】

本開示は、細胞支持体の残留物の検出方法を提供することを課題とする。

本開示は、細胞支持体由来成分を簡便に測定可能な細胞支持体由来成分の測定方法を提供することを課題とする。また、本開示は、細胞支持体由来成分に基づいて細胞懸濁液を評価可能な細胞懸濁液の評価方法を提供することを課題とする。本開示は、細胞懸濁液へのマイクロキャリアの残留物の混入有無の評価方法を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本開示の実施形態は、次のものに関する。

【0008】

本開示の第 1 の側面としては、細胞支持体由来成分、細胞を含む細胞懸濁液、及び細胞

10

20

30

40

50

懸濁液から得られる評価用試料、細胞培養に用いるためのマイクロキャリア及び液体を含む試料、並びに、マイクロキャリアを処理した後の液体を含む試料からなる群から選択される少なくとも1つを含む試料と、水酸基、アミノ基、ニトロ基、及びカルボニル基からなる群から選ばれる官能基を少なくとも1つ有する芳香族化合物、及び蛍光色素からなる群から選択される少なくとも1つを含む混合物を用いて、試料を評価する、方法が提供される。

上記の第1の側面は、多糖類細胞支持体由来成分、酸、並びに、水酸基、アミノ基、ニトロ基、及びカルボニル基からなる群から選ばれる官能基を1つ以上有する芳香族化合物を含む混合物を用いて、細胞支持体由来成分を測定することを含んでもよい。

上記の第1の側面は、可溶性の細胞支持体の存在下で培養され、細胞支持体の溶解後に回収される細胞を含む細胞懸濁液を評価する方法であって、前記細胞懸濁液から得られる評価用試料、酸、並びに、水酸基、アミノ基、ニトロ基、及びカルボニル基からなる群から選ばれる官能基を1つ以上有する芳香族化合物を含む混合物を用いて、細胞懸濁液を評価することを含んでもよい。

【0009】

上記の第1の側面は、下記構成を備えてもよい。

(1) 多糖類細胞支持体由来成分、酸、並びに、水酸基、アミノ基、ニトロ基、及びカルボニル基からなる群から選ばれる官能基を1つ以上有する芳香族化合物を含む混合物を加熱すること、及び加熱後の混合物中の反応生成物を蛍光又は吸光分析すること、を含む、細胞支持体由来成分の測定方法。

(2) 多糖類細胞支持体由来成分、酸、並びに、水酸基、アミノ基、ニトロ基、及びカルボニル基からなる群から選ばれる官能基を1つ以上有する芳香族化合物を含む混合物を加熱すること、及び加熱後の混合物中の反応生成物を定量すること、を含み、前記混合物において、前記芳香族化合物の質量は、前記多糖類細胞支持体由来成分の質量の少なくとも200倍である、細胞支持体由来成分の測定方法。

(3) 前記反応生成物の定量に蛍光又は吸光分析を用いる、(2)に記載の細胞支持体由来成分の測定方法。

(4) 前記混合物中の前記芳香族化合物の濃度は、1 mg/mL ~ 100 mg/mLである、(1) ~ (3)のいずれか1項に記載の細胞支持体由来成分の測定方法。

(5) 可溶性の細胞支持体の存在下で培養され、細胞支持体の溶解後に回収される細胞を含む細胞懸濁液の評価方法であって、前記細胞懸濁液から得られる評価用試料を用意すること、前記評価用試料、酸、並びに、水酸基、アミノ基、ニトロ基、及びカルボニル基からなる群から選ばれる官能基を1つ以上有する芳香族化合物を含む混合物を調製すること、前記混合物を加熱すること、及び加熱後の混合物中の反応生成物を蛍光又は吸光分析すること、を含む、細胞懸濁液の評価方法。

(6) 可溶性の細胞支持体の存在下で培養され、細胞支持体の溶解後に回収される細胞を含む細胞懸濁液の評価方法であって、前記細胞懸濁液から得られる評価用試料を用意すること、前記評価用試料、酸、並びに、水酸基、アミノ基、ニトロ基、及びカルボニル基からなる群から選ばれる官能基を1つ以上有する芳香族化合物を含む混合物を調製すること、前記混合物を加熱すること、及び加熱後の混合物中の反応生成物を定量すること、を含み、前記芳香族化合物の質量は、前記細胞支持体から加水分解されて生じる糖類の質量の少なくとも200倍である、細胞懸濁液の評価方法。

(7) 前記反応生成物の定量に蛍光又は吸光分析を用いる、(6)に記載の細胞懸濁液の評価方法。

(8) 前記混合物中の前記芳香族化合物の濃度は、1 mg/mL ~ 100 mg/mLである、(5) ~ (7)のいずれか1項に記載の細胞懸濁液の評価方法。

【0010】

上記の第1の側面は、細胞を含む細胞懸濁液に、疎水部を有するポリマを染色可能な蛍光色素を添加すること、前記蛍光色素を添加した細胞懸濁液に励起光を照射して蛍光分析すること、及び前記蛍光分析から、前記細胞懸濁液を評価することを含み、細胞懸濁液を

10

20

30

40

50

評価することを含んでもよい。

上記の第1の側面は、細胞培養に用いるためのマイクロキャリアと液体を含むか、又は前記マイクロキャリアを処理した後の液体を含む試料を用意すること、前記試料に、疎水部を有するポリマを染色可能な蛍光色素を添加し蛍光分析すること、及び前記蛍光分析から、前記マイクロキャリアを評価することを含み、マイクロキャリアを評価することを含んでもよい。

上記した蛍光色素は、ポルフィリン色素、フタロシアニン色素、ポリフェニレンビニレン色素、ピレン色素、キサンテン色素、クマリン色素、及びDCM色素からなる群から選択される少なくとも1種を含んでもよい。

本開示の第2の側面としては、細胞を含み、1 μ m以下の疎水部を有するポリマの個数は、前記細胞1 \times 10⁴個当たり10個以下である、細胞懸濁液が提供される。

10

【発明の効果】

【0011】

本開示は、細胞支持体の残留物の検出方法を提供することができる。

本開示によれば、細胞支持体由来成分を簡便に測定可能な細胞支持体由来成分の測定方法を提供することができる。また、本開示によれば、細胞支持体由来成分に基づいて細胞懸濁液を評価可能な細胞懸濁液の評価方法を提供することができる。また、本開示によれば、細胞懸濁液へのマイクロキャリアの残留物の混入有無の評価方法を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

20

【0012】

【図1】製造例2による細胞懸濁液の明視野像及び蛍光像を示す。

【図2】製造例2による細胞懸濁液の明視野像及び蛍光像を示す。

【図3】製造例2による細胞懸濁液の明視野像及び蛍光像を示す。

【図4】製造例3による細胞懸濁液の明視野像及び蛍光像を示す。

【図5】マイクロキャリアの評価方法の一例を示すフローチャートである。

【図6】細胞懸濁液の評価方法の一例を示すフローチャートである。

【発明を実施するための形態】

【0013】

以下、本発明の実施形態について説明するが、本発明が当該実施形態に限定されることはない。

30

【0014】

一実施形態による方法は、細胞支持体又は細胞支持体由来成分を光学情報に基づいて検出することに特徴を有する。

一実施形態による方法は、細胞支持体由来成分、細胞を含む細胞懸濁液、及び細胞懸濁液から得られる評価用試料、細胞培養に用いるためのマイクロキャリア及び液体を含む試料、並びに、マイクロキャリアを処理した後の液体を含む試料からなる群から選択される少なくとも1つを含む試料と、水酸基、アミノ基、ニトロ基、及びカルボニル基からなる群から選ばれる官能基を少なくとも1つ有する芳香族化合物、及び蛍光色素からなる群から選択される少なくとも1つを含む混合物を用いて、試料を評価する、方法である。

40

【0015】

本明細書において、細胞支持体は、マイクロキャリア又は培養担体ともいわれ、細胞の成長の足場として機能するものをいう。細胞支持体は、可溶性の細胞支持体及び不溶性の細胞支持体のいずれであってもよい。可溶性の細胞支持体は、酵素等を用いて分解除去可能である。不溶性の細胞支持体は、フィルタ等を用いて物理的に除去可能である。多糖類細胞支持体は、酵素等を用いて分解除去可能であり、可溶性の細胞支持体として扱うことができる。疎水部を有するポリマは、分解除去しにくいいため、不溶性の細胞支持体の材料として扱うことができる。

【0016】

この方法の一例としては、多糖類細胞支持体由来成分、酸、並びに、水酸基、アミノ基

50

、ニトロ基、及びカルボニル基からなる群から選ばれる官能基を1つ以上有する芳香族化合物を含む混合物を用いて、細胞支持体由来成分を測定することを含む、測定方法である。より詳しい例示については、下記で測定方法1及び2として説明する。

【0017】

この方法の他の例としては、可溶性の細胞支持体の存在下で培養され、細胞支持体の溶解後に回収される細胞を含む細胞懸濁液を評価する方法であって、細胞懸濁液から得られる評価用試料、酸、並びに、水酸基、アミノ基、ニトロ基、及びカルボニル基からなる群から選ばれる官能基を1つ以上有する芳香族化合物を含む混合物を用いて、細胞懸濁液を評価することを含む、評価方法である。より詳しい例示については、下記で評価方法1及び2として説明する。

10

【0018】

この方法のさらに他の例示としては、細胞を含む細胞懸濁液に、疎水部を有するポリマを染色可能な蛍光色素を添加すること、蛍光色素を添加した細胞懸濁液に励起光を照射して蛍光分析すること、及び蛍光分析から、細胞懸濁液を評価することを含み、細胞懸濁液を評価することを含む、方法である。より詳しい例示については、下記で細胞懸濁液の評価方法として説明する。

【0019】

この方法のさらに他の例示としては、細胞培養に用いるためのマイクロキャリアと液体を含むか、又はマイクロキャリアを処理した後の液体を含む試料を用意すること、試料に、疎水部を有するポリマを染色可能な蛍光色素を添加し蛍光分析すること、及び蛍光分析から、マイクロキャリアを評価することを含み、マイクロキャリアを評価することを含む、方法である。より詳しい例示については、下記でマイクロキャリアの評価方法として説明する。

20

【0020】

(第1の実施形態)

<測定方法>

一実施形態に係る多糖類細胞支持体由来成分の測定方法は、多糖類細胞支持体由来成分、酸、並びに、水酸基、アミノ基、ニトロ基、及びカルボニル基からなる群から選ばれる官能基を1つ以上有する芳香族化合物を含む混合物を加熱すること、及び加熱後の混合物中の反応生成物を蛍光又は吸光分析すること、を含む方法である(以下、測定方法1ということがある)。

30

他の実施形態に係る多糖類細胞支持体由来成分の測定方法は、多糖類細胞支持体由来成分、酸、並びに、水酸基、アミノ基、ニトロ基、及びカルボニル基からなる群から選ばれる官能基を1つ以上有する芳香族化合物を含む混合物を加熱すること、及び加熱後の混合物中の反応生成物を定量すること、を含み、前記芳香族化合物の質量は、前記多糖類細胞支持体由来成分の質量の少なくとも200倍である、方法である(以下、測定方法2ということがある)。

【0021】

測定方法1によれば、細胞支持体由来成分を、酸及び特定の芳香族化合物と共に加熱して得られる混合物中の反応生成物を吸光分析又は蛍光分析するので、簡便に細胞支持体由来成分を測定することができる。

40

測定方法2によれば、細胞支持体由来成分を、酸及び、過剰量となる特定の芳香族化合物と共に加熱して得られる混合物中の反応生成物を定量するので、簡便に細胞支持体由来成分を測定することができる。

測定方法1及び測定方法2をまとめて、単に測定方法と称することがある。

【0022】

本明細書において、細胞支持体は、マイクロキャリア又は培養担体ともいわれ、細胞の成長の足場として機能するものをいう。本実施形態では、可溶性の細胞支持体を用いる。「可溶性の細胞支持体」とは、接着していた細胞が細胞支持体から遊離可能となる程度まで、酵素等の手段によって分解可能な細胞支持体を意味する。可溶性の細胞支持体の素材

50

としては、特に限定されるものではないが、具体例として、ペクチン、ペクチン酸塩等のポリガラクトロン酸；アルギン酸塩、セルロース、架橋アガロース、デキストラン、キトサンなどの多糖類を挙げることができる。本明細書では、多糖類を含有する細胞支持体を、多糖類細胞支持体と称する場合がある。細胞支持体の形態としては、例えば、ビーズ状、ファイバー状、メッシュ状、不織布状、スポンジ状などが挙げられる。細胞支持体の量は、細胞の種類によって異なるが、通常、 $0.1 \text{ g/L} \sim 100 \text{ g/L}$ 、 $1 \text{ g/L} \sim 100 \text{ g/L}$ 、 $1 \text{ g/L} \sim 50 \text{ g/L}$ 、又は $1.0 \text{ g/L} \sim 20 \text{ g/L}$ の量で用いられる。

【0023】

可溶性の細胞支持体は、細胞支持体の組成に応じて選択された条件によって、培地、生理食塩水等の水性媒体に溶解することができ、例えば、分解酵素により分解される。一実施形態では、アルギナーゼ、ペクチナーゼ、デキストラナーゼ等の、細胞支持体を構成する多糖類を加水分解することが公知の加水分解酵素が用いられる。

10

【0024】

本測定方法では、多糖類細胞支持体由来成分、酸、並びに、水酸基、アミノ基、ニトロ基、及びカルボニル基からなる群から選ばれる官能基を1つ以上有する芳香族化合物（以下、単に「特定芳香族化合物」と称することがある。）を含む混合物を加熱することを含む。

「多糖類細胞支持体由来成分」とは、可溶性の多糖類細胞支持体を、該細胞支持体の種類に応じて選択された溶解方法にしたがって溶解させて得られた成分を意味する。例えば、多糖類を加水分解酵素で分解して得られた単糖、オリゴ糖などの加水分解物が該当する。

20

【0025】

混合物における多糖類細胞支持体由来成分の含有量は、特に制限はなく、多糖類支持体由来成分の種類、特定の芳香族化合物の種類等に応じて適宜設定することができる。一例として挙げると、測定効率、又は感度等の観点から、混合物における多糖類支持体由来成分の含有量は、 $0.1 \mu\text{g/mL} \sim 1000 \mu\text{g/mL}$ 、 $0.5 \mu\text{g/mL} \sim 500 \mu\text{g/mL}$ 又は $0.8 \mu\text{g/mL} \sim 100 \mu\text{g/mL}$ とすることができる。多糖類細胞支持体由来成分の含有量は、例えば、細胞培養に用いられる細胞支持体の使用量から求めることができ、測定効率等の観点から、必要に応じて上記の濃度となるように調整することができる。

