



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115427582 A

(43) 申请公布日 2022.12.02

(21) 申请号 202080099163.3

(22) 申请日 2020.09.25

(30) 优先权数据

2020-062243 2020.03.31 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.09.27

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2020/036253 2020.09.25

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/199459 JA 2021.10.07

(71) 申请人 昭和电工材料株式会社

地址 日本国东京都千代田区

(72) 发明人 丸山优史 佐久间广贵 佐藤优至

多田靖彦

(74) 专利代理机构 北京汇思诚业知识产权代理有限公司 11444

专利代理师 龚敏 王刚

(51) Int.Cl.

G12Q 1/02 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

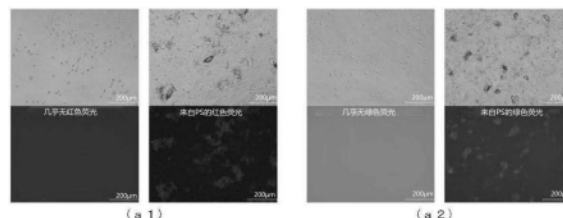
权利要求书2页 说明书27页 附图4页

(54) 发明名称

包含细胞支撑体来源成分的试样的评价方法

(57) 摘要

本发明提供一种评价试样的方法,其使用包含试样与选自由芳香族化合物和荧光色素组成的组中的至少一种的混合物来评价试样,所述试样包含选自细胞支撑体来源成分、包含细胞的细胞悬液、从细胞悬液得到的评价用试样、包含用于细胞培养的微载体和液体的试样、以及包含处理微载体后的液体的试样组成的组中的至少一种,所述芳香族化合物具有至少一个选自由羟基、氨基、硝基和羰基组成的组中的官能团。



1. 一种评价试样的方法,其特征在于,使用包含试样与选自芳香族化合物和荧光色素中的至少一种物质的混合物来评价试样,

所述试样包含选自细胞支撑体来源成分、包含细胞的细胞悬液、从细胞悬液得到的评价用试样、包含用于细胞培养的微载体和液体的试样、以及包含处理微载体后的液体的试样中的至少一种,

所述芳香族化合物具有至少一个选自羟基、氨基、硝基和羰基中的官能团。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述方法包括:使用包含多糖类细胞支撑体来源成分、酸以及芳香族化合物的混合物测定细胞支撑体来源成分,

所述芳香族化合物具有一个以上的选自羟基、氨基、硝基和羰基中的官能团。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述方法是评价包含在可溶性的细胞支撑体的存在下培养并在细胞支撑体溶解后回收的细胞的细胞悬液的方法,

所述方法包括:使用包含由所述细胞悬液得到的评价用试样、酸以及芳香族化合物的混合物评价细胞悬液,

所述芳香族化合物具有一个以上的选自羟基、氨基、硝基和羰基中的官能团。

4. 根据权利要求2所述的方法,其中,所述方法包括对细胞支撑体来源成分进行测定,

所述方法包括以下工序:

加热包含多糖类细胞支撑体来源成分、酸以及芳香族化合物的混合物,所述芳香族化合物具有一个以上的选自羟基、氨基、硝基和羰基中的官能团;和

对加热后的混合物中的反应生成物进行荧光分析或吸收光谱分析。

5. 根据权利要求2所述的方法,其中,所述方法包括对细胞支撑体来源成分进行测定,

所述方法包括以下工序:

加热包含多糖类细胞支撑体来源成分、酸以及芳香族化合物的混合物,所述芳香族化合物具有一个以上的选自羟基、氨基、硝基和羰基中的官能团;和

对加热后的混合物中的反应生成物进行定量,

在所述混合物中,所述芳香族化合物的质量为所述多糖类细胞支撑体来源成分的质量的至少200倍。

6. 根据权利要求5所述的方法,其中,在所述反应生成物的定量中使用荧光分析或吸收光谱分析。

7. 根据权利要求4至6中任一项所述的方法,其中,所述混合物中的所述芳香族化合物的浓度为1mg/mL~100mg/mL。

8. 根据权利要求3所述的方法,其中,所述方法包括对细胞悬液进行评价,其是评价包含在可溶性的细胞支撑体的存在下培养并在细胞支撑体溶解后回收的细胞的细胞悬液的方法,

所述方法包括以下工序:

准备从所述细胞悬液得到的评价用试样;

制备包含所述评价用试样、酸以及芳香族化合物的混合物,所述芳香族化合物具有一个以上的选自羟基、氨基、硝基和羰基中的官能团;

加热所述混合物;和

对加热后的混合物中的反应生成物进行荧光分析或吸收光谱分析。

9. 根据权利要求3所述的方法,其中,所述方法包括对细胞悬液进行评价,其是评价包含在可溶性的细胞支撑体的存在下培养并在细胞支撑体溶解后回收的细胞的细胞悬液的方法,

所述方法包括以下工序:

准备从所述细胞悬液得到的评价用试样;

制备包含所述评价用试样、酸以及芳香族化合物的混合物,所述芳香族化合物具有一个以上的选自羟基、氨基、硝基和羰基中的官能团;

加热所述混合物;和

对加热后的混合物中的反应生成物进行定量,

所述芳香族化合物的质量是由所述细胞支撑体水解而产生的糖类的质量的至少200倍。

10. 根据权利要求9所述的方法,其中,在所述反应生成物的定量中使用荧光分析或吸收光谱分析。

11. 根据权利要求8至10中任一项所述的方法,其中,所述混合物中的所述芳香族化合物的浓度为1mg/mL~100mg/mL。

12. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述方法包括对细胞悬液进行评价,

所述方法包括以下工序:

在包含细胞的细胞悬液中添加能够对具有疏水部分的聚合物进行染色的荧光色素;

对添加了所述荧光色素的细胞悬液照射激发光并进行荧光分析;和

根据所述荧光分析来评价所述细胞悬液。

13. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述方法包括对微载体进行评价,

所述方法包括以下工序:

准备包含用于细胞培养的微载体和液体的试样,或准备包含处理所述微载体后的液体的试样;

在所述试样中添加能够对具有疏水部分的聚合物进行染色的荧光色素并进行荧光分析;和

根据所述荧光分析来评价所述微载体。

14. 根据权利要求12或13所述的方法,其中,所述荧光色素包含选自卟啉色素、酞菁色素、聚亚苯基亚乙烯色素、花色素、咕吨色素、香豆素色素和DCM色素中的至少一种。

15. 一种细胞悬液,其包含细胞,并且1 $\mu$ m以下的具有疏水部分的聚合物的个数相对于 $1 \times 10^4$ 个所述细胞为10个以下。

## 包含细胞支撑体来源成分的试样的评价方法

### 技术领域

[0001] 本公开涉及用于评价包含细胞支撑体来源成分的试样的方法,详细而言,涉及测定细胞支撑体来源成分的方法、评价细胞悬液的方法、评价微载体的方法、细胞悬液。

### 背景技术

[0002] 近年来,出于在再生医疗等领域中使用的目的,正在进行细胞的大量培养。为了高效且大量地培养细胞,有时使用细胞支撑体、例如球状的微载体作为细胞增殖时的支架。例如,在专利文献1中公开了以聚半乳糖醛酸为主体的作为可消化基体的微载体,公开了在采集细胞时消化微载体而使细胞从微载体分离的工序。在非专利文献1中公开了:在使用微载体大量培养细胞的方法中,使用细胞可通过、微载体被拦截的过滤器将细胞从微载体分离的工序。

现有技术文献

专利文献

[0003] 专利文献1:日本特表2018-520662号公报

非专利文献

[0004] 非专利文献1:Tristan Lawson, et al., "Process development for expansion of human mesenchymal stromal cells in a 50L single-use stirred tank bioreactor (在50L容积的一次性搅拌槽生物反应器中扩增人间充质干细胞的工艺开发)", *Biochemical Engineering Journal*, 120 (2017), pp.49-62

### 发明内容

发明要解决的技术问题

[0005] 在利用培养而得的细胞时,消化或溶解细胞支撑体并回收从细胞支撑体中分离的细胞。但是,有时有细胞支撑体的残留物与细胞一起被回收的情况。在使用过滤器将细胞从微载体分离的方法中,有时也有微载体的残留物与细胞一起被回收的情况。