【0026】

酸としては、例えば、塩酸、硫酸、スルホン酸等の強酸などを用いることができる。当該酸は、混合物中の細胞支持体由来成分と特定芳香族化合物との反応を促進させて測定対象となる反応生成物（呈色物）を生成させる機能を有し、場合によって、混合物中に含まれる多糖類細胞支持体から細胞支持体由来成分への分解を促進する機能を有していてもよい。多糖類細胞支持体と酸との混合物をあらかじめ調製して、前記多糖類細胞支持体の分解を進行させておくこともできる。特定芳香族化合物の種類に応じて適宜操作を段階的に行うことができる。特定芳香族化合物の種類により、反応生成物の生成に酸の存在が必須ではなく、よって反応生成物を生成させる目的のために混合物中に酸を含めることが必要ではない場合もある。また、混合物中の多糖類細胞支持体の分解が十分に進行している場合にも、混合物中の酸の存在が必要ではない場合がある。

30

混合物中の酸の濃度は、添加量として、 $0.01 \text{ mol/L} \sim 20 \text{ mol/L}$ 、 $0.1 \text{ mol/L} \sim 12 \text{ mol/L}$ 、 $0.5 \text{ mol/L} \sim 10 \text{ mol/L}$ 、又は $1.0 \text{ mol/L} \sim 10 \text{ mol/L}$ とすることができる。

40

【0027】

特定芳香族化合物としては、加熱による糖類との反応によって蛍光性又は吸光性の反応生成物を生成可能な化合物、すなわち、発色団となりうる官能基を有する化合物を生成可能な単環又は多環の芳香族化合物であればよい。特定芳香族化合物における水酸基、アミノ基、ニトロ基、及びカルボニル基からなる群から選ばれる官能基は、1つであっても、複数存在していてもよい。複数存在する場合、同一種類の官能基が複数存在してもよいし、異なる種類の官能基が任意の組み合わせで存在してもよい。芳香族化合物とは、芳香環

50

を有する化合物であり、芳香環は、芳香族炭化水素環のほか、芳香族複素環であってもよく、縮合多環構造の一部に芳香環が含まれていてもよい。芳香族炭化水素環としては、代表的には、ベンゼン環、ナフタレン環、アントラセン環、テトラリン環、ヘキサヒドロアントラセン環等が挙げられる。芳香族複素環としては、例えばカルバゾール環、インドール環等の窒素複素環が挙げられる。

【0028】

このような特定芳香族化合物のうち、水酸基を有する芳香族化合物としては、モノフェノール及びポリフェノールが挙げられ、水酸基の数は1個～3個程度が好ましい。アミノ基を有する芳香族化合物としては、第一芳香族アミン及び第二芳香族アミンが挙げられ、モノアミンのほか、第一アミノ基及び/又は第二アミノ基を2以上含むポリアミンであってもよい。第二アミンは、窒素原子が複素環に含まれる複素環式アミン構造のものでよい。ニトロ基を有する芳香族化合物としては、1以上のニトロ基が芳香環に置換した芳香族ニトロ化合物が挙げられる。カルボニル基を有する芳香族化合物としては、環状ケトン基を含む縮合多環芳香族化合物を使用することができる。

10

【0029】

より詳細には、アニリン、p-アニシジン、-ナフチルアミン、-ジアニシジン等の芳香族第一アミン化合物；ジフェニルアミン、カルバゾール、インドール、トリプトファン、スカトール等の芳香族第二アミン化合物；-ナフトール、レゾルシン、オルシン、フロログルシン、ナフトレゾルシン、5-オキシテトラロン等のフェノール化合物；アントロン等の芳香族カルボニル化合物；3,5-ジニトロサリチル酸、3,4-ジニトロ安息香酸、m-ジニトロベンゼン、o-ジニトロベンゼン、2,4-ジニトロフェノール等のニトロ化合物などを挙げるることができる。これらの化合物は、反応中の混合物に存在していればよく、反応前に生成させたものであってもよい。

20

【0030】

一実施形態では、水酸基、アミノ基又は環状ケトン基を1つ以上有する芳香族化合物を使用できる。水酸基、アミノ基又は環状ケトン基を1つ以上有する芳香族化合物としては、感度の観点から、レゾルシン、オルシン、フロログルシン、ナフトレゾルシン、5-オキシテトラロン等のフェノール化合物、及びアントロン等の芳香族環状ケトン化合物を使用でき、なかでも、ナフトレゾルシンを用いることができる。ナフトレゾルシンは、単糖類等の糖類と反応(ナフトレゾルシン反応ともいう。)して、呈色物を生成する化合物として知られている。

30

【0031】

混合物中の特定芳香族化合物の濃度は、反応生成物を生成するために選択される特定芳香族化合物の種類、又は測定対象となり得る反応生成物の種類等によって適宜選択することができる。

測定方法1では、上記のとおり、混合物中の特定芳香族化合物の含有量は特に限定されないが、測定感度の観点から一例を挙げると、0.1mg/mL～100mg/mL、又は1mg/mL～50mg/mLとすることができる。

【0032】

測定方法2では、混合液中の特定芳香族化合物の量は、多糖類細胞支持体由来成分の質量の少なくとも200倍であればよく、200～20000倍、250～10000倍、又は300～5000倍とすることができる。このように、混合物が過剰量の特定芳香族化合物を含有することにより、反応生成物を生成させることができる。ここで生成される反応生成物は、選択された特定芳香族化合物の種類等によって異なるが、ナフトレゾルシンを選択した場合には、得られる反応生成物は、蛍光性又は吸光性を示し、酢酸ブチル、ベンゼン等の有機溶媒には不溶、エタノール等のアルコールに可溶の性質を示すことができるが、これに限定されない。測定方法2における特定芳香族化合物の量は、特定芳香族化合物の種類及び糖類の種類に応じて選択することができ、多糖類細胞支持体由来成分の質量の少なくとも20倍、少なくとも50倍、又は少なくとも100倍とすることができる。

40

50

【0033】

多糖類細胞支持体由来成分、酸及び特定芳香族化合物を含む混合物は、更に水性媒体を含むことができる。ここでの水性媒体としては、水、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）等を挙げることができる。

【0034】

混合物の加熱は、70 ~ 120、80 ~ 110、又は80 ~ 100の温度で、10分~24時間、30分~12時間、又は1時間~8時間、行うことができる。加熱中は、攪拌してもよい。これにより、混合物中に、選択された特定芳香族化合物の種類等に応じた反応生成物が生成される。加熱後の混合物は、冷却してもよく、例えば、60以下、40以下、又は室温（18 ~ 28）まで冷却することができる。

10

【0035】

測定方法1では、加熱後の混合物中の反応生成物を蛍光又は吸光分析することを含む。

測定方法1において、反応生成物の蛍光又は吸光分析は、通常、この目的のために行われるように行うことができる。例えば、次のように行われる。生成された反応生成物を室温まで冷却し、反応生成物に、水と混和しない有機溶媒を添加し、攪拌したのちに水相を除去し、有機相及び不溶物の混合物を得る。得られた混合物にアルコールを添加し、攪拌することで均一な溶液を得る。得られた溶液をさらにアルコールで希釈し、その希釈液を、分析に用いることができる。有機溶媒としては、例えば、酢酸ブチル、ベンゼンなどを用いることができる。アルコールとしては、例えば、エタノールなどを用いることができる。

20

【0036】

分析手法としては、蛍光分析又は吸光分析とすることができる。分析手法は、得られる反応生成物の呈色波長等によって選択することができる。分析としては、反応生成物の検出だけでなく、定量であってもよい。

【0037】

具体的には、例えば、以下のように行うことができる。予め、単糖類又は糖類（以下、まとめて「糖類」と記す。）の濃度が既知の模擬希釈液を複数個用意し、それぞれの模擬希釈液について、糖類の濃度と模擬希釈液の蛍光強度を測定し、糖類の濃度と模擬希釈液の蛍光強度との関係から糖類の濃度を求める関数（もしくは、検量線）を作成しておくことで、希釈液の蛍光強度から糖類の濃度を定量することができる。あるいは、生成された反応生成物を吸光分析して、得られた吸光度から検量線等を用いて糖類の濃度を定量することができる。検出限界や感度の観点から、蛍光分析を用いることが好ましい。

30

【0038】

測定方法2では、加熱後の混合物中の反応生成物を定量することを含む。定量は、化合物の定量として通常行われる方法を用いることができ、測定方法1で説明した蛍光分析又は吸光分析によって糖類の濃度を定量してもよいが、これらに限定されることはない。

【0039】

更に他の実施形態では、細胞懸濁液中の多糖類細胞支持体が完全に溶解した際の糖類の量を予め定めておくことができる。これにより、定量結果の糖類の濃度から、細胞懸濁液中の多糖類細胞支持体が溶解した割合を確認することができる。

40

【0040】

上述した細胞支持体由来成分の測定方法は、簡便に且つ感度よく、細胞支持体由来成分を測定することができるため、可溶性の細胞支持体を利用する種々の用途に好ましく適用することができる。

【0041】

<評価方法>

本実施形態に係る細胞懸濁液の評価方法について説明する。

一実施形態の評価方法は、可溶性の細胞支持体の存在下で培養され、細胞支持体の溶解後に回収される細胞を含む細胞懸濁液の評価方法であって、細胞懸濁液から得られる評価用試料を用意すること、評価用試料、酸、及び、特定芳香族化合物を含む混合物を調製す

50

ること、混合物を加熱すること、及び加熱後の混合物中の反応生成物を蛍光又は吸光分析すること、を含む方法である（以下、評価方法1と称することがある。）。

他の実施形態の評価方法は、可溶性の細胞支持体の存在下で培養され、細胞支持体の溶解後に回収される細胞を含む細胞懸濁液の評価方法であって、細胞懸濁液から得られる評価用試料を用意すること、評価用試料、酸、及び、特定芳香族化合物を含む混合物を調製すること、混合物を加熱すること、及び加熱後の混合物中の反応生成物を定量すること、を含み、前記芳香族化合物の質量は、前記細胞支持体から加水分解されて生じる糖類の質量の少なくとも200倍である、方法である（以下、評価方法2と称することがある。）。

【0042】

すなわち、評価方法1及び評価方法2は、それぞれ、測定方法1及び測定方法2を、細胞懸濁液の評価方法に適用したものである。評価方法1及び評価方法2を総称して、単に評価方法と称することがある。

本評価方法によれば、細胞懸濁液中の細胞支持体由来成分を簡便且つ感度よく評価することができる。

【0043】

本評価方法では、細胞懸濁液から得られる評価用試料を用意することを含み、ここで細胞懸濁液は、可溶性の細胞支持体の存在下で培養され、細胞支持体の溶解後に回収される細胞を含む。

【0044】

本明細書において、細胞としては、細胞支持体に接着可能な接着細胞であればよく、例えば、体細胞、幹細胞等が挙げられる。体細胞として、例えば、内皮細胞、表皮細胞、上皮細胞、心筋細胞、筋芽細胞、神経細胞、骨細胞、骨芽細胞、線維芽細胞、脂肪細胞、肝細胞、腎細胞、膵細胞、副腎細胞、歯根膜細胞、歯肉細胞、骨膜細胞、皮膚細胞、樹状細胞、マクロファージ等が挙げられる。

【0045】

接着細胞は、動物由来の細胞であることが好ましく、哺乳動物由来の細胞であることがより好ましい。哺乳動物として、例えば、ヒト、サル、チンパンジー、ウシ、ブタ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、ラット、マウス、モルモット、イヌ、ネコ等が挙げられる。接着細胞は、例えば、皮膚、肝臓、腎臓、筋肉、骨、血管、血液、神経組織等の組織に由来する細胞であってよい。

【0046】

接着細胞は、1種を単独で、又は、2種以上を組み合わせる用いることができる。一実施形態において、接着細胞は、幹細胞であってよい。幹細胞としては、間葉系幹細胞、造血系幹細胞、神経系幹細胞、骨髄幹細胞、生殖幹細胞等の体性幹細胞などを挙げることができ、間葉系幹細胞、又は骨髄間葉系幹細胞とすることができる。間葉系幹細胞とは、個体の様々な組織に存在し、骨芽細胞、軟骨細胞及び脂肪細胞等の間葉系の細胞の全て又はいくつかへの分化が可能な体性幹細胞を広義に意味する。

幹細胞として、例えば、人工多能性幹細胞（iPS細胞）、胚性幹細胞（ES細胞）、胚性生殖幹細胞（EG細胞）、多能性生殖幹細胞（mGS細胞）、胚性腫瘍細胞（EC細胞）、Muse細胞等の多能性幹細胞を用いてもよい。

【0047】

細胞を培養するために用いられる培地は、無機塩、アミノ酸、糖、及び水を含有することが好ましい。培地は、血清、ビタミン、ホルモン、抗生物質、増殖因子、接着因子等の任意の成分を更に含有してもよい。培地として、細胞培養用の基礎培地として知られている培地を使用することができる。

【0048】

すなわち、培地として、選択された細胞を培養するために用いられることが知られているものであれば特に制限なく使用することができ、例えば、DMEM（ダルベッコ改変イーグル培地）、MEM（イーグル最小必須培地）、MEM培地（イーグル最小必須培地改変型）等が挙げられるが、これらに限定されない。

10

20

30

40

50

【0049】

培地に血清を添加する場合は、例えば、ウシ胎仔血清（FBS）、ウマ血清、ヒト血清等の血清等を用いることができる。

培養に用いられる培地は、異種由来成分を含まないものとすることができる。異種由来成分を含まない培地は、動物由来の血清の代わりに、血清の代替添加物（例えばKnockout Serum Replacement（KSR）（Invitrogen社製）、Chemically-defined Lipid concentrated（Gibco社製）、Glutamax（Gibco社製）等）を含むことができる。

その他、Essential 8（Thermo Fisher社）、mTeSR1（STEMCELL Technologies社）、StemFitシリーズ（タカラバイオ株式会社）、StemFlex（Thermo Fisher Scientific社）等の無血清培地を用いることができる。

10

【0050】

細胞の培養に用いられる可溶性の細胞支持体には、測定方法に関して記述した細胞支持体を挙げることができる。細胞支持体の溶解に関する事項は、前述した事項をそのまま本評価方法にも適用することができる。