[0006] 本公开的技术问题在于,提供一种细胞支撑体的残留物的检测方法。

本公开的技术问题在于,提供一种能够简便地测定细胞支撑体来源成分的、细胞支撑体来源成分的测定方法。另外,本公开的技术问题在于,提供一种能够基于细胞支撑体来源成分来评价细胞悬液的、细胞悬液的评价方法。本公开的课题在于,提供一种评价微载体的残留物有无混入到细胞悬液的方法。

用于解决技术问题的手段

[0007] 本公开的实施方式涉及如下内容。

[0008] 作为本公开的第一方面,提供了一种评价试样的方法,其使用包含试样与选自芳香族化合物和荧光色素组成的组中的至少一种的混合物来评价试样,所述试样包含选自自由细胞支撑体来源成分、包含细胞的细胞悬液、从细胞悬液得到的评价用试样、包含用于细胞培养的微载体和液体的试样、以及包含处理微载体后的液体的试样组成的组中的至少一

种,所述芳香族化合物具有至少一个选自由羟基、氨基、硝基和羰基组成的组中的官能团。

上述第一方面可以包括:使用包含多糖类细胞支撑体来源成分、酸以及具有一个以上选自由羟基、氨基、硝基和羰基组成的组中的官能团的芳香族化合物的混合物测定细胞支撑体来源成分的工序。

上述第一方面可以是:评价包含在可溶性的细胞支撑体的存在下培养并在细胞支撑体溶解后回收的细胞的细胞悬液的方法,所述方法包括:使用包含由所述细胞悬液得到的评价用试样、酸以及具有一个以上选自由羟基、氨基、硝基和羰基组成的组中的官能团的芳香族化合物的混合物评价细胞悬液的工序。

[0009] 上述第一方面可以具有以下方案。

(1) 一种细胞支撑体来源成分的测定方法,其包括:加热包含多糖类细胞支撑体来源成分、酸以及具有一个以上选自由羟基、氨基、硝基和羰基组成的组中的官能团的芳香族化合物的混合物的工序;和对加热后的混合物中的反应生成物进行荧光分析或吸收光谱分析的工序。

(2) 一种细胞支撑体来源成分的测定方法,其包括:加热包含多糖类细胞支撑体来源成分、酸以及具有一个以上选自由羟基、氨基、硝基和羰基组成的组中的官能团的芳香族化合物的混合物的工序;和对加热后的混合物中的反应生成物进行定量的工序,在所述混合物中,所述芳香族化合物的质量为所述多糖类细胞支撑体来源成分的质量的至少200倍。

(3) 根据(2)所述的细胞支撑体来源成分的测定方法,其中,在所述反应生成物的定量中使用荧光分析或吸收光谱分析。

(4) 根据(1)~(3)中任一项所述的细胞支撑体来源成分的测定方法,其中,所述混合物中的所述芳香族化合物的浓度为1mg/mL~100mg/mL。

(5) 一种细胞悬液的评价方法,其是包含在可溶性的细胞支撑体的存在下培养并在细胞支撑体溶解后回收的细胞的细胞悬液的评价方法,所述方法包括:准备从所述细胞悬液得到的评价用试样的工序;制备包含所述评价用试样、酸以及具有一个以上选自由羟基、氨基、硝基和羰基组成的组中的官能团的芳香族化合物的混合物的工序;加热所述混合物的工序;和对加热后的混合物中的反应生成物进行荧光分析或吸收光谱分析的工序。

(6) 一种细胞悬液的评价方法,其是包含在可溶性的细胞支撑体的存在下培养并在细胞支撑体溶解后回收的细胞的细胞悬液的评价方法,所述方法包括:准备从所述细胞悬液得到的评价用试样的工序;制备包含所述评价用试样、酸以及具有一个以上选自由羟基、氨基、硝基和羰基组成的组中的官能团的芳香族化合物的混合物的工序;加热所述混合物的工序;和对加热后的混合物中的反应生成物进行定量的工序,所述芳香族化合物的质量是由所述细胞支撑体水解而产生的糖类的质量的至少200倍。

(7) 根据(6)所述的细胞悬液的评价方法,其中,在所述反应生成物的定量中使用荧光分析或吸收光谱分析。

(8) 根据(5)~(7)中任一项所述的细胞悬液的评价方法,其中,所述混合物中的所述芳香族化合物的浓度为1mg/mL~100mg/mL。

[0010] 上述第一方面可以包括评价细胞悬液,包括:在包含细胞的细胞悬液中添加能够对具有疏水部分的聚合物进行染色的荧光色素的工序;对添加了所述荧光色素的细胞悬液照射激发光来进行荧光分析的工序;和根据所述荧光分析来评价所述细胞悬液的工序。

上述第一方面可以包括评价微载体,包括:准备包含用于细胞培养的微载体和液体的试样,或准备包含处理所述微载体后的液体的试样的工序;在所述试样中添加能够对具有疏水部分的聚合物进行染色的荧光色素并进行荧光分析的工序;和根据所述荧光分析来评价所述微载体的工序。

上述荧光色素可以包含选自卟啉色素、酞菁色素、聚亚苯基亚乙烯色素、苝色素、咕吨色素、香豆素色素和DCM色素组成的组中的至少一种。

作为本公开的第二方面,提供了一种细胞悬液,其包含细胞,并且 $1\mu\text{m}$ 以下的具有疏水部分的聚合物的个数相对于 $1\times 10^4$ 个所述细胞为10个以下。

#### 发明效果

[0011] 本公开能够提供一种细胞支撑体的残留物的检测方法。

根据本公开,能够提供一种能够简便地测定细胞支撑体来源成分的、细胞支撑体来源成分的测定方法。另外,根据本公开,能够提供一种能够基于细胞支撑体来源成分评价细胞悬液的、细胞悬液的评价方法。另外,根据本公开,能够提供一种微载体的残留物有无混入到细胞悬液的评价方法。

#### 附图说明

[0012] 图1表示基于制造例2的细胞悬液的明视场像和荧光像。

图2表示基于制造例2的细胞悬液的明视场像和荧光像。

图3表示基于制造例2的细胞悬液的明视场像和荧光像。

图4表示基于制造例3的细胞悬液的明视场像和荧光像。

图5是表示微载体的评价方法的一例的流程图。

图6是表示细胞悬液的评价方法的一例的流程图。

#### 具体实施方式

[0013] 以下,对本发明的实施方式进行说明,但本发明并不限于该实施方式。

[0014] 基于一个实施方式的方法的特征在于,基于光学信息来检测细胞支撑体或细胞支撑体来源成分。

基于一个实施方式的方法是一种评价试样的方法,其使用包含试样与选自芳香族化合物和荧光色素组成的组中的至少一种的混合物来评价试样,所述试样包含选自细胞支撑体来源成分、包含细胞的细胞悬液和从细胞悬液得到的评价用试样、包含用于细胞培养的微载体和液体的试样以及包含处理微载体后的液体的试样组成的组中的至少一种,所述芳香族化合物具有至少一个选自羟基、氨基、硝基和羰基组成的组中的官能团。

[0015] 在本说明书中,细胞支撑体也被称为微载体或培养载体,是指作为细胞生长的支架而发挥功能的物质。细胞支撑体可以是可溶性的细胞支撑体和不溶性的细胞支撑体中的任一种。可溶性的细胞支撑体能够使用酶等分解去除。不溶性的细胞支撑体能够使用过滤器等物理去除。多糖类细胞支撑体能够使用酶等分解去除,能够作为可溶性的细胞支撑体来处理。具有疏水部分的聚合物由于难以分解去除,所以能够作为不溶性的细胞支撑体的材料来处理。

[0016] 作为该方法的一例是一种测定方法,其包括:使用包含多糖类细胞支撑体来源成

分、酸以及具有一个以上选自由羟基、氨基、硝基和羰基组成的组中的官能团的芳香族化合物的混合物测定细胞支撑体来源成分的工序。关于更详细的示例,在下述中作为测定方法1和2进行说明。