細胞支持体の溶解によって、細胞は細胞支持体から分離可能となる。細胞支持体から分離した細胞は、通常用いられる方法、例えば、フィルタによる濾過、遠心分離等を用いた方法で回収できる。回収後の細胞は、適当な水性媒体、例えば培地、生理食塩水等に懸濁することができ、これによって細胞懸濁液を得ることができる。

20

【0051】

本明細書において、細胞懸濁液とは、細胞を含む液体を意味し、ここでの細胞は、細胞支持体又は細胞支持体の一部に接着した状態又は接着していない状態のいずれであってもよい。

【0052】

評価用試料は、細胞懸濁液から得られるものであればよく、例えば、細胞懸濁液をそのまま評価用試料としたもの、細胞懸濁液から細胞を取り除いて評価用試料としたもの、又は、細胞懸濁液の一部もしくは細胞懸濁液から細胞を取り除いた液体の一部を他の水性媒体、例えば水と混合して調製したものであってもよい。評価用試料は、細胞を含まない液体で構成することが好ましい。評価用試料は、評価する直前に細胞懸濁液から調製してもよく、予め評価用試料として調製されていたものを入手してもよい。

30

【0053】

評価方法1及び評価方法2は、上述したように用意された評価用試料を、酸及び特定芳香族化合物と組み合わせることで混合物を調製し、本明細書に記載された測定方法、例えば測定方法1及び測定方法2を実行することを含む。すなわち、評価方法1及び評価方法2は、上述したように用意された評価用試料、酸、及び特定芳香族化合物を含む混合物を調製すること、得られた混合物を用いて、それぞれ測定方法1及び測定方法2を行うことを含む。

【0054】

評価方法1及び評価方法2は、それぞれ測定方法1及び測定方法2を、細胞懸濁液から得られる評価用試料に対して実行するので、評価用試料、ひいては細胞懸濁液中の細胞支持体由来成分の有無を、簡便に且つ感度よく確認することができ、細胞懸濁液中に細胞支持体由来成分が含まれている場合には、細胞懸濁液中の細胞支持体由来成分を、簡便に且つ感度よく、定量することができる。

40

【0055】

本明細書において測定方法1及び測定方法2に関して記述した事項は、評価方法1及び評価方法2についても適用することができる。本明細書において、測定方法1及び測定方法2に限定されずに記載された測定方法に関する事項は、評価方法1及び評価方法2にも適用することができる。本明細書において、評価方法1及び評価方法2に限定されずに記載した評価方法に関する事項は、測定方法1及び測定方法2にも適用することができる。本明細書において、測定方法1及び測定方法2に限定されずに記載された測定方法に関する

50

る事項は、評価方法 1 及び評価方法 2 に限定されずに記載した評価方法にも適用することができる。

【 0 0 5 6 】

なお、第 1 の実施形態に係る測定方法及び評価方法の対象は、細胞懸濁液中の細胞支持体由来成分に限定されず、細胞支持体に由来しない糖成分であってもよい。例えば、第 1 の実施形態に係る測定方法及び評価方法は、培養後の細胞を回収して培地成分を除去し、PBS 等の緩衝液に懸濁して細胞懸濁液を調製したとき、調製後の細胞懸濁液におけるグルコースの定量に用いることができる。これにより、培地成分除去後の細胞懸濁液における培地成分の残留に関して、細胞懸濁液の評価をすることができる。

【 0 0 5 7 】

(第 2 の実施形態)

細胞培養方法の一つにマイクロキャリアを用いて細胞を 3 次元培養する方法がある。マイクロキャリアは、可溶性又は不溶性のポリマから構成された主として球体の形状を採る小粒子であり、細胞培養用の培地等の細胞懸濁液中において接着性の細胞を支持し細胞の成長を促すことが可能である。マイクロキャリアを用いた細胞培養は、3 次元培養のため、細胞の大量培養が可能であり、細胞培養に要する床面積の削減が可能である。細胞培養後には、酵素等を用いて細胞をマイクロキャリアから剥離してマイクロキャリアを取り除き、細胞を回収することができる。

【 0 0 5 8 】

ところで、マイクロキャリアから分離した細胞を他の培地又は液体に懸濁して細胞懸濁液を調製することがあるが、得られた細胞懸濁液には、所定の大きさよりも小さいマイクロキャリアの小片が不純物として混入することがある。このような不純物としては、例えば、マイクロキャリアの原料に含まれ得る小片等が挙げられる。このため、マイクロキャリアを用いた細胞培養では、得られる細胞懸濁液においてマイクロキャリアに由来する不純物の混入の有無を評価することが望まれる。細胞を大量に培養する場合には精密な管理が難しくなるため、不純物の混入有無の評価がより重要になる。

【 0 0 5 9 】

< 細胞懸濁液の評価方法 >

一実施形態による細胞懸濁液の評価方法としては、細胞を含む細胞懸濁液に、疎水部を有するポリマを染色可能な蛍光色素を添加すること、前記蛍光色素を添加した細胞懸濁液に励起光を照射して蛍光分析すること、及び前記蛍光分析から、前記細胞懸濁液を評価することを含む、ことを特徴とする。

これによれば、マイクロキャリア由来の不純物の混入有無が評価された細胞懸濁液を提供することができる。例えば、マイクロキャリア由来の疎水部を有するポリマの混入有無が評価された細胞懸濁液を提供することができる。一形態としては、細胞懸濁液を提供する場合に、提供懸濁液に含まれるマイクロキャリア由来の不純物の存在、含有割合等を製品に記して提供することができる。

【 0 0 6 0 】

細胞を含む細胞懸濁液は、細胞が分散媒中に分散している状態の液体である。細胞懸濁液の分散媒としては、水性液体が好ましく、主溶媒が水であることがより好ましく、例えば、リン酸緩衝液等の緩衝液、培地、生理食塩水、純水などであってよい。

評価対象の細胞懸濁液は、細胞を培養した後の懸濁液であってもよいし、細胞を培養する前の懸濁液であってもよい。また、評価対象の細胞懸濁液は、マイクロキャリア等の細胞担体をさらに含んでもよいし、マイクロキャリア等の細胞担体が添加された後に除去された状態であってもよい。また、評価対象の細胞懸濁液は、細胞培養に供される一般的な添加剤を含んでもよい。

【 0 0 6 1 】

評価対象の細胞懸濁液において、細胞の濃度は、特に限定されない。高濃度の細胞懸濁液中の疎水部を有するポリマを測定する場合は、任意の液体を添加して細胞懸濁液の濃度を調整してから、蛍光色素を添加してもよい。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 2 】

細胞懸濁液を評価するために細胞懸濁液に添加される蛍光色素は、疎水部を有するポリマを染色可能な蛍光色素であることが好ましい。

疎水部を有するポリマを染色可能な蛍光色素としては、例えば、芳香環を有する発色団を備える化合物等がある。発色団は、例えば、ベンゼン環、非ベンゼン環、複素芳香環等の単環；1種又は2種以上の単環が縮合した縮合芳香環；これらの単環、縮合芳香環、又はこれらの組み合わせが任意の結合手によって結合する多環構造を有することができる。発色団は、疎水部を有するポリマに親和性を示して染色しやすくするために、2個以上の単環を備える多環構造、2環以上、より好ましくは3環以上の縮合芳香環を備える多環構造、又は単環と縮合芳香環とを合計で2個以上備える多環構造であってよい。

10

【 0 0 6 3 】

ベンゼン環、非ベンゼン環、又はこれらの縮合芳香環としては、例えば、ベンゼン環、シクロペンタジエン環、ナフタレン環、アントラセン環、フェナントレン環、テトラセン環、トリフェニレン環、クリセン環、ピレン環、ペリレン環、ペリノン環、フルオレン環等が挙げられる。

【 0 0 6 4 】

複素芳香環は、N、O、P、及びSからなる群から選択される少なくとも1種の原子を環上に有することが好ましく、より好ましくはN、O、又はこれらの組み合わせを有する複素芳香環である。

複素芳香環又は縮合複素芳香環としては、例えば、ピロール環、ピリジン環、イミダゾール環、ピラゾール環、オキサゾール環、チアゾール環、ピラジン環、ピラミジン環、インドール環、ベンゾイミダゾール環、キノリン環、イソキノリン環、アクリジン環、カルバゾール環；フラン環、ピラン環、ベンゾフラン環、ジベンゾフラン環、ベンゾピラン環、キサンテン環、フルオレセイン環；チオフエン環、ベンゾチオフエン環、ジベンゾチオフエン環；ポルフィリン環、ジピロメテン環、フタロシアニン環等が挙げられる。

20

【 0 0 6 5 】

蛍光色素の中でも、疎水部を有するポリマを染色しやすく、細胞を染色しにくい、又は細胞を染色しないものが好ましい。このような蛍光色素としては、2個以上の単環の芳香環、縮合芳香環、又は単環の芳香環と縮合芳香環の組み合わせを有する低分子量化合物；2個以上の単環の芳香環、縮合芳香環、又は単環の芳香環と縮合芳香環の組み合わせを有する高分子量化合物等が挙げられる。具体的には、ポルフィリン、フタロシアニン、ポリフェニレンビニレン、ピレン、ペリレン、ペリノン、キサンテン、ナフトフルオレセイン等、又はこれらの誘導体が挙げられ、より好ましくはポルフィリン、ポリフェニレンビニレン、又はこれらの誘導体である。

30

【 0 0 6 6 】

蛍光色素の発色団又はその近傍には、親水性基が導入されていてもよい。親水性基としては、例えば、アニオン性基、カチオン性基、アミノ基、ヒドロキシ基、ポリアルキレングリコール基、カルボキシ基等が挙げられる。ポリアルキレングリコール基としては、例えば、ポリエチレングリコール基、ポリプロピレングリコール基、ポリエチレンプロピレングリコール基等が挙げられる。ポリアルキレングリコール基の付加モル数は、例えば2～2000であり、2～200が好ましい。蛍光色素が親水性基を有することで、分散媒への溶解性をより改善することができる。

40

蛍光色素の発色団又はその近傍には、イオン性基が導入されていてもよい。イオン性基としては、アニオン性基及びカチオン性基のいずれであってもよい。マイクロキャリアは、細胞附着性の観点からカチオン処理されていることが多いことから、蛍光色素にアニオン性基が導入されていることで、マイクロキャリア由来の疎水部を有するポリマに蛍光色素をより結合させて染色することができる。アニオン性基としては、例えば、スルホン酸基、リン酸基、カルボキシ基、硝酸基等が挙げられる。細胞適合性の観点から、スルホン酸基を好ましく用いることができる。

【 0 0 6 7 】

50

疎水部を有するポリマを染色可能な蛍光色素としては、細胞を染色するか否かに関わらず、上記した化合物に限定されずに、芳香環を有する発色団を備える低分子量化合物を用いてもよい。このような化合物としては、例えば、単環、2環の縮合芳香環、又は3環の縮合芳香環を、1個又は2個以上、好ましくは1個又は2個備える化合物を挙げることができる。具体的には、クマリン色素、DCM色素、シアニン色素、キノリン色素、ジピロメテン色素等が挙げられる。

【0068】

疎水部を有するポリマを染色可能な蛍光色素としては、例えば、ポルフィリン色素；フタロシアニン色素；ポリフェニレンピニレン又はその誘導体等の高分子量化合物；ピレン、ペリレン、ペリノン等の縮合芳香環を有する化合物；フルオレセイン、ナフトフルオレセイン等のキサントゲン色素；トリフェニルメタン等のトリアリールメタン色素；クマリン、クマリン6、クマリン30等のクマリン色素；4-(ジシアノメチレン)-2-メチル-6-(4-ジメチルアミノスチリル)-4H-ピラン、2-tert-ブチル-4-(ジシアノメチレン)-6-[2-(1,1,7,7テトラメチルジユロリジン-9-イル)ピニル]-4H-ピラン、4-(ジシアノメチレン)-2-メチル-6-[2-(2,3,6,7-テトラヒドロ-1H,5H-ベンゾ[ij]キノリジン-9-イル)ピニル]-4H-ピラン等のDCM色素；シアニン色素；キノリン色素；BODIPY（登録商標；Boron-dipyrromethene）等のジピロメテン色素などを挙げることができる。

これらは、1種単独で用いてもよく、本開示の効果を損なわない範囲で、2種以上を組み合わせて用いてもよい。

【0069】

より好ましくは、ポルフィリン色素、フタロシアニン色素、ポリフェニレンピニレン色素、ピレン色素、キサントゲン色素、クマリン色素、及びDCM色素からなる群から選択される少なくとも1種である。

ここで、ポルフィリン色素は、ポルフィリン又はその誘導体を含む色素を意味し、その他の色素の名称も同様に扱う。

【0070】

上記した蛍光色素のなかでも、多価アニオン系化合物、ポリアルキレングリコール鎖を有する化合物、ナフトフルオレセイン、クマリン色素、DCM色素等を好ましく用いることができ、より好ましくは、細胞懸濁液において疎水部を有するポリマを選択的に染色可能であることから、多価アニオン系化合物、ポリアルキレングリコール鎖を有する化合物、ナフトフルオレセインを用いるとよく、さらに好ましくは、細胞懸濁液において細胞の染色を抑制し疎水部を有するポリマを選択的に染色可能であることから、多価アニオン系化合物を用いるとよい。

【0071】

多価アニオン系化合物としては、発色団に2個以上のアニオン性基が導入された化合物であってよく、発色団に4個以上のアニオン性基が導入された化合物がより好ましい。例えば、縮合芳香環を有する低分子量化合物に2個以上のアニオン性基が導入された化合物は、細胞よりも疎水部を有するポリマを選択的に染色可能である。このような化合物としては、例えば、ポルフィリン、フタロシアニン、又はこれらの誘導体の多価アニオン等が挙げられる。具体的には、5,10,15,20-テトラキス(4-スルホフェニル)ポルフィリン(TPPS)等が挙げられる。

また、単環又は縮合芳香環を有する高分子量化合物に2個以上のアニオン性基が導入された化合物を挙げることができる。例えば、芳香環を有する構造単位を複数備える共重合体に2個以上のアニオン性基が導入された化合物、芳香環とアニオン性基とを有する構造単位を複数備える共重合体等であってよい。このような化合物としては、例えば、ポリフェニレンピニレン又はこれらの誘導体の多価アニオン等が挙げられる。この高分子量化合物の分子量は、例えば100~100000であり、100~10000が好ましい。具体的には、ポリ(5-メトキシ-2-(3-スルフォプロポキシ)-1,4-フェニレン

ピニレン)等が挙げられる。

【0072】

ポリアルキレングリコール鎖を有する化合物としては、発色団にポリアルキレングリコール鎖が導入された化合物であってよい。この発色団としては、ブレン、ピリレン、ピリノン等の縮合ベンゼン環であることが好ましい。ポリアルキレングリコール鎖としては、例えば、ポリエチレングリコール鎖、ポリプロピレングリコール鎖、ポリエチレンプロピレングリコール鎖等が挙げられる。ポリアルキレングリコール鎖の付加モル数は、例えば2~2000であり、2~200が好ましい。ポリアルキレングリコール鎖は親水性を有するため、蛍光色素によって疎水部を有するポリマを染色しやすくできる。具体的には、メトキシポリエチレングリコールピレン等が挙げられる。

10

【0073】

ナフトフルオレセインは、キサンテン骨格の発色団又はその近傍にヒドロキシ基が導入された蛍光色素であり、系のpHに応じて蛍光強度が変化する特性を有する。

【0074】

蛍光色素は、例えば、細胞内環境と細胞外環境とで蛍光特性が異なる特性を備えていてもよい。これによって、細胞懸濁液に蛍光色素が存在する場合に、蛍光色素を内部に取り込んだ細胞が発する蛍光と、疎水部を有するポリマが発する蛍光とを識別することができ、細胞懸濁液中の疎水部を有するポリマの存在を特定することができる。

例えば、細胞内環境で蛍光を発せず、かつ、細胞外環境で蛍光を発する蛍光色素の場合、細胞外環境に存在する疎水部を有するポリマからの蛍光のみが検出可能となる。これにより、疎水部を有するポリマの存在を特定することができる。他の例として、細胞内環境で発する蛍光強度が低く、細胞外環境で発する蛍光強度が高い蛍光色素の場合、細胞懸濁液中で、蛍光強度の差に基づいて、細胞と識別して疎水部を有するポリマの存在を特定することができる。

20

【0075】

蛍光を発する励起光の波長が細胞内外で異なる蛍光色素を用いてもよい。例えば、第1の波長範囲の励起光では細胞内の蛍光色素の蛍光強度が高くなり、第2の波長範囲の励起光では細胞内の蛍光色素の蛍光強度が低くなることを利用すれば、第2の波長範囲の励起光において疎水部を有するポリマを細胞から識別して特定することができる。

励起波長に対して発する蛍光の色相が細胞内外の環境で異なる蛍光色素を用いてもよい。

30

【0076】

このような蛍光色素として、上記した蛍光色素の中からポリアルキレングリコール鎖を有する化合物、ナフトフルオレセイン等が挙げられる。

ポリアルキレングリコール鎖を有する化合物は、細胞内外で多量体形成のしやすさが異なり、細胞外では多量体が形成されて蛍光強度が高くなる傾向がある。

細胞内外でpHが局所的に異なることを利用する場合には、pHに応じて蛍光強度が変化するナフトフルオレセインを用いることができる。

【0077】

蛍光色素の一例としては、細胞懸濁液中で、蛍光色素によって疎水部を有するポリマが染色されて発する蛍光強度が、蛍光色素によって細胞が染色されて発する蛍光強度より高いことが好ましい。細胞懸濁液中で、疎水部を有するポリマの蛍光強度が細胞の蛍光強度より高いことは、蛍光の強度を観察又は測定することによって確認できる。一実施形態では、所定の波長の励起光照射した場合に、細胞懸濁液中で、細胞の蛍光が検出されず、疎水部を有するポリマの蛍光が検出され得る。例えば、細胞懸濁液中で、所定の波長の励起光照射において、細胞の蛍光強度が一定値(a)未満であり、疎水部を有するポリマの蛍光強度が一定値(a)以上又は一定値(a)の1.1倍以上、好ましくは一定値(a)の2倍以上であることができる。

40

蛍光色素の種類に応じて、蛍光する励起光の波長は異なるが、蛍光色素がより強く蛍光する波長範囲の励起光を選択することが好ましい。

このような蛍光色素として、上記した蛍光色素の中から多価アニオン系化合物等が挙げ

50

られる。

【0078】

蛍光色素の他の例としては、細胞懸濁液中で、細胞懸濁液の温度、濃度、及びpHからなる群から選択される少なくとも1種が一定の範囲を満たす場合に、蛍光色素によって疎水部を有するポリマが染色されて発する蛍光強度が、蛍光色素によって細胞が染色されて発する蛍光強度より高くなる又は低くなる特性を有する蛍光色素を挙げることができる。このような蛍光色素を用いる場合、細胞懸濁液の温度等を調節してから蛍光強度を検出することによって、細胞と疎水性部を有するポリマとを容易に識別することができる。

例えば、酸性からアルカリ性のpH条件によって蛍光が検出される蛍光色素を用いる場合には、細胞懸濁液に蛍光色素を添加し、酸性又はアルカリ性に細胞懸濁液を調節してから、蛍光を検出することができる。温度及び濃度等の条件も同様であり、これらの条件を組み合わせてもよい。

蛍光色素の種類に応じて、蛍光する励起光の波長は異なるが、蛍光色素が強く蛍光する波長範囲の励起光で照射することが好ましい。

濃度条件で蛍光強度が調節可能な蛍光色素としては、上記した蛍光色素の中からポリアルキレングリコール鎖を有する化合物等が挙げられる。pH条件で蛍光強度が調節可能な蛍光色素としては、上記した蛍光色素の中からナフトフルオレセイン等が挙げられる。

【0079】

細胞懸濁液への蛍光色素の添加方法は、特に限定されず、例えば、粉末状、顆粒状等の固体状の蛍光色素を細胞懸濁液に添加してもよく、又は、蛍光色素を溶媒に分散ないし溶解させた組成物を細胞懸濁液に添加してもよい。

細胞懸濁液に蛍光色素を添加した後に、細胞懸濁液中に蛍光色素を均一に配合するために、混合ないし攪拌を行うことが好ましい。

【0080】

疎水部を有するポリマは、マイクロキャリアを用いた細胞培養において、細胞懸濁液に存在し得る成分である。細胞培養後にマイクロキャリアを除去して得られた細胞懸濁液は、細胞と液体とを含み、細胞以外の固形物量が少ないことが好ましく、例えば、疎水部を有するポリマの含有量が少ないことが好ましい。例えば、マイクロキャリアは一般に細胞よりもサイズが大きいことから、細胞培養後のマイクロキャリアはフィルタ等を用いて細胞懸濁液から除去することができる。しかし、細胞よりサイズが小さいマイクロキャリアの小片の場合には、フィルタ等によって細胞懸濁液から除去されないことがある。すなわち、細胞懸濁液に含まれ得る疎水部を有するポリマは、マイクロキャリアの材料を含み得る。また、酵素等によって溶解可能なマイクロキャリアについても、細胞のサイズよりも小さい溶解残留物が細胞懸濁液に含まれ得る。溶解残留物に疎水部を有するポリマが含まれている場合には、この溶解残留物も検出することができる。

【0081】

以下、マイクロキャリアについて説明する。

マイクロキャリアの材料は、有機物、無機物、又はこれらの複合材料であってよい。これらの中から、有機物として疎水部を有するポリマによって形成されるマイクロキャリアを用いて細胞培養する場合に、一実施形態による方法は、細胞懸濁液において疎水部を有するポリマを評価することに役立つ。

有機物として、例えば、ポリスチレン、ポリエステル、ポリウレタン、ポリエチレン、ポリプロピレン、(メタ)アクリル系ポリマ、(メタ)アクリルアミド系ポリマ、ポリビニルアルコール、シリコーン系ポリマ、エポキシ樹脂等の合成高分子；コラーゲン、ゼラチン等の天然高分子；ペクチン、ペクチン酸塩等のポリガラクトン酸；アルギン酸塩、セルロース、架橋アガロース、デキストラン、キトサン等の多糖類などが挙げられる。無機物として、例えば、ガラス、セラミック、金属、合金、金属酸化物等が挙げられる。

【0082】

細胞適合性の観点から、マイクロキャリアは、有機物を含むことが好ましい。一実施形態によれば、マイクロキャリアが疎水部を有するポリマによって形成される場合に、細胞

10

20

30

40

50

懸濁液に混入し得る疎水部を有するポリマを評価することができる。疎水部を有するポリマとしては、上記した合成高分子及び天然高分子のうち疎水性を有するもの、又は上記した合成高分子又は天然高分子を疎水化処理したものを挙げることができる。典型的には、ポリスチレン、ポリエステル等であり、好ましくは、ポリスチレンである。また、ポリビニルアルコール、(メタ)アクリル系ポリマのナトリウム塩、親水性基が多量に導入された共重合体等の親水性ポリマに、疎水性基を導入したものをマイクロキャリアとして用いてもよい。疎水性基としては、典型的には、鎖状又は環状炭化水素基、芳香族炭化水素基等が挙げられる。

【0083】

細胞適合性の観点から、ハイドロゲルから形成されるマイクロキャリアを用いてもよい。このハイドロゲルとしては、ポリビニルアルコール、(メタ)アクリル系ポリマのナトリウム塩、親水性基が多量に導入された共重合体、ゼラチン等の親水性ポリマに疎水性基を導入したハイドロゲルを用いることができる。疎水性基としては、典型的には、鎖状又は環状炭化水素基、芳香族炭化水素基等が挙げられる。

10

【0084】

上記したマイクロキャリアは、1種単独で、又は2種以上を組み合わせて用いてもよい。これらの中でも、疎水性ポリマ又は疎水性基を有するポリマは、一実施形態によって評価対象になり得るポリマであり、好ましく用いることができる。

なお、細胞懸濁液に含まれる疎水部を有するポリマが、マイクロキャリアに由来しない場合であっても、評価対象となり得る。

20

【0085】

細胞の付着を促進する観点から、マイクロキャリアの表面には、カチオン性官能基が導入されていてもよい。カチオン性官能基として、ジメチルアミノ基、ジエチルアミノ基、アミノ基等の置換又は非置換のカチオン性アミノ基を含む基などが挙げられる。

細胞の付着を促進する観点から、マイクロキャリアの表面には、細胞接着性ポリマが配置されていてもよい。細胞接着性ポリマとしては、コラーゲン、ゼラチン、アルギン酸、Matrigel(商標)(BD Biosciences)、ヒアルロン酸、ラミニン、フィブロネクチン、ビトロネクチン、エラスチン、ヘパラン硫酸、デキストラン、デキストラン硫酸、コンドロイチン硫酸等が挙げられる。

【0086】

マイクロキャリアの形状としては、例えば、球状、扁平状、円柱状、板状、角柱状等が挙げられる。マイクロキャリアは、球状マイクロキャリアを含むことが好ましい。マイクロキャリアは、内部に細孔を有する多孔質マイクロキャリアであっても、内部に細孔を有しないマイクロキャリアであってもよい。

30

【0087】

マイクロキャリアの平均粒子径(D50)は、細胞の増殖促進の観点から、例えば50~1,000 μm であり、100~500 μm であることが好ましく、120~250 μm がより好ましく、150~250 μm であることがさらに好ましい。マイクロキャリアの平均粒子径は、生理食塩水又は培地中のメジアン径(D50)として測定した値とする。マイクロキャリアの平均粒子径は、レーザー回折散乱式の粒子径分布測定装置により測定することができる。

40

細胞培養に用いるマイクロキャリアは、細胞培養に供される細胞のサイズよりも大きいことが好ましい。

【0088】

以下、細胞懸濁液に蛍光色素を添加し励起光を照射して蛍光分析し、細胞懸濁液を評価する方法について説明する。

【0089】

蛍光色素を添加した細胞懸濁液の蛍光を分析する方法は、特に限定されない。

蛍光色素を添加した細胞懸濁液に励起光を照射する場合に、細胞懸濁液中に蛍光が観察されることで、細胞懸濁液中に疎水部を有するポリマが存在することを確認することがで

50

きる。なお、細胞懸濁液中に疎水部を有するポリマが存在するか否かを確認するためには、細胞懸濁液中で、細胞が蛍光しないで疎水部を有するポリマが蛍光するか、又は細胞からの蛍光が弱く疎水部を有するポリマからの蛍光が強いことが好ましい。このような蛍光色素としては、上記した蛍光色素の中から多価アニオン化合物を用いることができる。また、細胞懸濁液の環境によって蛍光特性が異なる蛍光色素を用いることができ、例えば、上記した蛍光色素の中からポリアルキレングリコール鎖を有する化合物、又はナフトフルオレセインを用いることができる。

また、細胞懸濁液からの蛍光を分析することで、蛍光強度の差から、疎水部を有するポリマの量を対比して評価することができる。

【0090】

細胞懸濁液の蛍光の分析によって、疎水部を有するポリマの存在又はその量を評価することができるが、さらに、疎水部を有するポリマのサイズ、形状、濃度等、又はこれらの組み合わせを測定することができる。例えば、蛍光色素を添加した細胞懸濁液に励起光を照射しながら蛍光顕微鏡観察を行うことで、疎水部を有するポリマが含まれる場合は、蛍光色素によって染色された疎水部を有するポリマを観察することができる。また、蛍光顕微鏡観察の画像分析から、疎水部を有するポリマのサイズ、分布、濃度等を測定することができる。他の方法では、蛍光色素を添加した細胞懸濁液に励起光を照射しながら分光蛍光光度分析することで、疎水部を有するポリマが含まれる場合は、ブランクと比べて蛍光強度の高低を確認することができる。また、予め検量線を作成しておくことで、蛍光強度から、疎水部を有するポリマの濃度等を測定することができる。

細胞懸濁液に照射する励起光は、蛍光色素の種類に応じて、蛍光が強く発せられる波長範囲であることが好ましい。

【0091】

細胞懸濁液の評価方法としては、細胞懸濁液に細胞のサイズ以下の粒子径である疎水部を有するポリマが存在することを評価することを含むことができる。

細胞培養後に細胞懸濁液から細胞のみを取り出す方法としては、細胞と細胞以外の固形物とのサイズの違いに基づいて、フィルタ等を用いて細胞懸濁液から細胞以外の固形物を除去することが行われている。この方法は、細胞よりも大きなサイズの固形物を除去することに適するが、細胞よりも小さいか、又は細胞と同じ程度のサイズの固形物を除去することには適さない。なお、細胞よりも遥かに小さいサイズの固形物は、細胞懸濁液の溶媒を置換する等の方法によって洗浄することで、除去することが可能である。一方で、細胞培養に供するマイクロキャリアの原料に由来して含まれるポリマの小片等が、細胞のサイズと同じ程度か、又はそれ以下であると、これらの小粒子径のポリマは、細胞懸濁液から除去されずに混入している可能性がある。