[0017] 作为该方法的另一例是一种评价方法,其是评价包含在可溶性的细胞支撑体的存在下培养并在细胞支撑体溶解后回收的细胞的细胞悬液的方法,

所述方法包括:使用包含从细胞悬液中得到的评价用试样、酸以及具有一个以上选自由羟基、氨基、硝基和羰基组成的组中的官能团的芳香族化合物的混合物评价细胞悬液的工序。关于更详细的示例,在下述中作为测定方法1和2进行说明。

[0018] 作为该方法的又一个示例是一种方法,其包括评价细胞悬液的工序,所述评价细胞悬液的工序包括:在包含细胞的细胞悬液中添加能够对具有疏水部分的聚合物进行染色的荧光色素的工序;对添加了荧光色素的细胞悬液照射激发光来进行荧光分析的工序;和根据荧光分析来评价细胞悬液的工序。关于更详细的示例,在下述中作为细胞悬液的评价方法进行说明。

[0019] 作为该方法的又一个示例是一种方法,其包括包括评价微载体的工序,所述评价微载体的工序包括:准备包含用于细胞培养的微载体和液体,或包含处理微载体后的液体的试样的工序;在试样中添加能够对具有疏水部分的聚合物进行染色的荧光色素并进行荧光分析的工序;和根据荧光分析来评价微载体的工序。关于更详细的示例,在下述中作为微载体的评价方法进行说明。

[0020] (第一实施方式)

<测定方法>

一个实施方式的多糖类细胞支撑体来源成分的测定方法包括:加热包含多糖类细胞支撑体来源成分、酸以及具有一个以上选自由羟基、氨基、硝基和羰基组成的组中的官能团的芳香族化合物的混合物的工序;和对加热后的混合物中的反应生成物进行荧光分析或吸收光谱分析的工序(以下,有时有称为测定方法1的情况)。

另一实施方式的多糖类细胞支撑体来源成分的测定方法包括:加热包含多糖类细胞支撑体来源成分、酸以及具有一个以上选自由羟基、氨基、硝基和羰基组成的组中的官能团的芳香族化合物的混合物的工序;和对加热后的混合物中的反应生成物进行定量的工序,所述芳香族化合物的质量为所述多糖类细胞支撑体来源成分的质量的至少200倍(以下,有时有称为测定方法2的情况)。

[0021] 根据测定方法1,对将细胞支撑体来源成分与酸和特定的芳香族化合物一起加热而得到的混合物中的反应生成物进行吸收光谱分析或荧光分析,因此能够简便地测定细胞支撑体来源成分。

根据测定方法2,对将细胞支撑体来源成分与酸和过量的特定的芳香族化合物一起加热而得到的混合物中的反应生成物进行定量,因此能够简便地测定细胞支撑体来源成分。

有时有将测定方法1和测定方法2统称为测定方法的情况。

[0022] 在本说明书中,细胞支撑体也被称为微载体或培养载体,是指作为细胞生长的支架而发挥功能的物质。在本实施方式中,使用可溶性的细胞支撑体。“可溶性的细胞支撑体”是指能够通过酶等方法分解至所粘附的细胞能够从细胞支撑体游离的程度的细胞支撑体。

作为可溶性的细胞支撑体的材料,没有特别限定,作为具体例,能够举出:果胶、果胶酸盐等聚半乳糖醛酸;藻酸盐、纤维素、交联琼脂糖、葡聚糖、壳聚糖等多糖类。在本说明书中,有时有将含有多糖类的细胞支撑体称为多糖类细胞支撑体的情况。作为细胞支撑体的形态,例如,可举出:珠状、纤维状、网状、无纺布状、海绵状等。细胞支撑体的量根据细胞的种类而不同,通常以0.1g/L~100g/L、1g/L~100g/L、1g/L~50g/L或1.0g/L~20g/L的量使用。

[0023] 可溶性的细胞支撑体能够在根据细胞支撑体的组成而选择的条件下溶解于培养基、生理盐水等水性介质中,例如通过分解酶进行分解。在一个实施方式中,使用褐藻酸酶、果胶酶、葡聚糖酶等公知的水解构成细胞支撑体的多糖类的水解酶。

[0024] 在本测定方法中,包括:加热包含多糖类细胞支撑体来源成分、酸以及具有一个以上选自由羟基、氨基、硝基和羰基组成的组中的官能团的芳香族化合物(以下,有时有简称为“特定芳香族化合物”的情况。)的混合物的工序。

“多糖类细胞支撑体来源成分”是指使可溶性的多糖类细胞支撑体按照根据该细胞支撑体的种类而选择的溶解方法溶解得到的成分。例如,相当于用水解酶将多糖类分解而得到的单糖、低聚糖等水解物。

[0025] 混合物中的多糖类细胞支撑体来源成分的含量没有特别限制,能够根据多糖类支撑体来源成分的种类、特定的芳香族化合物的种类等适当设定。若作为一例举出,则从测定效率或灵敏度等观点出发,混合物中的多糖类支撑体来源成分的含量能够设为0.1 $\mu$ g/mL~1000 $\mu$ g/mL、0.5 $\mu$ g/mL~500 $\mu$ g/mL或0.8 $\mu$ g/mL~100 $\mu$ g/mL。多糖类细胞支撑体来源成分的含量例如能够由用于细胞培养的细胞支撑体的使用量求出,从测定效率等观点出发,能够根据需要调整为上述浓度。

[0026] 作为酸,例如能够使用盐酸、硫酸、磺酸等强酸等。该酸具有促进混合物中的细胞支撑体来源成分与特定芳香族化合物的反应而生成作为测定对象的反应生成物(显色物)的功能,根据情况,也可以具有促进从混合物中所含有的多糖类细胞支撑体分解成细胞支撑体来源成分的功能。也能够预先制备多糖类细胞支撑体与酸的混合物,进行所述多糖类细胞支撑体的分解。能够根据特定芳香族化合物的种类适当地分阶段地进行操作。根据特定芳香族化合物的种类,在反应生成物的生成中不需要酸的存在,因此有时也不需要为了生成反应生成物而在混合物中含有酸。另外,在混合物中的多糖类细胞支撑体的分解已经充分进行的情况下,有时也不需要混合物中的酸的存在。

混合物中的酸的浓度以添加量计能够设为0.01mol/L~20mol/L、0.1mol/L~12mol/L、0.5mol/L~10mol/L或1.0mol/L~10mol/L。

[0027] 作为特定芳香族化合物,只要是能够通过加热下与糖类的反应而生成荧光性或吸光性的反应生成物的化合物,即能够生成具有能够成为显色团的官能团的化合物的单环或多环的芳香族化合物即可。特定芳香族化合物中的选自由羟基、氨基、硝基和羰基组成的组中的官能团可以是一个,也可以存在多个。在存在多个的情况下,可以存在多个同一种类的官能团,也可以以任意的组合存在不同种类的官能团。芳香族化合物是指具有芳香环的化合物,芳香环除了芳香族烃环以外,也可以是芳香族杂环,也可以在缩合多环结构的一部分中含有芳香环。作为芳香族烃环,代表性地可举出:苯环、萘环、蒽环、四氢化萘环、六氢蒽环等。作为芳香族杂环,例如,可举出:咪唑环、吡啶环等氮杂环。

[0028] 作为在这样的特定芳香族化合物中的具有羟基的芳香族化合物,可举出一元酚和

多酚,羟基的数量优选为1个~3个左右。作为具有氨基的芳香族化合物,可举出芳香伯胺和芳香仲胺,除了单胺以外,还可以是含有两个以上的伯氨基和/或仲氨基的多胺。仲胺也可以是在杂环中包含氮原子的杂环式胺结构的仲胺。作为具有硝基的芳香族化合物,可举出芳香环上取代有一个以上的硝基的芳香族硝基化合物。作为具有羰基的芳香族化合物,能够使用包含环状酮基的缩合多环芳香族化合物。

[0029] 更详细而言,能够举出:苯胺、对甲氧基苯胺、 $\alpha$ -萘胺、邻二甲氧基苯胺等芳香伯胺化合物;二苯胺、咪唑、吡啶、色氨酸、粪臭素等芳香仲胺化合物; $\alpha$ -萘酚、间苯二酚、苔黑酚、间苯三酚、间萘二酚、5-羟基四氢萘酮等酚化合物;蒽酮等芳香族羰基化合物;3,5-二硝基水杨酸、3,4-二硝基苯甲酸、间二硝基苯、邻二硝基苯、2,4-二硝基苯酚等硝基化合物等。这些化合物存在于反应中的混合物中即可,也可以是在反应前生成的化合物。