【0092】

一実施形態では、細胞懸濁液が小粒子径の疎水部を有するポリマを含むか否か評価するために、上記した評価方法を用いることができる。例えば、細胞懸濁液が小粒子径の疎水部を有するポリマを含むことは、細胞懸濁液に蛍光色素を添加して、蛍光を検出することで、疎水部を有するポリマの存在を評価することができる。また、上記した評価方法で説明した通り、蛍光色素が添加された細胞懸濁液を蛍光顕微鏡観察することで、疎水部を有するポリマの存在の有無、形状、分布、濃度等を評価することができる。また、蛍光色素が添加された細胞懸濁液を分光蛍光光度分析することで、疎水部を有するポリマの存在の有無を評価可能であり、検量線を作成しておくことで濃度等を評価することができる。

【0093】

本明細書において、疎水部を有するポリマは、蛍光顕微鏡観察によって観察される写真画像からサイズを判別することができる。例えば、評価対象に適する小片状の疎水部を有するポリマは、100 nm ~ 100 μmの粒子径の範囲であってよく、100 nm ~ 10 μmの粒子径の範囲であってよい。

【0094】

本開示において、細胞のサイズは、細胞の種類に応じて異なり得るものであるが、通常

10

20

30

40

50

、100 μm以下であり、60 μm以下であってよく、30 μm以下であってよく、20 μm以下であってよい。また、細胞のサイズは、特に限定されないが、通常、1 μm以上であり、5 μm以上であってよく、10 μm以上であってよい。例えば、細胞懸濁液は、1 ~ 100 μmの細胞、好ましくは5 ~ 20 μmの細胞を含むことができる。

ここで、細胞のサイズの測定方法については特に制限はなく、例えば、セルソータ又はフローサイトメータを用いた既知の方法によって測定可能である。

【0095】

細胞懸濁液の評価方法としては、細胞懸濁液に細胞のサイズの0.01倍~5倍の粒子径である疎水部を有するポリマが存在することを評価することを含むことができる。

評価対象の疎水部を有するポリマの粒子径としては、細胞のサイズの0.01倍以上が好ましく、0.05倍以上であってよく、0.1倍以上であってよい。疎水部を有するポリマの粒子径がこの範囲であることで、蛍光色素が疎水部を有するポリマを染色して蛍光する場合に、蛍光を検出することができる。

評価対象の疎水部を有するポリマの粒子径としては、細胞のサイズの5倍以下が好ましく、4倍以下であってよく、3倍以下であってよい。この範囲の粒子径である疎水部を有するポリマは、細胞培養後にマイクロキャリアの除去、洗浄等、又はこれらの組み合わせを行った状態においても、細胞懸濁液に含まれ得ることから、評価対象になり得る。

例えば、評価対象の疎水部を有するポリマの粒子径は、細胞のサイズの0.01倍~5倍であってよく、細胞のサイズの0.05倍~4倍であってよく、細胞のサイズの0.1倍~3倍であってよい。

【0096】

細胞懸濁液は、細胞とマイクロキャリアとを用いて細胞培養を行い、細胞培養後に細胞とマイクロキャリアとを分離し、マイクロキャリアを除去した後の細胞懸濁液とすることができる。この細胞培養後の細胞懸濁液に添加される蛍光色素は、細胞培養で用いたマイクロキャリアと同じ材料である疎水部を有するポリマを染色することが好ましい。例えば、上記した蛍光色素を用いることができる。

これによって、細胞培養に供されたマイクロキャリアを、細胞培養後に細胞懸濁液から除去した状態で、細胞懸濁液に含まれ得るマイクロキャリアの小片等の小粒子径の疎水部を有するポリマを評価することができる。

【0097】

細胞培養後に、細胞懸濁液からマイクロキャリアを除去する方法は、特に限定されないが、マイクロキャリアから適宜の方法によって細胞を剥離し、マイクロキャリアと細胞とのサイズの違いから、フィルタ等を用いてより大粒子径のマイクロキャリアを除去することができる。

任意的な工程として、細胞培養後の細胞懸濁液を洗浄することを含んでもよい。これによって、細胞懸濁液に含まれる細胞よりも小さな固形物、例えばマイクロキャリア原料に含まれ得る小片を除去することができる。

【0098】

細胞培養後の細胞懸濁液を用いる場合に、(1)細胞懸濁液に細胞のサイズ以下の粒子径である疎水部を有するポリマが存在することを評価すること、及び(2)細胞培養で用いたマイクロキャリアの平均粒子径以下の粒子径である疎水部を有するポリマが存在することを評価することの少なくとも一方を評価することが好ましい。(1)の評価と(2)の評価を組み合わせる場合は、(1)の評価の後に(2)の評価を行ってもよく、その逆の順序であってよく、(1)の評価と(2)の評価を同時に行ってもよい。

これによって、細胞培養に供されたマイクロキャリアを、細胞培養後に細胞懸濁液から除去した状態で、細胞懸濁液に含まれ得るマイクロキャリア由来の小粒子径の疎水部を有するポリマを測定することができる。

【0099】

上記した通り、細胞培養後に、細胞よりも大きいサイズの固形物は、フィルタ等を用いて細胞懸濁液から除去可能であるが、細胞よりも大きく、細胞培養で用いた疎水性マイク

10

20

30

40

50

ロキャリアよりも小さいサイズの固形物が残留する場合がある。

そこで、細胞のサイズ以下の粒子径である疎水部を有するポリマだけではなく、細胞よりも大きいサイズで、マイクロキャリアの平均粒子径以下の粒子径である疎水部を有するポリマの存在を評価してもよい。例えば、細胞懸濁液からマイクロキャリアを除去するに適した孔サイズのフィルタを用いる場合には、マイクロキャリアの平均粒子径よりも小さい粒子径の疎水部を有するポリマが細胞懸濁液に混入した状態になる。このような小粒子径の疎水部を有するポリマとしては、例えば、マイクロキャリアの原料由来の小片等が挙げられる。

【0100】

<細胞懸濁液>

一実施形態による細胞懸濁液としては、細胞を含み、 $1\ \mu\text{m}$ 以下の疎水部を有するポリマの個数は、細胞 1×10^4 個当たり10個以下であることを特徴とする。

これによれば、マイクロキャリア由来の不純物の混入有無が評価された細胞懸濁液を提供することができる。

【0101】

細胞懸濁液は、細胞が分散媒中に分散している状態の液体である。詳細については上記した通りである。細胞懸濁液として提供されるものとしては、細胞培養後にマイクロキャリア等の細胞担体が除去された状態のものであることが好ましい。

細胞培養後にマイクロキャリア等の細胞担体が除去された細胞懸濁液には、マイクロキャリアそのものは含まれないことが好ましく、さらに、マイクロキャリアの一部、中でも疎水性のマイクロキャリア由来の小粒子径の疎水部を有するポリマが含まれないことが好ましい。

【0102】

細胞懸濁液において、典型的な細胞のサイズ以下の粒子径の疎水部を有するポリマの個数が少ないことが好ましく、例えば、 $1\ \mu\text{m}$ 以下の疎水部を有するポリマの個数が少ないことが好ましい。

細胞懸濁液において、 $1\ \mu\text{m}$ 以下の疎水部を有するポリマの個数は、細胞 1×10^4 個当たり10個以下であることが好ましく、8個以下がより好ましく、6個以下がさらに好ましい。

細胞懸濁液において、 $1\ \mu\text{m}$ 以下の疎水部を有するポリマの個数は、細胞 1×10^4 個当たり0個、すなわち検出されない状態であってよいが、小粒子径の疎水部を有するポリマを完全に除去するための追加的な手順が必要とされない範囲で、細胞 1×10^4 個当たり0超過であってよく、1個以上であってよい。

例えば、 $1\ \mu\text{m}$ 以下の疎水部を有するポリマの個数は、細胞 1×10^4 個当たり、0~10であってよく、0超過~8であってよく、1~6であってよい。

【0103】

ここで、細胞懸濁液において、細胞 1×10^4 個当たり $1\ \mu\text{m}$ 以下の疎水部を有するポリマの個数の測定方法は、細胞懸濁液に蛍光色素を添加し、疎水部を有するポリマを染色させた状態で、顕微鏡観察等を用いて画像観察を行い、所定領域内に観察される疎水部を有するポリマの粒子径を測定し、当該所定領域内に観察される細胞の個数と $1\ \mu\text{m}$ 以下の疎水部を有するポリマの個数をカウントすることで、求めることができる。また、疎水部を有するポリマは、蛍光顕微鏡観察によって観察される写真画像からサイズを判別することができる。

細胞 1×10^4 個当たり $1\ \mu\text{m}$ 以下の疎水部を有するポリマの個数は、画像観察に用いる画像を用いて、画像解析を行って演算処理して求めることも可能である。疎水部を有するポリマの粒子径も同様に画像解析によって求めることが可能である。

画像観察においては、細胞懸濁液をそのまま用いてもよいが、細胞と疎水部を有するポリマの割合が変更されない範囲で溶剤を添加して希釈してから、この希釈した細胞懸濁液を用いてもよい。

【0104】

10

20

30

40

50

他の実施形態による細胞懸濁液としては、細胞と、疎水部を有するポリマを染色可能な蛍光色素とを含み、前記蛍光色素によって前記疎水部を有するポリマが染色されて蛍光する蛍光強度は、前記蛍光色素によって前記細胞が染色されて蛍光する蛍光強度より高い、ことを特徴とする。

これによれば、マイクロキャリア由来の不純物の混入有無が評価された細胞懸濁液を提供することができる。

【0105】

細胞懸濁液は、細胞が分散媒中に分散している状態の液体である。詳細については上記した通りである。細胞懸濁液として提供されるものとしては、細胞培養後にマイクロキャリア等の細胞担体が除去された状態のものであることが好ましい。

細胞培養後にマイクロキャリア等の細胞担体が除去された細胞懸濁液には、マイクロキャリアはもちろん含まれないことが好ましく、さらに、マイクロキャリア、中でも疎水性のマイクロキャリア由来の小粒子径の疎水部を有するポリマが含まれないことが好ましい。

例えば、上記した通り、細胞懸濁液において、 $1\ \mu\text{m}$ 以下の疎水部を有するポリマの個数は、細胞 1×10^4 個当たり10個以下であることが好ましい。

【0106】

この細胞懸濁液には、細胞とともに蛍光色素が含まれることが好ましい。蛍光色素としては、上記した通りである。細胞懸濁液に細胞と蛍光色素が含まれる状態で、細胞懸濁液に励起光を照射すると、細胞懸濁液に疎水部を有するポリマが含まれる場合には蛍光を検出することができる。言い換えれば、細胞懸濁液に細胞と蛍光色素が含まれる状態で、細胞懸濁液に励起光を照射すると、細胞懸濁液に疎水部を有するポリマが含まれないか、又は蛍光しない程度の量である場合には蛍光が検出されないであろう。

例えば、この細胞懸濁液は、細胞培養後に蛍光色素を添加しておき、細胞懸濁液を使用する際に励起光を照射することで、細胞懸濁液中の疎水部を有するポリマの存在、又は蛍光強度から濃度等を確認することができる。細胞懸濁液を用意する工程と、細胞懸濁液を使用する工程とが時間的又は空間的に離れている場合に、細胞懸濁液を用意する工程側で厳密な製品管理をせずとも、細胞懸濁液を使用する工程において、細胞懸濁液中の疎水部を有するポリマの存在、又は蛍光強度から濃度等を簡便に確認することができる。

【0107】

<細胞懸濁液の評価用試薬>

一実施形態による細胞懸濁液の評価用試薬としては、疎水部を有するポリマを染色可能な蛍光色素と緩衝液とを含み、浸透圧が $100 \sim 400\ \text{mosm/Kg}$ である、ことを特徴とする。

この試薬を用いることで、細胞懸濁液へのマイクロキャリア由来の不純物の混入有無を評価することができる。

【0108】

この試薬を細胞懸濁液に添加することで、細胞懸濁液に疎水部を有するポリマが含まれる場合は、細胞懸濁液に励起光を照射して細胞懸濁液からの蛍光を検出することで、細胞懸濁液に疎水部を有するポリマが存在することを評価することができる。細胞懸濁液に疎水部を有するポリマが存在しない場合は、細胞懸濁液からの蛍光が検出されないであろう。

この試薬を細胞懸濁液に添加し、細胞懸濁液に励起光を照射して細胞懸濁液からの蛍光を蛍光顕微鏡で観察することで、疎水部を有するポリマが存在する場合は、疎水部を有するポリマの形状、分布、濃度等をさらに評価することができる。

この試薬を細胞懸濁液に添加し、細胞懸濁液に励起光を照射して細胞懸濁液からの蛍光を分光蛍光光度分析することで、疎水部を有するポリマが存在する場合は、疎水部を有するポリマの量、濃度等をさらに評価することができる。

詳細については上記した手順を適用することができる。

【0109】

この試薬において、蛍光色素には上記した蛍光色素を用いることができる。この試薬において、緩衝液には、リン酸緩衝液等を用いることができる。評価対象となる疎水部を有

10

20

30

40

50

するポリマは、上記した疎水部を有するポリマと共通するものである。

この試薬において、蛍光色素の濃度は、 $1 \sim 1000 \mu\text{g}/\text{mL}$ が好ましい。

【0110】

この試薬の浸透圧は、 $100 \sim 400 \text{mosm}/\text{Kg}$ が好ましい。これによって、試薬自体が細胞へ浸透することを抑制して、疎水部を有するポリマを選択的に染色可能となり、細胞懸濁液中の疎水部を有するポリマの存在又はその量を評価することに役立てることができる。

この試薬の浸透圧は、 $100 \text{mosm}/\text{Kg}$ 以上が好ましく、 $200 \text{mosm}/\text{Kg}$ 以上がより好ましく、 $250 \text{mosm}/\text{Kg}$ 以上がさらに好ましい。

この試薬の浸透圧は、 $400 \text{mosm}/\text{Kg}$ 以下が好ましく、 $375 \text{mosm}/\text{Kg}$ 以下がより好ましく、 $350 \text{mosm}/\text{Kg}$ 以下がさらに好ましい。

10

ここで、浸透圧は、半透膜を介して片方に溶媒である水、他方に溶液をおいたとき、半透膜を通過して溶液側へと浸透する水の移動を止めるために溶液側に加えられた圧である。

【0111】

一実施形態によれば、細胞懸濁液を評価するための、疎水部を有するポリマを染色可能な蛍光色素と緩衝液とを含み、浸透圧が $100 \sim 400 \text{mosm}/\text{Kg}$ である試薬の使用を提供することができる。

【0112】

<マイクロキャリアの評価方法>

一実施形態によるマイクロキャリアの評価方法としては、細胞培養に用いるためのマイクロキャリアと液体を含むか、又は前記マイクロキャリアを処理した後の液体を含む試料を用意すること、前記試料に、疎水部を有するポリマを染色可能な蛍光色素を添加し蛍光分析すること、及び前記試料の蛍光分析から、前記マイクロキャリアを評価することを含む、ことを特徴とする。

20

これによれば、ポリマ小片の混入有無が評価されたマイクロキャリアを提供することができる。例えば、この評価方法を用いて、マイクロキャリアに小粒子径の疎水部を有するポリマの含有量が少ないことを確認したうえで、このマイクロキャリアを用いて細胞懸濁液を用意することで、得られる細胞懸濁液において、小粒子径の疎水部を有するポリマの含有量を低減することができる。

【0113】

30

細胞培養に用いるためのマイクロキャリアは、未使用状態のマイクロキャリアであってもよいが、細胞培養後に回収されて再利用されるマイクロキャリアであってもよい。この評価対象のマイクロキャリアには、上記したマイクロキャリアを用いることができる。一実施形態では、疎水性ポリマ、疎水性基を有するポリマ等によって形成されるマイクロキャリアを好ましく評価することができる。

【0114】

マイクロキャリアと液体を含む試料において、液体としては、水性液体であることが好ましく、主溶媒が水であることが好ましい。

マイクロキャリアを処理した後の液体を含む試料としては、例えば、マイクロキャリア原料を液体中に分散させた後、マイクロキャリアを取り除いた状態の液体を含む。具体的には、マイクロキャリアを液体によって洗浄し、マイクロキャリアを回収した後の液体である。この液体としては、水性液体であることが好ましく、主溶媒が水であることが好ましい。

40

試料において、マイクロキャリアの濃度は、特に限定されないが、 $0.1 \sim 100 \text{g}/\text{L}$ 、 $1 \sim 100 \text{g}/\text{L}$ 、 $1 \sim 50 \text{g}/\text{L}$ 、又は $1 \sim 20 \text{g}/\text{L}$ とすることができる。試料においてマイクロキャリアが高濃度である場合は、蛍光分析に適する範囲になるように、追加の液体で希釈してもよい。

【0115】

試料に添加される蛍光色素には、上記した蛍光色素を用いることができる。マイクロキャリアの評価方法では、試料に細胞が存在しないことから、疎水部を有するポリマを染色

50

可能な蛍光色素であればいずれも好ましく用いることができる。汎用性又は蛍光強度の観点から、クマリン色素、DCM色素を好ましく用いることができる。

蛍光色素の添加方法、蛍光の分析方法は、上記した方法を適用することができる。

【0116】

以下、試料に蛍光色素を添加し励起光を照射して蛍光分析し、マイクロキャリアを評価する方法について説明する。

【0117】

蛍光色素を添加した試料の蛍光を分析する方法は、特に限定されない。

蛍光色素を添加した試料に励起光を照射する場合に、試料中に蛍光が観察されることで、試料中に疎水部を有するポリマが存在することを確認することができる。

また、試料からの蛍光を分析することで、蛍光強度の差から、疎水部を有するポリマの量を対比して評価することができる。

【0118】

試料の蛍光分析によって、疎水部を有するポリマの存在又はその量を評価することができるが、さらに、疎水部を有するポリマのサイズ、形状、濃度等、又はこれらの組み合わせを測定することができる。測定には、例えば、蛍光顕微鏡、分光蛍光強度分析を用いることができる。詳細については、上記した測定方法を適用することができる。

【0119】

マイクロキャリアの評価方法としては、例えば、試料に1 μm以下の粒子径である疎水部を有するポリマが存在すること、又はその量を評価することを含むことができる。典型的なマイクロキャリアの平均粒子径は、120 ~ 250 μmであるため、1 μm以下の小粒子径の小片の存在、又はその量を評価するとよい。

【0120】

マイクロキャリアと液体を含む試料を用いて評価する場合は、試料にマイクロキャリアが含まれる状態であり、さらに小粒子径の疎水部を有するポリマが含まれ得る状態である。そのため、試料に蛍光色素を添加するとマイクロキャリアからの蛍光が検出され得るが、さらに小粒子径の疎水部を有するポリマからも蛍光が発せられる可能性がある。この場合、蛍光顕微鏡等を用いて、画像観察することで、マイクロキャリアと小粒子径の疎水部を有するポリマとを判別し、小粒子径の疎水部を有するポリマが存在することを評価することができる。

【0121】

マイクロキャリアを処理した後の液体を含む試料として、液体からマイクロキャリアを除去した試料を用いて評価する場合は、試料にマイクロキャリアが含まれない状態であるが、マイクロキャリアよりも小粒子径の疎水部を有するポリマが含まれ得る状態である。そのため、試料に蛍光色素を添加して蛍光を検出することで、試料に小粒子径の疎水部を有するポリマが存在するか否かを評価することができる。この評価結果から、さらに処理に供したマイクロキャリアに小粒子径の疎水部を有するポリマが含まれていただろうことを評価することができる。また、蛍光色素を添加した試料を蛍光顕微鏡で観察することで、疎水部を有するポリマの形状、分布、濃度等を評価することができる。処理対象のマイクロキャリアに含まれたであろう小粒子径の疎水部を有するポリマの存在を評価することができる。また、蛍光色素を添加した試料の蛍光強度を測定することで、処理対象のマイクロキャリアに含まれたであろう小粒子径の疎水部を有するポリマの量、濃度等を評価することができる。

【0122】

<細胞懸濁液の製造方法>

以下、マイクロキャリアの評価方法、細胞懸濁液の評価方法、又はこれらの組み合わせを用いて、細胞懸濁液を製造する方法の一例について説明する。

一例の細胞懸濁液の製造方法(A)としては、細胞培養用のマイクロキャリアを洗浄し、濾過すること、濾過後の濾液に、疎水部を有するポリマを染色可能な蛍光色素を添加し蛍光分析すること、濾液の蛍光分析によってマイクロキャリアを評価すること、及び評価

10

20

30

40

50

されたマイクロキャリアを用いて細胞培養を行うことを含む。

【0123】

他の例の細胞懸濁液の製造方法（B）としては、マイクロキャリアを含む組成物を用いて細胞を培養すること、培養後の細胞とマイクロキャリアと含む細胞懸濁液からマイクロキャリアを除去すること、マイクロキャリアを除去した細胞懸濁液に、疎水部を有するポリマを染色可能な蛍光色素を添加し蛍光分析すること、及びマイクロキャリアを除去した細胞懸濁液の蛍光分析によって、細胞懸濁液を評価することを含む。

【0124】

さらに他の例の細胞懸濁液の製造方法（C）としては、上記製造方法（A）において評価されたマイクロキャリアを用いて細胞培養を行って細胞懸濁液を得ること、培養後の細胞とマイクロキャリアと含む細胞懸濁液からマイクロキャリアを除去すること、マイクロキャリアを除去した細胞懸濁液に、疎水部を有するポリマを染色可能な蛍光色素を添加し蛍光分析すること、マイクロキャリアを除去した細胞懸濁液の蛍光分析によって、細胞懸濁液を評価することを含む。

10

これらの実施形態によれば、それぞれ、細胞懸濁液への疎水部を有するポリマの混入有無を評価して、細胞懸濁液を提供することができる。

【0125】

以下、細胞懸濁液の製造方法（A）を図5に示すフローチャートを用いて説明する。

まず、マイクロキャリアを洗浄及び濾過する工程（S11）では、粉末状又は分散液状のマイクロキャリアを液体と混合し攪拌することで洗浄し、洗浄後にフィルタ等を用いて濾過し、マイクロキャリアと濾液とを分離する。例えば、典型的なサイズのマイクロキャリアを分離するために、孔径1～100 μm 、好ましくは10～50 μm のフィルタを用いるとよい。

20

次いで、濾液に蛍光色素を添加する工程（S12）では、濾液に蛍光色素を添加する。蛍光色素は、疎水部を有するポリマを染色可能な色素を用いることが好ましく、例えば、上記した蛍光色素を用いるとよい。また、濾液への蛍光色素の添加方法は特に限定されずに、上記した方法を用いるとよい。

【0126】

次いで、蛍光色素が添加された濾液の蛍光強度が基準値以下か判断する工程（S13）では、蛍光色素が添加された濾液に励起光を照射し蛍光強度を測定し、測定値が基準値以下であるかを判断する。この蛍光強度が低いことは、濾液に含まれる疎水部を有するポリマの量が少ないことを示しており、結果としてマイクロキャリアに含まれる疎水部を有するポリマの薄片が少ないことを評価することができる。マイクロキャリアに疎水部を有するポリマの薄片が含まれないか、又は疎水部を有するポリマの薄片の量が少ないことを確認したうえで、細胞培養にマイクロキャリアを供することで、最終的に得られる細胞懸濁液への疎水部を有するポリマの薄片の混入をより防止することができる。

30

S13での基準値としては、各種の細胞培養で要求される適宜基準を満たすように設定すればよい。一例としては、洗浄に供したマイクロキャリアを1 μm 以下に破碎した状態の疎水部を有するポリマを濃度10質量%、好ましくは1質量%で含む水の蛍光強度を基準値として用いることができる。他の例では、平均粒子径1 μm のポリスチレンを10g/L、好ましくは1g/Lで含む水の蛍光強度を基準値として用いることができる。さらに他の方法では、蛍光顕微鏡の観察によって、粒子径1 μm 以下のポリマの薄片が、単位面積当たり10個/ m^2 である状態を基準値として用いることができる。

40

【0127】

S13において、蛍光色素が添加された濾液に励起光を照射し蛍光強度を測定する方法に代えて、蛍光色素が添加された濾液に励起光を照射し蛍光顕微鏡又は目視によって蛍光を検出する方法を用いてもよい。また、蛍光色素が添加された濾液に励起光を照射し、蛍光顕微鏡を用いて疎水部を有するポリマの形状、サイズ、濃度等を測定し、これらの結果から、濾液への疎水部を有するポリマの混入の状態を観察してもよい。この観察結果から、マイクロキャリアを細胞培養に供するか否かを判断することも可能である。

50

【0128】

次いで、S13において基準値を満たす場合、マイクロキャリアを細胞培養に供することができる(S14)。S13において基準値を満たさない場合、再度S11に戻り、基準値を満たすまで再洗浄を繰り返すことも可能である。

【0129】

次に、細胞懸濁液の製造方法(B)を図6に示すフローチャートを用いて説明する。

まず、細胞とマイクロキャリアを含む組成物を用いて培養する工程(S21)では、細胞とマイクロキャリアを含む組成物を用いて通常の方法にしたがって細胞培養することができる。

次いで、細胞をマイクロキャリアから剥離する工程(S22)では、通常の方法にしたがって細胞をマイクロキャリアから剥離することができる。例えば、トリプシン等のタンパク質分解酵素などを細胞懸濁液に添加し、マイクロキャリアから細胞を剥離することができる。

10

【0130】

次いで、細胞懸濁液からマイクロキャリアからを除去する工程(S23)では、通常の方法にしたがって、細胞とマイクロキャリアとを分離することができる。例えば、フィルタ等を用いて、細胞よりも大きい粒子径を有する粗大粒子を除去することで、細胞とマイクロキャリアを分離することができる。例えば、典型的なサイズのマイクロキャリアを除去するために、孔径10~150 μm 、好ましくは50~100 μm のフィルタを用いるとよい。この方法では、細胞と同じか、又は細胞よりも小さい粒子径を有する微小粒子は除去されないため、細胞と疎水部を有するポリマの小片とは分離されずに、細胞懸濁液に細胞とともに疎水部を有するポリマの小片が残留する可能性がある。また、細胞とマイクロキャリアとの比重が異なる場合は、遠心分離を用いて分離することも可能である。

20

【0131】

次いで、細胞懸濁液を洗浄する工程(S24)は、任意的な工程であって必要に応じて設けるとよい。このS24では、例えば、細胞懸濁液の分散媒を置換すること等によって、細胞懸濁液に含まれ得る微小粒子を除去することができる。細胞懸濁液には、マイクロキャリアの原料自体に混入し得る疎水部を有するポリマの小片等が含まれる可能性がある。このような疎水部を有するポリマの小片は、細胞よりも小さい粒子径である範囲で、洗浄によって除去することができる。

30

S23及びS24を通して、細胞よりも大きい粗大粒子と細胞よりも小さい微小粒子は除去することができるが、細胞と同じか、又は細胞と同程度の大きさの粒子は、細胞懸濁液から除去されない状態である。

【0132】

次いで、濾液に蛍光色素を添加する工程(S25)では、細胞懸濁液に蛍光色素を添加する。蛍光色素は、疎水部を有するポリマを染色可能な色素を用いることが好ましく、例えば、上記した蛍光色素を用いるとよい。また、細胞懸濁液への蛍光色素の添加方法は特に限定されずに、上記した方法を用いるとよい。

【0133】

次いで、蛍光色素が添加された細胞懸濁液の蛍光強度が基準値以下か判断する工程(S26)では、蛍光色素が添加された細胞懸濁液に励起光を照射し蛍光強度を測定し、測定値が基準値以下であるかを判断する。この蛍光強度が低いことは、細胞懸濁液に含まれる疎水部を有するポリマの量が少ないことを示している。

40

S26での基準値としては、各種の細胞培養で要求される適宜基準を満たすように設定すればよい。一例としては、細胞培養に供したマイクロキャリアを1 μm 以下に破碎した状態の疎水部を有するポリマを濃度10質量%、好ましくは1質量%で含む水の蛍光強度を基準値として用いることができる。他の例では、平均粒子径1 μm のポリスチレンを10g/L、好ましくは1g/Lで含む水の蛍光強度を基準値として用いることができる。さらに他の方法では、蛍光顕微鏡の観察によって、粒子径1 μm 以下のポリマの小片が、単位面積あたりに10個/ m^2 である状態を基準値として用いることができる。