[0030] 在一个实施方式中,能够使用具有一个以上羟基、氨基或环状酮基的芳香族化合物。作为具有一个以上羟基、氨基或环状酮基的芳香族化合物,从灵敏度的观点出发,能够使用间苯二酚、苔黑酚、间苯三酚、间萘二酚、5-羟基四氢萘酮等酚化合物和蒽酮等芳香族环状酮化合物,其中,也能够使用间萘二酚。已知间萘二酚是与单糖类糖类反应(也称为间萘二酚反应。)而生成显色物的化合物。

[0031] 混合物中的特定芳香族化合物的浓度能够根据为了生成反应生成物而选择的特定芳香族化合物的种类,或者能够成为测定对象的反应生成物的种类等适当选择。

在测定方法1中,如上所述,混合物中的特定芳香族化合物的含量没有特别限定,但从测定灵敏度的观点出发,若举出一例,则能够设为0.1mg/mL~100mg/mL或1mg/mL~50mg/mL。

[0032] 在测定方法2中,混合液中的特定芳香族化合物的量只要是多糖类细胞支撑体来源成分的质量的至少200倍即可,能够设为200~20000倍、250~10000倍或300~5000倍。这样,能够通过让混合物含有过量的特定芳香族化合物,生成反应生成物。在此生成的反应生成物根据所选择的特定芳香族化合物的种类等不同,但在选择间萘二酚的情况下,得到的反应生成物能够显示出荧光性或吸光性,并显示不溶于乙酸丁酯、苯等有机溶剂,而可溶于乙醇等醇的性质,但不限于此。测定方法2中的特定芳香族化合物的量能够根据特定芳香族化合物的种类和糖类的种类来选择,能够设为多糖类细胞支撑体来源成分的质量的至少20倍、至少50倍或至少100倍。

[0033] 包含多糖类细胞支撑体来源成分、酸以及特定芳香族化合物的混合物还能够包含水性介质。作为此处的水性介质,能够举出:水、生理盐水、磷酸缓冲生理盐水(PBS)等。

[0034] 混合物的加热能够在70°C~120°C、80°C~110°C或80°C~100°C的温度下进行10分钟~24小时、30分钟~12小时或1小时~8小时。加热中也可以搅拌。由此,在混合物中生成与所选择的特定芳香族化合物的种类等对应的反应生成物。加热后的混合物可以冷却,例如能够冷却至60°C以下、40°C以下或室温(18°C~28°C)。

[0035] 在测定方法1中,包括对加热后的混合物中的反应生成物进行荧光分析或吸收光谱分析的工序。

在测定方法1中,反应生成物的荧光分析或吸收光谱分析通常能够为了该目的的进行而进行。例如,如以下方式进行。将生成的反应生成物冷却至室温,向反应生成物中加入不与水混溶的有机溶剂,搅拌后去除水相,得到有机相和不溶物的混合物。在得到的混合

物中添加醇,通过搅拌得到均匀的溶液。将得到的溶液进一步用醇稀释,能够将该稀释液用于分析。作为有机溶剂,例如能够使用醋酸丁酯、苯等。作为醇,例如能够使用乙醇等。

[0036] 作为分析方法,能够设为荧光分析或吸收光谱分析。分析方法能够根据得到的反应生成物的显色波长等进行选择。作为分析,不仅可以是反应生成物的检测,也可以是定量。

[0037] 具体而言,例如能够如以下那样进行。预先准备多个单糖类或糖类(以下,统统记为“糖类”)的浓度已知的模拟稀释液,对各个模拟稀释液,测定糖类的浓度和模拟稀释液的荧光强度,根据糖类的浓度与模拟稀释液的荧光强度的关系制作求出糖类的浓度的函数(或者,标准曲线),由此能够根据稀释液的荧光强度定量糖类的浓度。或者,能够对生成的反应生成物进行吸收光谱分析,根据得到的吸光度使用标准曲线等对糖类的浓度进行定量。从检测限或灵敏度的观点出发,优选使用荧光分析。

[0038] 在测定方法2中,包括对加热后的混合物中的反应生成物进行定量的工序。定量能够使用作为化合物的定量而通常进行的方法,也可以通过在测定方法1中说明的荧光分析或吸收光谱分析来定量糖类的浓度,但并不限于这些。

[0039] 在又一个实施方式中,能够预先确定细胞悬液中的多糖类细胞支撑体完全溶解时的糖类的量。由此,能够根据定量结果的糖类的浓度,确认细胞悬液中的多糖类细胞支撑体溶解的比例。

[0040] 上述细胞支撑体来源成分的测定方法能够简便且灵敏度良好地测定细胞支撑体来源成分,因此能够优选适用于利用可溶性的细胞支撑体的各种用途。

[0041] <评价方法>

对本实施方式的细胞悬液的评价方法进行说明。

一个实施方式的评价方法是包含在可溶性的细胞支撑体的存在下培养并在细胞支撑体溶解后回收的细胞的细胞悬液的评价方法,所述方法包括:准备从细胞悬液得到的评价用试样的工序;制备包含评价用试样、酸以及特定芳香族化合物的混合物的工序;加热混合物的工序;和对加热后的混合物中的反应生成物进行荧光分析或吸收光谱分析的工序(以下,有时有称为评价方法1的情况)。

另一实施方式的评价方法是包含在可溶性的细胞支撑体的存在下培养并在细胞支撑体溶解后回收的细胞的细胞悬液的评价方法,所述方法包括:准备从细胞悬液得到的评价用试样的工序;制备包含评价用试样、酸以及特定芳香族化合物的混合物的工序;加热混合物的工序;和对加热后的混合物中的反应生成物进行定量的工序,所述芳香族化合物的质量是由所述细胞支撑体水解而产生的糖类的质量的至少200倍(以下,有时有称为评价方法2的情况)。

[0042] 即,评价方法1和评价方法2是分别将测定方法1和测定方法2应用于细胞悬液的评价方法的评价方法。有时有将评价方法1和评价方法2统称为评价方法的情况。

根据本评价方法,能够简便且灵敏度良好地评价细胞悬液中的细胞支撑体来源成分。

[0043] 在本评价方法中,包括准备从细胞悬液得到的评价用试样的工序,其中,细胞悬液包含在可溶性的细胞支撑体的存在下培养并在细胞支撑体溶解后回收的细胞。

[0044] 在本说明书中,作为细胞,只要是能够粘附于细胞支撑体的粘附细胞即可,例如,

可举出：体细胞、干细胞等。作为体细胞，例如，可举出：内皮细胞、表皮细胞、上皮细胞、心肌细胞、成肌细胞、神经细胞、骨细胞、成骨细胞、成纤维细胞、脂肪细胞、肝细胞、肾细胞、胰细胞、肾上腺细胞、牙周膜细胞、牙龈细胞、骨膜细胞、皮肤细胞、树突细胞、巨噬细胞等。

[0045] 粘附细胞优选为动物来源的细胞，更优选为哺乳动物来源的细胞。作为哺乳动物，例如，可举出：人、猴子、黑猩猩、牛、猪、马、绵羊、山羊、兔、大鼠、小鼠、豚鼠、狗、猫等。粘附细胞例如可以是来源于皮肤、肝脏、肾脏、肌肉、骨、血管、血液、神经组织等组织的细胞。

[0046] 粘附细胞能够单独使用一种，或者将两种以上组合使用。在一个实施方式中，粘附细胞可以是干细胞。作为干细胞，能够举出：间充质干细胞、造血干细胞、神经干细胞、骨髓干细胞、生殖干细胞等体干细胞等，能够设为间充质干细胞或骨髓间充质干细胞。间充质干细胞是指存在于个体的各种组织中，能够分化为成骨细胞、软骨细胞和脂肪细胞等间充质细胞中的全部或几种的体干细胞。

作为干细胞，例如可以使用人工多能性干细胞(iPS细胞)、胚胎干细胞(ES细胞)、胚胎生殖干细胞(EG细胞)、多能性生殖干细胞(mGS细胞)、胚胎癌细胞(EC细胞)、Muse细胞等多能性干细胞。