50

【 0 1 3 4 】

S 2 6において、蛍光色素が添加された細胞懸濁液に励起光を照射し蛍光強度を測定する方法に代えて、蛍光色素が添加された細胞懸濁液に励起光を照射し蛍光顕微鏡又は目視によって蛍光を検出する方法を用いてもよい。また、蛍光色素が添加された細胞懸濁液に励起光を照射し、蛍光顕微鏡を用いて疎水部を有するポリマの形状、サイズ、濃度等を測定し、これらの結果から、細胞懸濁液への疎水部を有するポリマの混入の状態を観察してもよい。この観察結果から、細胞懸濁液への疎水部を有するポリマの混入量を評価することも可能である。また、この観察結果を用いて、細胞懸濁液から疎水部を有するポリマをさらに除去することも可能である。

【 0 1 3 5 】

以下、マイクロキャリアを用いて細胞を培養する方法の一例を説明する。

一実施形態による細胞培養方法は、マイクロキャリアを用意すること、マイクロキャリアを培養系に配置すること、及びマイクロキャリアの存在下で、細胞を培養することを含むことができる。

マイクロキャリアを培養系に配置する工程では、例えば、予め対象細胞を培養系に播種し、その後の培養系に、マイクロキャリアを配置することができる。

【 0 1 3 6 】

培養対象となり得る細胞には、マイクロキャリアによって支持された状態で細胞の成長が促進され得る細胞を用いるとよく、例えば接着細胞が好ましい。細胞は体細胞であってよく、例えば幹細胞、前駆細胞、分化した細胞等であってよく、幹細胞が好ましい。

細胞は、動物由来の細胞であることが好ましく、哺乳動物由来の細胞であることがより好ましい。哺乳動物として、例えば、ヒト、サル、チンパンジー、ウシ、ブタ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、ラット、マウス、モルモット、イヌ、ネコ等が挙げられる。細胞が由来する組織は、特に限定されず、例えば、皮膚、肝臓、腎臓、筋肉、骨、血管、血液、神経組織等であってよい。細胞は、初代培養細胞、培養細胞株、組換え培養細胞株等であってよい。

【 0 1 3 7 】

幹細胞としては、例えば、間葉系幹細胞、造血幹細胞、神経幹細胞、骨髄幹細胞、生殖幹細胞、歯髄幹細胞等の体性幹細胞などが挙げられ、好ましくは間葉系幹細胞である。間葉系幹細胞は、個体の様々な組織に存在し、骨芽細胞、軟骨細胞及び脂肪細胞等の間葉系の細胞の全て又はいくつかへの分化が可能な体性幹細胞を広義に意味する。間葉系幹細胞としては、例えば、骨髄由来の間葉系幹細胞、臍帯由来の間葉系幹細胞、脂肪組織由来の間葉系幹細胞等が挙げられ、好ましくは骨髄由来の間葉系幹細胞である。

幹細胞として、例えば、人工多能性幹細胞（i P S細胞）、胚性幹細胞（E S細胞）、胚性生殖幹細胞（E G細胞）、多能性生殖幹細胞（m G S細胞）、胚性腫瘍細胞（E C細胞）、M u s e細胞等の多能性幹細胞を用いてもよい。

【 0 1 3 8 】

細胞としては、例えば、内皮細胞、表皮細胞、上皮細胞、心筋細胞、筋芽細胞、神経細胞、骨細胞、骨芽細胞、線維芽細胞、脂肪細胞、肝細胞、腎細胞、膵細胞、副腎細胞、歯根膜細胞、歯肉細胞、骨膜細胞、皮膚細胞、樹状細胞、マクロファージ、リンパ球等の分化した細胞；幹細胞からこれらの分化した細胞への前段階にある前駆細胞などであってもよい。

上記した細胞は、1種を単独で、又は、2種以上を組み合わせ用いることができる。

【 0 1 3 9 】

細胞を培養するために用いられる培地は、無機塩、アミノ酸、糖、及び水を含有することが好ましい。培地は、血清、ビタミン、ホルモン、抗生物質、増殖因子、接着因子等の任意の成分を更に含有してもよい。培地として、細胞培養用の基礎培地として知られている培地を使用することができる。

【 0 1 4 0 】

すなわち、培地として、選択された細胞を培養するために用いられることが知られてい

10

20

30

40

50

るものであれば特に制限なく使用することができ、例えば、DMEM（ダルベッコ改変イーグル培地）、MEM（イーグル最小必須培地）、MEM培地（イーグル最小必須培地改変型）等が挙げられるが、これらに限定されない。

【0141】

培地に血清を添加する場合は、例えば、ウシ胎仔血清（FBS）、ウマ血清、ヒト血清等の血清などを用いることができる。

培養に用いられる培地は、異種由来成分を含まないものであってよい。異種由来成分を含まない培地は、動物由来の血清の代わりに、血清の代替添加物（例えばKnockout Serum Replacement（KSR）（Invitrogen社製）、Chemically-defined Lipid concentrated（Gibco社製）、Glutamax（Gibco社製））等を含むことができる。

10

その他、Essential 8（Thermo Fisher社）、mTeSR1（STEMCELL Technologies社）、StemFitシリーズ（タカラバイオ株式会社）、StemFlex（Thermo Fisher Scientific社）等の無血清培地を用いることができる。

【0142】

培地には、必要に応じて、添加剤を添加してもよい。添加剤としては、例えば、ビタミンA、ビタミンB1、ビタミンB2、ビタミンB6、ビタミンB12、ビタミンC、ビタミンD等のビタミン；葉酸等の補酵素；グリシン、アラニン、アルギニン、アスパラギン、グルタミン、イソロイシン、ロイシン等アミノ酸；乳酸等の炭素源としての糖又は有機酸；EGF、FGF、PFGF、TGF-等の成長因子；IL-1、IL-6等のインターロイキン；TNF-、TNF-、レプチン等のサイトカイン；トランスフェリン等の金属トランスポーター；鉄イオン、セレンイオン、亜鉛イオン等の金属イオン；-メルカプトエタノール、グルタチオン等のSH試薬；アルブミン等のタンパク質などが挙げられる。

20

【0143】

細胞培養方法は、特に限定されず、それぞれの細胞に適した方法を用いればよい。通常、細胞の培養は、30～40の範囲内、好ましくは36～37の温度で、pHは6.2～7.7の範囲内好ましくは7.4で、CO₂濃度は4～10体積%、好ましくは5～7体積%の環境下で行うことができる。

30

【0144】

マイクロキャリアを用いた培養は、細胞の種類、マイクロキャリアの種類によって異なるが、例えば、 $1 \times 10^3 \sim 20 \times 10^5$ cells/mLであり、好ましくは $5 \times 10^3 \sim 10 \times 10^5$ cells/mLの細胞に対して、例えば、0.1～100g/Lであり、好ましくは1.0～20g/Lのマイクロキャリアを組み合わせる行うことができる。

【0145】

第2の実施形態は、以下の各種の実施形態を含み得る。

実施形態（1）は、細胞を含む細胞懸濁液に、疎水部を有するポリマを染色可能な蛍光色素を添加すること、前記蛍光色素を添加した細胞懸濁液に励起光を照射して蛍光分析すること、及び前記蛍光分析から、前記細胞懸濁液を評価することを含み、細胞懸濁液を評価することを含む、方法である。

40

【0146】

実施形態（2）は、細胞培養に用いるためのマイクロキャリアと液体を含むか、又は前記マイクロキャリアを処理した後の液体を含む試料を用意すること、前記試料に、疎水部を有するポリマを染色可能な蛍光色素を添加し蛍光分析すること、及び前記蛍光分析から、前記マイクロキャリアを評価することを含み、マイクロキャリアを評価することを含む、方法である。

【0147】

実施形態（3）は、細胞を含み、1μm以下の疎水部を有するポリマの個数は、前記 1×10^4 個当たり10個以下である、細胞懸濁液である。

50

実施形態(4)は、細胞と、疎水部を有するポリマを染色可能な蛍光色素とを含み、前記蛍光色素によって前記疎水部を有するポリマが染色されて蛍光する蛍光強度は、前記蛍光色素によって前記細胞が染色されて蛍光する蛍光強度より高い、細胞懸濁液である。

実施形態(5)は、疎水部を有するポリマを染色可能な蛍光色素と緩衝液とを含み、浸透圧が100~400mosm/Kgである、細胞懸濁液の評価用試薬である。

実施形態(6)は、細胞懸濁液を評価するための、疎水部を有するポリマを染色可能な蛍光色素と緩衝液とを含み、浸透圧が100~400mosm/Kgである試薬の使用である。

【0148】

実施形態(1)、(2)、(5)、又は(6)において、前記蛍光色素が、ポルフィリン色素、フタロシアニン色素、ポリフェニレンピレン色素、ピレン色素、キサンテン色素、クマリン色素、及びDCM色素からなる群から選択される少なくとも1種を含んでもよい。

10

実施形態(1)、(2)、(5)、又は(6)において、前記蛍光色素は、細胞内環境と細胞外環境とで蛍光特性が異なるとよい。

実施形態(1)、(2)、(5)、又は(6)において、前記蛍光色素は、前記細胞懸濁液中で前記疎水部を有するポリマを染色し発する蛍光強度が、前記細胞懸濁液中で前記細胞を染色し発する蛍光強度よりも高いとよい。

【0149】

実施形態(1)において、前記細胞懸濁液の蛍光分析によって、前記細胞懸濁液における前記疎水部を有するポリマの存在又はその量を評価するとよい。

20

実施形態(1)において、前記細胞懸濁液の蛍光分析によって、前記細胞懸濁液における前記疎水部を有するポリマのサイズ、形状、及び濃度からなる群から選択される少なくとも1種を測定することを含むとよい。

実施形態(1)において、前記細胞懸濁液の蛍光分析によって、前記疎水部を有するポリマの粒子径を測定し、前記細胞のサイズ以下の粒子径である疎水部を有するポリマが存在することを評価するとよい。

実施形態(1)において、前記細胞懸濁液の蛍光分析によって、前記疎水部を有するポリマの粒子径を測定し、前記細胞のサイズの0.01倍~5倍の粒子径である疎水部を有するポリマが存在することを評価するとよい。

30

実施形態(1)において、前記細胞懸濁液中で、前記細胞懸濁液の温度、濃度、及びpHからなる群から選択される少なくとも1種が一定の範囲を満たす場合に、前記蛍光色素は、前記細胞懸濁液中で前記疎水部を有するポリマを染色し発する蛍光強度が、前記細胞懸濁液中で前記細胞を染色し発する蛍光強度よりも高いとよい。

実施形態(1)において、前記細胞懸濁液は、細胞とマイクロキャリアとを用いて細胞培養を行い、細胞培養後に前記細胞と前記マイクロキャリアとを分離し、前記マイクロキャリアを除去した後の細胞懸濁液であるとよい。

実施形態(1)において、前記細胞懸濁液の蛍光分析によって、前記疎水部を有するポリマの粒子径を測定し、前記マイクロキャリアの平均粒子径以下の粒子径である疎水部を有するポリマが存在することを評価するとよい。

40

【0150】

実施形態(2)において、前記試料の蛍光分析によって、前記マイクロキャリアに、1μm以下の粒子径である疎水部を有するポリマが存在すること、又はその量を評価するとよい。

実施形態(2)において、前記試料は、前記マイクロキャリアを液体を用いて洗浄し、濾過して得られる濾液であるとよい。

【0151】

本明細書において、「~」を用いて示された数値範囲は、「~」の前後に記載される数値をそれぞれ最小値及び最大値として含む範囲を示す。本明細書に段階的に記載されている数値範囲において、ある段階の数値範囲の上限値又は下限値は、他の段階の数値範囲の

50

上限値又は下限値と任意に組み合わせることができる。本明細書に例示する材料は、特に断らない限り、1種を単独で又は2種以上を組み合わせ用いることができる。本明細書において、組成物中の各成分の含有量は、組成物中に各成分に該当する物質が複数存在する場合、特に断らない限り、組成物中に存在する当該複数の物質の合計量を意味する。「工程」との語は、独立した工程だけではなく、他の工程と明確に区別できない場合であってもその工程の所期の作用が達成されれば、本用語に含まれる。

【実施例】

【0152】

以下、実施例により、本発明をさらに詳しく説明するが、本発明の技術思想を逸脱しない限り、本発明は当該実施例に限定されるものではない。

【0153】

<製造例1>

表1に示される濃度のペクチンの水溶液及びPBS溶液（以下、「ペクチン溶液」という）を用意し、それぞれ、スクリューキャップ試験管に、ペクチン溶液0.5mL、濃塩酸（12mol/L）0.5mL及びナフトレゾルシン10mgを入れて混合物を調製し、90℃で2時間、攪拌しながら加熱して反応混合物を得た。

【0154】

反応混合物を室温まで冷却した後、冷却後の反応混合物に酢酸ブチルを1.0mL添加し、1分間攪拌した。次いで、試料から水相を除去し、有機相及び不溶物の混合物を得た。

得られた混合物にエタノールを1.0mL添加し、攪拌することで均一な溶液を得た。

【0155】

得られた溶液をさらにエタノールで100倍に希釈した後、励起波長512nmにおける蛍光強度を測定した。なお、蛍光分析には、蛍光分光光度計（日本分光株式会社）を用いた。結果を表1に示す。

【0156】

【表1】

ペクチン濃度 [μg/mL]	蛍光強度 [a.u.]
10	14.44
20	30.95
40	64.75
80	113.65

【0157】

表1の結果より、試料中のペクチンを、蛍光分析することが可能であること、及び、ペクチン量に対して多量のナフトレゾルシンを用いることによって定量できることがわかった。また、ペクチンの濃度は、蛍光強度と比例関係にあることが分かり、検量線等を用いることで蛍光強度からペクチンの濃度を確認することができた。この方法によれば、糖類を蛍光又は吸光分析することで、簡便且つ感度よく、試料中の糖類を測定又は定量することができる。このため、多糖類であっても、加水分解と蛍光又は吸光分析を組み合わせることにより、簡便に且つ感度よく、多糖類の加水分解物を測定することができる。