[0047] 用于培养细胞的培养基优选含有无机盐、氨基酸、糖和水。培养基还可以含有血清、维生素、激素、抗生素、生长因子、粘附因子等任意的成分。作为培养基，能够使用作为细胞培养用的基础培养基而公知的培养基。

[0048] 即，作为培养基，只要是已知的用于培养所选择的细胞的培养基，就能够没有特别限制地使用，例如，可举出：DMEM(达尔伯克改良伊格尔培养基)、MEM(伊格尔最小必须培养基)、 $\alpha$ MEM培养基(伊格尔最小必须培养基 $\alpha$ 改良型)等，但不限于这些。

[0049] 在培养基中添加血清时，例如能够使用胎牛血清(FBS)、马血清、人血清等血清等。

用于培养的培养基能够设为不含有异源成分的培养基。不含有异源成分的培养基能够代替动物来源的血清而包含血清的代替添加物(例如血清替代物(Knockout Serum Replacement;KSR)(Invitrogen公司制造)、化学成分确定的脂质浓缩物(Chemically-defined Lipid concentrated)(Gibco公司制造)、Glutamax(Gibco公司制造)等)。

此外，还能够使用Essential 8(Thermo Fisher公司)、mTeSR1(STEMCELL Technologies公司)、StemFit系列(TakaraBio株式会社)、StemFlex(Thermo Fisher Scientific公司)等无血清培养基。

[0050] 在细胞的培养中使用的可溶性的细胞支撑体中，能够举出关于测定方法记载的细胞支撑体。关于细胞支撑体的溶解的事项，也能够将上述事项直接应用于本评价方法。

通过细胞支撑体的溶解，细胞能够从细胞支撑体中分离。从细胞支撑体中分离出的细胞能够通过通常使用的方法，例如利用过滤器的过滤、离心分离等的方法回收。回收后的细胞能够悬浮在适当的水性介质中，例如培养基、生理盐水等中，由此能够得到细胞悬液。

[0051] 在本说明书中，细胞悬液是指包含细胞的液体，此处的细胞能够是粘附于细胞支撑体或细胞支撑体的一部分的状态或未粘附的状态中的任一种。

[0052] 评价用试样只要是从细胞悬液得到的物质即可，例如可以是将细胞悬液直接作为评价用试样的物质、从细胞悬液去除细胞而作为评价用试样的物质，或者将细胞悬液的一部分或从细胞悬液去除细胞的液体的一部分与其他水性介质例如水混合而制备得到的物

质。评价用试样优选由不含细胞的液体构成。评价用试样可以在即将评价之前由细胞悬液制备,也可以预先获得作为评价用试样制备的物质。

[0053] 评价方法1和评价方法2包括:将如上所述准备的评价用试样与酸和特定芳香族化合物组合来制备混合物,并执行本说明书中记载的测定方法、例如测定方法1和测定方法2的工序。即,评价方法1和评价方法2包括:制备包含如上所述准备的评价用试样、酸和特定芳香族化合物的混合物的工序;使用得到的混合物分别进行测定方法1和测定方法2的工序。

[0054] 评价方法1和评价方法2分别对从细胞悬液得到的评价用试样执行测定方法1和测定方法2,因此能够简便且灵敏度良好地确认评价用试样和细胞悬液中有无细胞支撑体来源成分,在细胞悬液中包含细胞支撑体来源成分的情况下,能够简便且灵敏度良好地定量细胞悬液中的细胞支撑体来源成分。

[0055] 在本说明书中,关于测定方法1和测定方法2记述的事项也能够适用于评价方法1和评价方法2。在本说明书中,不限于测定方法1和测定方法2而记载的与测定方法相关的事项也能够适用于评价方法1和评价方法2。在本说明书中,与不限于评价方法1和评价方法2而记载的评价方法相关的事项也能够适用于测定方法1和测定方法2。在本说明书中,与不限于测定方法1和测定方法2而记载的测定方法相关的事项,也能够适用于不限于评价方法1和评价方法2而记载的评价方法。

[0056] 此外,第一实施方式的测定方法和评价方法的对象不限于细胞悬液中的细胞支撑体来源成分,也可以是不来源于细胞支撑体的糖成分。例如,在回收培养后的细胞而去除培养基成分,并悬浮于PBS等缓冲液中制备细胞悬液时,第一实施方式的测定方法和评价方法能够用于制备后的细胞悬液中的葡萄糖的定量。由此,能够关于培养基成分去除后的细胞悬液中的培养基成分的残留,进行细胞悬液的评价。

[0057] (第二实施方式)

在细胞培养方法中,有使用微载体对细胞进行三维培养的方法。微载体是由可溶性或不溶性的聚合物构成的主要采用球体形状的小颗粒,能够在细胞培养用的培养基等细胞悬液中支撑粘附性的细胞而促进细胞的生长。使用微载体的细胞培养由于是三维培养,因此能够进行细胞的大量培养,能够削减细胞培养所需的占地面积。在细胞培养后,能够使用酶等将细胞从微载体剥离而去除微载体,并回收细胞。

[0058] 但是,有时有将从微载体分离的细胞悬浮在其他培养基或液体中而制备细胞悬液的情况,但有时有在得到的细胞悬液中作为杂质混入比规定大小更小的微载体的小片的情况。作为这样的杂质,例如可举出微载体的原料中能够包含的小片等。因此,在使用微载体的细胞培养中,期望对得到的细胞悬液中有无混入来源于微载体的杂质进行评价。在大量培养细胞的情况下,难以进行精密的管理,因此有无混入杂质的评价变得更加重要。

[0059] <细胞悬液的评价方法>

作为一个实施方式的细胞悬液的评价方法,其特征在于,包括:在包含细胞的细胞悬液中添加能够对具有疏水部分的聚合物进行染色的荧光色素的工序;对添加了所述荧光色素的细胞悬液照射激发光来进行荧光分析的工序;和根据所述荧光分析来评价所述细胞悬液的工序。

由此,能够提供评价了有无混入微载体来源的杂质的细胞悬液。例如,能够提供评

价了有无混入微载体来源的具有疏水部分的聚合物的细胞悬液。作为一个方式,在提供细胞悬液的情况下,能够将提供悬液中所包含的微载体来源的杂质的存在、含有比例等记载在制品中而提供。

[0060] 包含细胞的细胞悬液是细胞分散在分散介质中的状态的液体。作为细胞悬液的分散介质,优选水性液体,更优选主溶剂为水,例如可以是磷酸缓冲液等缓冲液、培养基、生理盐水、纯水等。

作为评价对象的细胞悬液可以是培养细胞后的悬液,也可以是培养细胞前的悬液。另外,评价对象的细胞悬液可以进一步包含微载体等细胞载体,也可以是添加微载体等细胞载体后又去除的状态。另外,评价对象的细胞悬液也可以包含供于细胞培养的一般的添加剂。

[0061] 在评价对象的细胞悬液中,细胞的浓度没有特别限定。在测定高浓度的细胞悬液中的具有疏水部分的聚合物的情况下,也可以在添加任意的液体来调整细胞悬液的浓度后,添加荧光色素。

[0062] 为了评价细胞悬液而添加到细胞悬液中的荧光色素优选为能够对具有疏水部分的聚合物进行染色的荧光色素。

作为能够对具有疏水部分的聚合物进行染色的荧光色素,例如有具备具有芳香环的显色团的化合物等。显色团可具有例如:苯环、非苯环、杂芳环等单环;一种或两种以上的单环缩合而成的缩合芳香环;这些单环、缩合芳香环,或这些的组合通过任意的键而键合的多环结构。为了对具有疏水部分的聚合物显示亲和性而容易染色,显色团可以是具有两个以上的单环的多环结构、具有两个以上更优选三个以上的缩合芳香环的多环结构,或者具有总计两个以上的单环和缩合芳香环的多环结构。

[0063] 作为苯环、非苯环或这些的缩合芳香环,例如,可举出:苯环、环戊二烯环、萘环、蒽环、菲环、并四苯环、三亚苯环、荧蒽环、芘环、茈环、紫环酮环、茱环等。

[0064] 杂芳环优选在环上具有选自N、O、P和S组成的组中的至少一种原子,更优选具有N、O或这些的组合的杂芳环。

作为杂芳环或缩合杂芳环,例如,可举出:吡咯环、吡啶环、咪唑环、吡唑环、恶唑环、噻唑环、吡嗪环、嘧啶环、吡嗪环、苯并咪唑环、喹啉环、异喹啉环、吡啶环、吡嗪环;呋喃环、吡喃环、苯并呋喃环、二苯并呋喃环、苯并吡喃环、咕吨环、荧光素环;噻吩环、苯并噻吩环、二苯并噻吩环;卟啉环、二吡咯甲川环、酞菁环等。

[0065] 在荧光色素中,优选容易染色具有疏水部分的聚合物,并且难以染色细胞或不染色细胞的荧光色素。作为这样的荧光色素,可举出:具有两个以上的单环的芳香环、缩合芳香环或单环的芳香环与缩合芳香环的组合的低分子量化合物;具有两个以上的单环的芳香环、缩合芳香环或单环的芳香环与缩合芳香环的组合的高分子量化合物等。具体而言,可举出:卟啉、酞菁、聚亚苯基亚乙烯、茈、茈、紫环酮、咕吨、萘并荧光素等或这些的衍生物,更优选卟啉、聚亚苯基亚乙烯或这些的衍生物。

[0066] 在荧光色素的显色团或其附近可以导入亲水性基团。作为亲水性基团,例如,可举出:阴离子性基团、阳离子性基团、氨基、羟基、聚亚烷基二醇基团、羧基等。作为聚亚烷基二醇基,例如,可举出:聚乙二醇基、聚丙二醇基、聚乙二醇丙二醇基等。聚亚烷基二醇基的加成摩尔数例如为2~2000,优选为2~200。由于荧光色素具有亲水性基团,因此能够进一步

改善在分散介质中的溶解性。

在荧光色素的显色团或其附近可以导入离子性基团。作为离子性基团，可以是阴离子性基团和阳离子性基团中的任一种。微载体大多从细胞附着性的观点出发进行了阳离子处理，因此通过在荧光色素中导入阴离子性基团，能够使荧光色素进一步与微载体来源的具有疏水部分的聚合物键合而将其染色。作为阴离子性基团，例如，可举出：磺酸基、磷酸基、羧基和硝酸基。从细胞适应性的观点出发，能够优选使用磺酸基。

[0067] 作为能够染色具有疏水部分的聚合物的荧光色素，与是否对细胞进行染色无关，不限于上述化合物，也可以使用具备具有芳香环的显色团的低分子量化合物。作为这样的化合物，例如，能够举出：具有1个或两个以上，优选1个或两个单环、二环的缩合芳香环或三环的缩合芳香环的化合物。具体而言，可举出：香豆素色素、DCM色素、花青色素、喹啉色素、二吡咯甲川色素等。

[0068] 作为能够染色具有疏水部分的聚合物的荧光色素，例如，可举出：卟啉色素；酞菁色素；聚亚苯基亚乙烯或其衍生物等高分子量化合物；苝、茈、紫环酮等具有缩合芳香环的化合物；荧光素、萘并荧光素等咕吨色素；三苯基甲烷等三芳基甲烷色素；香豆素、香豆素6、香豆素30等香豆素色素；4-(二氰基亚甲基)-2-甲基-6-(4-二甲基氨基苯乙烯基)-4H-吡喃、2-叔丁基-4-(二氰亚甲基)-6-[2-(1,1,7,7-四甲基久咯尼定基-9-基)乙烯基]-4H-吡喃、4-(二氰基亚甲基)-2-甲基-6-[2-(2,3,6,7-四氢-1H,5H-苯并[i,j]喹啉-9-基)乙烯基]-4H-吡喃等DCM色素；花青色素；喹啉色素；BODIPY(注册商标；硼-二吡咯亚甲基)等二吡咯甲川色素等。

这些可以单独使用1种，也可以在不损害本公开的效果的范围内组合使用两种以上。

[0069] 更优选为选自由卟啉色素、酞菁色素、聚亚苯基亚乙烯色素、苝色素、咕吨色素、香豆素色素和DCM色素组成的组中的至少一种。

在此，卟啉色素是指含有卟啉或其衍生物的色素，其他色素的名称也同样地进行处理。

[0070] 在上述荧光色素中，能够优选使用多价阴离子系化合物、具有聚亚烷基二醇链的化合物、萘并荧光素、香豆素色素、DCM色素等，更优选地，从在细胞悬液中能够选择性地对具有疏水部分的聚合物进行染色的观点出发，可以使用多价阴离子系化合物、具有聚亚烷基二醇链的化合物、萘并荧光素，进一步优选地，从在细胞悬液中抑制细胞的染色并能够选择性地对具有疏水部分的聚合物进行的观点出发，可以使用多价阴离子系化合物。

[0071] 作为多价阴离子系化合物，可以是在显色团中导入了两个以上阴离子性基团的化合物，更优选在显色团中导入了4个以上阴离子性基团的化合物。例如，在具有缩合芳香环的低分子量化合物中导入了两个以上阴离子性基团的化合物，能够选择性地对具有疏水部分的聚合物染色而不是对细胞染色。作为这样的化合物，例如，可举出：卟啉、酞菁或这些的衍生物的多价阴离子等。具体而言，可举出：5,10,15,20,-四(3-溴-4-磺酸苯基)卟啉(TPPS)等。

另外，还能够举出在具有单环或缩合芳香环的高分子量化合物中导入了两个以上阴离子性基团的化合物。例如，可以是在具备多个具有芳香环的结构单元的共聚物中导入了两个以上阴离子性基团的化合物、具备多个具有芳香环和阴离子性基团的结构单元的共

聚合物等。作为这样的化合物,例如,可举出:聚亚苯基亚乙烯或这些的衍生物的多价阴离子等。该高分子量化化合物的分子量例如为100~100000,优选为100~10000。具体地,可举出聚(5-甲氧基-2-(3-磺丙氧基)-1,4-苯乙炔)。

[0072] 作为具有聚亚烷基二醇链的化合物,可以是在显色团中导入了聚亚烷基二醇链的化合物。作为该显色团,优选为茈、二萘嵌苯、茈酮(perinone)等缩合苯环。作为聚亚烷基二醇链,例如举出:聚乙二醇链、聚丙二醇链、聚乙二醇丙二醇链等。聚亚烷基二醇链的加成摩尔数例如为2~2000,优选为2~200。由于聚亚烷基二醇链具有亲水性,因此通过荧光色素能够容易地对具有疏水部分的聚合物进行染色。具体而言,可举出甲氧基聚乙二醇茈等。

[0073] 萘并荧光素是在咕吨骨架的显色团或其附近导入了羟基的荧光色素,并且具有荧光强度根据体系的pH而变化的特性。

[0074] 荧光色素例如可以具备在细胞内环境和细胞外环境中荧光特性不同的特性。由此,在细胞悬液中存在荧光色素的情况下,能够识别出将荧光色素摄入内部的细胞发出的荧光和具有疏水部分的聚合物发出的荧光,能够确定细胞悬液中具有疏水部分的聚合物的存在。

例如,在细胞内环境中不发出荧光,并且在细胞外环境中发出荧光的荧光色素的情况下,能够仅检测来自存在于细胞外环境中的具有疏水部分的聚合物的荧光。由此,能够确定具有疏水部分的聚合物的存在。作为其他的例子,在细胞内环境中发出的荧光强度低,并在细胞外环境下中发出的荧光强度高的荧光色素的情况下,在细胞悬液中,能够根据荧光强度的差,识别出细胞并确定具有疏水部分的聚合物的存在。

[0075] 也可以使用发出荧光的激发光的波长在细胞内外不同的荧光色素。例如,如果利用在第一波长范围的激发光时细胞内的荧光色素的荧光强度变高,在第二波长范围的激发光时细胞内的荧光色素的荧光强度变低,则在第二波长范围的激发光下可以将具有疏水部分的聚合物从细胞中识别出并确定。