【0158】

したがって、本開示の測定方法を適用することにより、可溶性の多糖類細胞支持体を用

いて細胞を培養後、細胞支持体を溶解して細胞を回収して得られた細胞懸濁液について、細胞支持体の残留物の有無、残留量等を指標に、簡便に評価することができる。

【0159】

<製造例2：細胞懸濁液の評価方法>

「色素溶液、細胞懸濁液、マイクロキャリア破片分散液の作製」

下記の色素粉末又は色素原液をリン酸緩衝食塩水(PBS)で希釈することで、 $1\mu\text{g}/\text{mL} \sim 1000\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度の色素溶液を調製した。

ヒト間葉系幹細胞(hMSC; タカラバイオ株式会社より入手)の細胞懸濁液は、培養後のhMSCをトリプシン処理で回収した後に遠心分離とPBS洗浄を行って、調製した。細胞密度は $8.2 \times 10^5 \text{ cells}/\text{mL}$ であった。

マイクロキャリア破片分散液として、ガラスバイアル中に5gのマイクロキャリア(直径 $125 \sim 212\mu\text{m}$; 球状の架橋ポリスチレン; Pall社製「SoloHill Star-Plus」)を入れて磁気攪拌子にて1日破碎し、 $60\mu\text{m}$ のメッシュにて濾過した濾液を用意した。すなわち、 $60\mu\text{m}$ メッシュを通過した小粒子径のマイクロキャリア破片を含む分散液を用意した。

【0160】

「色素溶液」

用いた色素と色素溶液の濃度とは以下の通りである。

色素(a1): テトラフェニルプロピリントラサルフォニックアシッド(TPPS); $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

色素(a2): ポリ(5-メトキシ-2-(3-スルフォプロポキシ)-1,4-フェニレンビニレン); $100\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

色素(a3): メトキシポリエチレングリコールピレン; $1000\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

色素(a4): ナフトフルオレセイン; $10\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

【0161】

色素(a5): BD140; $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

色素(a6): クマリン6; $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

色素(a7): DCM(4-(ジシアノメチレン)-2-メチル-6-(4-ジメチルアミノスチリル)-4H-ピラン); $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

【0162】

「染色及び観察」

細胞懸濁液 $500\mu\text{L}$ と、マイクロキャリア破片分散液 $50\mu\text{L}$ とを24wellプレート中で混合した後に、色素溶液 $50\mu\text{L}$ を添加し、攪拌の後に10分間静置した。その後、得られた混合物を蛍光顕微鏡にて明視野像及び蛍光像を観察した。

【0163】

ブランク試料として、細胞懸濁液 $500\mu\text{L}$ と、PBS(リン酸緩衝生理食塩水) $50\mu\text{L}$ とを24wellプレート中で混合した後に、色素溶液 $50\mu\text{L}$ を添加し、攪拌の後に10分間静置した。その後、得られた混合物を蛍光顕微鏡にて明視野像及び蛍光像を観察した。

【0164】

青蛍光は、 $360 \sim 370\text{nm}$ の励起光で観察し、緑蛍光は、 $450 \sim 480\text{nm}$ の励起光で観察し、赤蛍光は、 $510 \sim 550\text{nm}$ の励起光で観察した。

色素(a1)は、赤蛍光で観察し、色素(a2)は、緑蛍光で観察し、色素(a3)は、青蛍光及び赤蛍光で観察し、色素(a4)は、緑蛍光及び赤蛍光で観察し、色素(a5)は、赤蛍光で観察し、色素(a6)は、緑蛍光で観察し、色素(a7)は、赤蛍光で観察した。

【0165】

得られた明視野像及び蛍光像を図1に示す。図1において、左列の像は細胞及び蛍光色素を含むブランク試料であり、右列の像は細胞、蛍光色素及びマイクロキャリア破片を含む試料である。図1において、上段は明視野像であり、下段は蛍光像である。

10

20

30

40

50

図中 (a 1) は色素 (a 1) を用いた例であり、下段は赤蛍光の観察像である。細胞はほぼ蛍光しないが、マイクロキャリア破片は強く赤蛍光で観察された。

図中 (a 2) は色素 (a 2) を用いた例であり、下段は緑蛍光の観察像である。細胞はほぼ蛍光しないが、マイクロキャリア破片は強く緑蛍光で観察された。

【 0 1 6 6 】

得られた明視野像及び蛍光像を図 2 に示す。図 2 において、左列の像は細胞及び蛍光色素を含むブランク試料であり、右列の像は細胞、蛍光色素及びマイクロキャリア破片を含む試料である。図 2 において、上段は明視野像、中段は青色 (a 3) 又は緑色 (a 4) の蛍光像であり、下段は赤色の蛍光像である。

図中 (a 3) は色素 (a 3) を用いた例である。360 ~ 370 nm の波長の光で励起すると細胞及びマイクロキャリア破片は青蛍光し、510 ~ 550 nm の波長の光で励起すると細胞は蛍光しないが、マイクロキャリア破片が赤蛍光で観察された。

図中 (a 4) は色素 (a 4) を用いた例である。450 ~ 480 nm の波長の光で励起すると細胞及びマイクロキャリア破片は緑蛍光し、510 ~ 550 nm の波長の光で励起すると細胞は蛍光しないが、マイクロキャリア破片が赤蛍光で観察された。

【 0 1 6 7 】

色素 (a 5) を観察し得られた明視野像及び蛍光像を図 3 に示す。図 3 において、上段の像 (a 5 - 1) は細胞及び蛍光色素を含むブランク試料であり、下段の像 (a 5 - 2) は細胞、蛍光色素及びマイクロキャリア破片を含む試料である。図中の試料 (a 5 - 1) 及び試料 (a 5 - 2) は、それぞれ左上は明視野像、左下は青蛍光像、右上はピンク蛍光像、右下は赤蛍光像である。

色素 (a 5) は、ピンク蛍光像及び赤蛍光像で、細胞及びマイクロキャリア破片が観察された。ピンク色ないし赤色の蛍光像から、形状によって、細胞とマイクロキャリア破片を区別して判別可能である。色素 (a 5) は、青蛍光像で、蛍光強度が低いものの、マイクロキャリア破片が観察された。青色の蛍光像から、マイクロキャリア破片の存在の有無を判別可能である。

【 0 1 6 8 】

色素 (a 6) 及び色素 (a 7) の場合も同様に、それぞれ、蛍光像から、形状によって、細胞とマイクロキャリア破片を区別して判別可能である。

【 0 1 6 9 】

< 製造例 3 : 細胞培養前のマイクロキャリアの評価 >

「マイクロキャリアの洗浄」

マイクロキャリア (直径 125 ~ 212 μm ; 球状の架橋ポリスチレン ; P a l l 社製 「 S o l o H i l l S t a r - P l u s 」) を用意した。

3 g のマイクロキャリアと 25 mL の水を混合し、混合液を孔径 10 μm のフィルタを用いて過して洗浄した。この洗浄操作を 3 回繰り返した。

【 0 1 7 0 】

「色素溶液」

用いた蛍光色素と色素溶液の濃度は以下の通りである。

色素 (b 1) : テトラフェニルプロピリンテトラサルフォニックアシッド (T P P S) ; 1 $\mu\text{g} / \text{mL}$ 。

色素 (b 2) : クマリン 6 ; 1 $\mu\text{g} / \text{mL}$ 。

色素 (b 3) : D C M (4 - (ジシアノメチレン) - 2 - メチル - 6 - (4 - ジメチルアミノスチリル) - 4 H - ピラン) ; 1 $\mu\text{g} / \text{mL}$ 。

【 0 1 7 1 】

「染色及び観察」

マイクロキャリアの 3 回目の洗浄後の濾液 500 μL に、色素溶液 50 μL を添加し、攪拌の後に 10 分間静置した。その後、得られた混合物を蛍光顕微鏡にて明視野像及び蛍光像を観察した。

【 0 1 7 2 】

10

20

30

40

50

緑蛍光は、450～480nmの励起光で観察し、赤蛍光は、510～550nmの励起光で観察した。

色素(b1)は、赤蛍光で観察し、色素(b2)は、緑蛍光で観察し、色素(b3)は、赤蛍光で観察した。

【0173】

得られた明視野像及び蛍光像を図4に示す。図4において、上段は明視野像であり、下段は蛍光像である。

図中(b1)は色素(b1)を用いた例であり、下段は赤色の蛍光像である。色素(b1)では、上段の明視野像に観察されるマイクロキャリアの小片が、下段の蛍光像においても観察されており、マイクロキャリアの小片が赤蛍光で確認できた。

10

図中(b2)は色素(b2)を用いた例であり、下段は緑色の蛍光像である。色素(b2)では、上段の明視野像に観察されるマイクロキャリアの小片が、下段の蛍光像においても観察されており、マイクロキャリアの小片が緑蛍光で確認できた。

図中(b3)は色素(b3)を用いた例であり、下段は赤色の蛍光像である。色素(b3)では、上段の明視野像に観察されるマイクロキャリアの小片が、下段の蛍光像においても観察されており、マイクロキャリアの小片が赤蛍光で確認できた。

マイクロキャリアの洗浄後の濾液にマイクロキャリアの小片が確認できたことから、洗浄前のマイクロキャリアに小片が混入されていることが評価される。また、画像観察から、洗浄前のマイクロキャリアに混入される小片のサイズ及び分布が評価される。

20

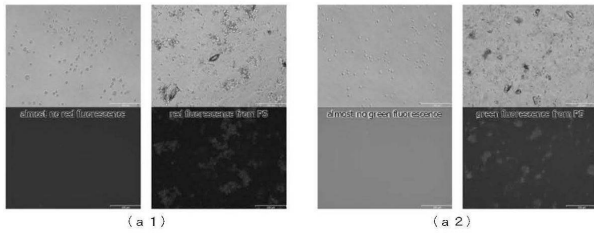
30

40

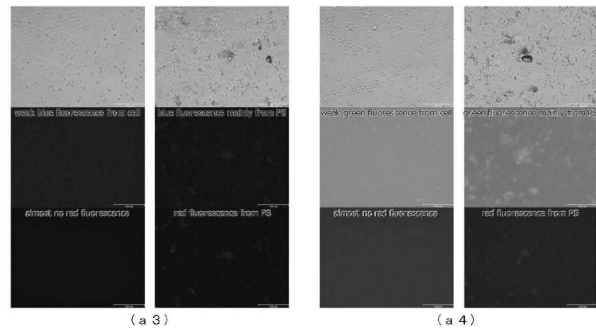
50

【 図面 】

【 図 1 】

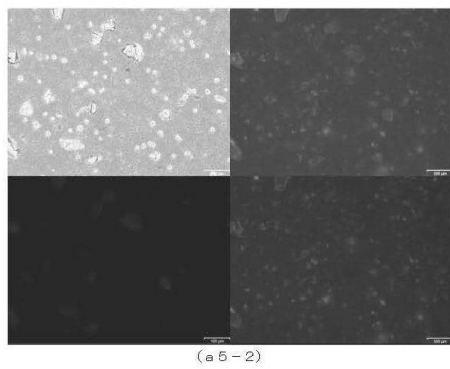
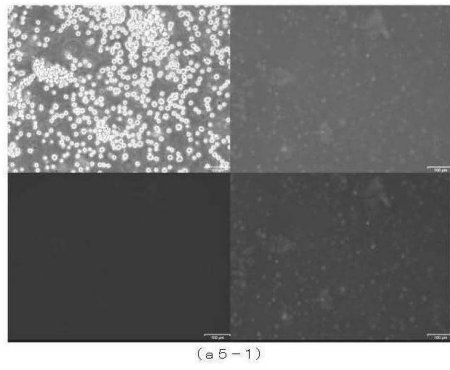


【 図 2 】

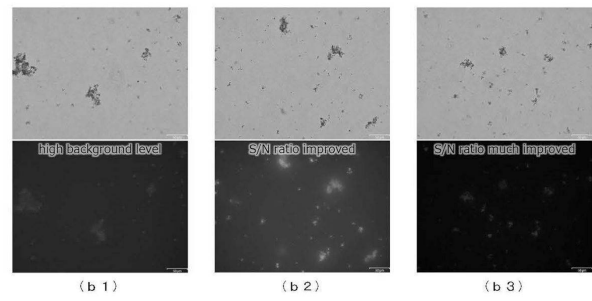


10

【 図 3 】



【 図 4 】



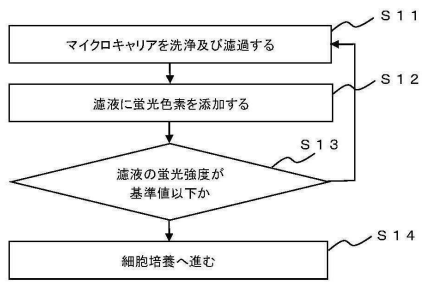
20

30

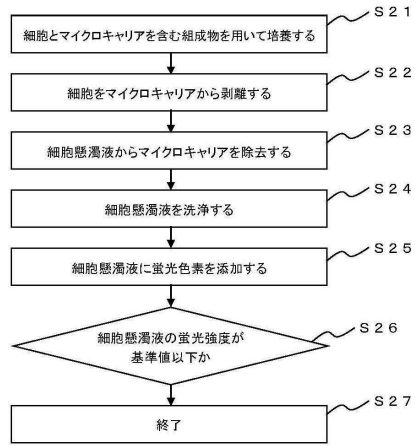
40

50

【 図 5 】



【 図 6 】



10

20

30

40

50

フロントページの続き

- 東京都千代田区丸の内一丁目 6 番 6 号 株式会社日立製作所内
- (72)発明者 佐藤 優至
東京都千代田区丸の内一丁目 9 番 2 号 昭和電工マテリアルズ株式会社内
- (72)発明者 多田 靖彦
東京都千代田区丸の内一丁目 6 番 6 号 株式会社日立製作所内
- 審査官 太田 雄三
- (56)参考文献 特開 2 0 1 9 - 1 5 2 6 0 4 (J P , A)
WARKIANI, M, E., et al. , Intertial-based Microcarrier-cell retention in bioprocessing , Cytot
herapy , 2019年05月 , Volume 21, Issue 5, Supplement , pp. e4-e5 , doi:10.1016/j.jcyt.20
19.01.015
KALRA, K., et al. , Developing efficient bioreactor microcarrier cell culture system for large
scale production of mesenchymal stem cells(mscs) , Cytotherapy , 2019年05月 , Volume 2
1, Issue 5, Supplement , p. S73 , doi:10.1016/j.jcyt.2019.03.468
- (58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)
C 1 2 Q 1 / 0 0
G 0 1 N 3 3 / 0 0
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)