也可以使用相对于激发波长发出的荧光的色调在细胞内外的环境中不同的荧光色素。

[0076] 作为这样的荧光色素,从上述荧光色素中可举出具有聚亚烷基二醇链的化合物、萘并荧光素等。

具有聚亚烷基二醇链的化合物在细胞内外形成多聚体的容易度不同,具有在细胞外形成多聚体而荧光强度变高的倾向。

在利用pH在细胞内外局部不同的情况下,能够使用荧光强度根据pH发生变化的萘并荧光素。

[0077] 作为荧光色素的一例,优选地,在细胞悬液中,具有疏水部分的聚合物被荧光色素染色而发出的荧光强度比细胞被荧光色素染色而发出的荧光强度高。在细胞悬液中,能够通过观察或测定荧光的强度来确认具有疏水部分的聚合物的荧光强度比细胞的荧光强度高。在一个实施方式中,在照射规定波长的激发光的情况下,在细胞悬液中检测不到细胞的荧光,而能够检测到具有疏水部分的聚合物的荧光。例如,在细胞悬液中,在规定波长的激发光照射中,细胞的荧光强度小于一定值(a),具有疏水部分的聚合物的荧光强度能够设为一定值(a)以上或一定值(a)的1.1倍以上,优选设为一定值(a)的两倍以上。

根据荧光色素的种类,荧光的激发光的波长不同,但优选选择使荧光色素荧光更

强烈的波长范围的激发光。

作为这样的荧光色素,可举出上述荧光色素中的多价阴离子系化合物等。

[0078] 作为荧光色素的另一例,能够举出具有如下特性的荧光色素:在细胞悬液中,当选自细胞悬液的温度、浓度和pH组成的组中的至少一种满足一定的范围时,具有疏水部分的聚合物被荧光色素染色而发出的荧光强度比细胞被荧光色素染色而发出的荧光强度高或低。在使用这样的荧光色素的情况下,能够通过调节细胞悬液的温度等之后检测荧光强度,从而容易地识别细胞和具有疏水性部分的聚合物。

例如,在使用通过从酸性到碱性的pH条件来检测荧光的荧光色素的情况下,在细胞悬液中添加荧光色素,将细胞悬液调节为酸性或碱性后,能够检测荧光。温度和浓度等条件也是相同的,也可以组合这些条件。

根据荧光色素的种类,荧光的激发光的波长不同,但优选使用使荧光色素强烈地发出荧光的波长范围的激发光照射。

作为能够在浓度条件下调节荧光强度的荧光色素,从上述荧光色素中可举出具有聚亚烷基二醇链的化合物等。作为能够在pH条件下调节荧光强度的荧光色素,可举出上述荧光色素中的萘并荧光素等。

[0079] 向细胞悬液中添加荧光色素的方法没有特别限定,例如可以向细胞悬液中添加粉末状、颗粒状等固体状的荧光色素,或者也可以向细胞悬液中添加将荧光色素分散或溶解于溶剂中而得到的组合物。

在细胞悬液中添加荧光色素后,为了在细胞悬液中均匀地配合荧光色素,优选进行混合或搅拌。

[0080] 具有疏水部分的聚合物是在使用微载体的细胞培养中能够存在于细胞悬液中的成分。细胞培养后去除微载体得到的细胞悬液优选包含细胞和液体,并且细胞以外的固体物量少,例如优选具有疏水部分的聚合物的含量少。例如,微载体的尺寸通常比细胞大,因此细胞培养后的微载体能够使用过滤器等从细胞悬液去除。但是,在尺寸比细胞小的微载体的小片的情况下,有时有不能够通过过滤器等从细胞悬液中去除的情况。即,可能包含在细胞悬液中的具有疏水部分的聚合物可能包含微载体的材料。另外,对于能够被酶等溶解的微载体,细胞悬液中也可能包含比细胞的尺寸小的溶解残留物。在溶解残留物中包含具有疏水部分的聚合物的情况下,也能够检测出该溶解残留物。

[0081] 以下,对微载体进行说明。

微载体的材料可以是有机物、无机物或这些的复合材料。其中,在使用由具有疏水部分的聚合物作为有机物而形成的微载体来进行细胞培养的情况下,基于一个实施方式的方法有助于在细胞悬液中评价具有疏水部分的聚合物。

作为有机物,例如,可举出:聚苯乙烯、聚酯、聚氨酯、聚乙烯、聚丙烯、(甲基)丙烯酸系聚合物、(甲基)丙烯酰胺系聚合物、聚乙烯醇、硅酮系聚合物、环氧树脂等合成高分子;胶原、明胶等天然高分子;果胶、果胶酸盐等聚半乳糖醛酸;藻酸盐、纤维素、交联琼脂糖、葡聚糖、壳聚糖等多糖类等。作为无机物,例如,可举出:玻璃、陶瓷、金属、合金、金属氧化物等。

[0082] 从细胞适应性的观点出发,微载体优选包含有机物。根据一个实施方式,在微载体由具有疏水部分的聚合物而形成的情况下,能够评价可能混入到细胞悬液中的具有疏水部

分的聚合物。作为具有疏水部分的聚合物,能够举出:上述合成高分子和天然高分子中具有疏水性的高分子,或者对上述合成高分子或天然高分子进行疏水化处理而得到的高分子。典型的是聚苯乙烯、聚酯等,优选聚苯乙烯。另外,也可以将在聚乙烯醇、(甲基)丙烯酸系聚合物的钠盐、导入了大量亲水性基团的共聚物等亲水性聚合物中导入了疏水性基团的物质作为微载体使用。作为疏水性基团,典型地可举出链状或环状烃基、芳香族烃基等。

[0083] 从细胞适应性的观点出发,也可以使用由水凝胶形成的微载体。作为该水凝胶,能够使用在聚乙烯醇、(甲基)丙烯酸系聚合物的钠盐、大量导入了亲水性基团的共聚物、明胶等亲水性聚合物中导入了疏水性基团而得到的水凝胶。作为疏水性基团,典型地可举出链状或环状烃基、芳香族烃基等。

[0084] 上述微载体可以单独使用一种或组合两种以上使用。其中,疏水性聚合物或具有疏水性基团的聚合物是在一个实施方式中可成为评价对象的聚合物,能够优选使用。

此外,即使包含在细胞悬液中的具有疏水部分的聚合物不是来源于微载体的情况下,也能够成为评价对象。

[0085] 从促进细胞的附着观点出发,可以在微载体的表面导入阳离子性官能团。作为阳离子性官能团,可举出:包含二甲基氨基、二乙基氨基、氨基等取代或非取代的阳离子性氨基的基团等。

从促进细胞的附着观点出发,也可以在微载体的表面配置细胞粘附性聚合物。作为细胞粘附性聚合物,可举出:胶原、明胶、藻酸、Matrigel基质胶(商标)(BD Biosciences)、透明质酸、层粘连蛋白、纤维粘连蛋白、玻连蛋白、弹性蛋白、硫酸乙酰肝素、葡聚糖、硫酸葡聚糖、硫酸软骨素等。

[0086] 作为微载体的形状,例如,可举出:球状、扁平状、圆柱状、板状、棱柱状等。微载体优选包含球状微载体。微载体可以是在内部具有细孔的多孔质微载体,也可以是在内部不具有细孔的微载体。

[0087] 从促进细胞增殖的观点出发,微载体的平均粒径(D50)例如为50~1000 $\mu\text{m}$ ,优选为100~500 $\mu\text{m}$ ,更优选为120~250 $\mu\text{m}$ ,进一步优选为150~250 $\mu\text{m}$ 。微载体的平均粒径是作为生理盐水或培养基中的中值粒径(D50)测定的值。微载体的平均粒径能够通过激光衍射散射式的粒径分布测定装置进行测定。

用于细胞培养的微载体优选大于供于细胞培养的细胞的尺寸。

[0088] 以下,对在细胞悬液中添加荧光色素并照射激发光而进行荧光分析,评价细胞悬液的方法进行说明。

[0089] 对添加了荧光色素的细胞悬液的荧光进行分析的方法没有特别限定。

在对添加了荧光色素的细胞悬液照射激发光的情况下,通过在细胞悬液中观察荧光,能够确认在细胞悬液中存在具有疏水部分的聚合物。此外,为了确认在细胞悬液中是否存在具有疏水部分的聚合物,优选在细胞悬液中细胞不发出荧光而具有疏水部分的聚合物发出荧光,或者来自细胞的荧光弱而来自具有疏水部分的聚合物的荧光强。作为这样的荧光色素,能够从上述荧光色素中使用多价阴离子化合物。另外,能够使用根据细胞悬液的环境而荧光特性不同的荧光色素,例如,能够从上述荧光色素中使用具有聚亚烷基二醇链的化合物或萘并荧光素。

另外,能够通过分析来自细胞悬液的荧光,并根据荧光强度的差来对比、评价具有

疏水部分的聚合物的量。

[0090] 通过细胞悬液的荧光分析,能够评价具有疏水部分的聚合物的存在或其量,进而,能够测定具有疏水部分的聚合物的尺寸、形状、浓度等或这些的组合。例如,通过一边对添加了荧光色素的细胞悬液照射激发光一边进行荧光显微镜观察,在包含具有疏水部分的聚合物的情况下,能够观察具有被荧光色素染色的疏水部分的聚合物。另外,根据荧光显微镜观察的图像分析,能够测定具有疏水部分的聚合物的尺寸、分布、浓度等。在其他方法中,通过一边对添加了荧光色素的细胞悬液照射激发光一边进行分光荧光光度分析,在包含具有疏水部分的聚合物的情况下,能够确认与空白相比荧光强度的高低。另外,通过预先制作标准曲线,能够根据荧光强度测定具有疏水部分的聚合物的浓度等。

根据荧光色素的种类,向细胞悬液照射的激发光优选为强烈地发出荧光的波长范围。

[0091] 作为细胞悬液的评价方法,能够包括下述工序:评价细胞悬液中存在粒径为细胞的尺寸以下的具有疏水部分的聚合物。

作为细胞培养后从细胞悬液中仅取出细胞的方法,根据细胞与细胞以外的固形物的尺寸不同,使用过滤器等从细胞悬液中去除细胞以外的固形物。该方法适合于去除尺寸比细胞大的固形物,但不适合于去除尺寸比细胞小或与细胞相同程度的固形物。此外,远小于细胞的尺寸的固形物能够通过置换细胞悬液的溶剂等方法清洗而去除。另一方面,如果来源于供于细胞培养的微载体的原料而含有的聚合物的小片等与细胞的尺寸为相同程度或其以下,则这些小粒径的聚合物有可能未从细胞悬液去除而混入。

[0092] 在一个实施方式中,为了评价细胞悬液是否包含小粒径的具有疏水部分的聚合物,能够使用上述评价方法。例如,细胞悬液包含小粒径的具有疏水部分的聚合物,则能够通过向细胞悬液中添加荧光色素,并检测荧光,从而评价具有疏水部分的聚合物的存在。另外,如在上述评价方法中说明的那样,能够通过荧光显微镜观察添加了荧光色素的细胞悬液,评价具有疏水部分的聚合物的存在的有无、形状、分布、浓度等。另外,能够通过向添加了荧光色素的细胞悬液进行分光荧光光度分析,从而评价有无具有疏水部分的聚合物的存在,并能够通过预先制作标准曲线,从而评价浓度等。

[0093] 在本说明书中,具有疏水部分的聚合物能够根据通过荧光显微镜观察而观察到的照片图像来判别尺寸。例如,适合于评价对象的小片状的具有疏水部分的聚合物可以是100nm~100 $\mu$ m的粒径范围,也可以是100nm~10 $\mu$ m的粒径范围。

[0094] 在本公开中,细胞的尺寸能够根据细胞的种类而不同,但通常为100 $\mu$ m以下,可以为60 $\mu$ m以下,也可以为30 $\mu$ m以下,也可以为20 $\mu$ m以下。另外,虽然细胞的尺寸没有特别限定,但通常为1 $\mu$ m以上,可以为5 $\mu$ m以上,也可以为10 $\mu$ m以上。例如,细胞悬液能够包含1~100 $\mu$ m的细胞,优选包含5~20 $\mu$ m的细胞。

在此,对细胞尺寸的测定方法没有特别限制,例如能够通过使用了细胞分选仪或流式细胞仪的已知方法进行测定。

[0095] 作为细胞悬液的评价方法,能够包括下述工序:评价细胞悬液中存在粒径为细胞尺寸的0.01倍~5倍的具有疏水部分的聚合物。

作为评价对象的具有疏水部分的聚合物的粒径,优选为细胞尺寸的0.01倍以上,可以为0.05倍以上,也可以为0.1倍以上。通过使具有疏水部分的聚合物的粒径在该范围

内,在荧光色素对具有疏水部分的聚合物进行染色而发出荧光的情况下,能够检测出荧光。

作为评价对象的具有疏水部分的聚合物的粒径,优选为细胞尺寸的5倍以下,可以为4倍以下,也可以为3倍以下。粒径为该范围的具有疏水部分的聚合物,即使在细胞培养后进行微载体的去除、清洗等或这些的组合的状态下,也可能包含在细胞悬液中,因此能够成为评价对象。

例如,作为评价对象的具有疏水部分的聚合物的粒径可以是细胞尺寸的0.01倍~5倍,也可以是细胞尺寸的0.05倍~4倍,也可以是细胞尺寸的0.1倍~3倍。

[0096] 细胞悬液能够设为使用细胞和微载体进行细胞培养,在细胞培养后分离细胞与微载体,并去除微载体后的细胞悬液。该细胞培养后的细胞悬液中添加的荧光色素优选对作为与细胞培养中使用的微载体相同的材料的具有疏水部分的聚合物进行染色。例如,能够使用上述荧光色素。

由此,在细胞培养后从细胞悬液中去除了供于细胞培养的微载体的状态下,能够评价细胞悬液中可能包含的微载体的小片等小粒径的具有疏水部分的聚合物。

[0097] 在细胞培养后从细胞悬液中去掉微载体的方法没有特别限定,能够通过适当的方法而从微载体中剥离细胞,根据微载体与细胞的尺寸不同,使用过滤器等去除较大粒径的微载体。

作为任选的工序,也可以包含清洗细胞培养后的细胞悬液的工序。由此,能够去除细胞悬液中所包含的比细胞更小的固形物,例如微载体原料中所可能包含的小片。

[0098] 在使用细胞培养后的细胞悬液的情况下,优选对下述中的至少一方进行评价:(1)评价细胞悬液中粒径为细胞的尺寸以下的具有疏水部分的聚合物的存在的工序、和(2)评价粒径为细胞培养中使用的微载体的平均粒径以下的具有疏水部分的聚合物的存在的工序。在组合(1)的评价和(2)的评价的情况下,可以在(1)的评价之后进行(2)的评价,也可以是相反的顺序,也可以同时进行(1)的评价和(2)的评价。

由此,在细胞培养后从细胞悬液中去除了供于细胞培养的微载体的状态下,能够测定细胞悬液中可能包含的微载体来源的小粒径的具有疏水部分的聚合物。

[0099] 如上所述,细胞培养后,比细胞更大的尺寸的固形物能够使用过滤器等从细胞悬液中去掉,但有时会残留比细胞更大且比细胞培养中使用的疏水性微载体更小的尺寸的固形物。

因此,不仅可以评价粒径为细胞尺寸以下的具有疏水部分的聚合物,也可以评价尺寸比细胞大且粒径为微载体的平均粒径以下的具有疏水部分的聚合物。例如,在使用适于从细胞悬液中去掉微载体的孔尺寸的过滤器的情况下,成为粒径比微载体的平均粒径更小的具有疏水部分的聚合物混入到细胞悬液的状态。作为这样的小粒径的具有疏水部分的聚合物,例如,可举出微载体的原料来源的小片等。

[0100] <细胞悬液>

作为一个实施方式的细胞悬液,其特征在于,其包含细胞,并且 $1\mu\text{m}$ 以下的具有疏水部分的聚合物的个数相对于 $1\times 10^4$ 个细胞为10个以下。

由此,能够提供评价了有无混入微载体来源的杂质的细胞悬液。

[0101] 细胞悬液是细胞分散在分散介质中的状态的液体。详细情况如上所述。作为以细胞悬液形式提供的物质,优选是在细胞培养后去除微载体等细胞载体的状态的物质。

在细胞培养后去除了微载体等细胞载体的细胞悬液中,优选不含有微载体本身,进而,优选不含有微载体的一部分,即其中疏水性的微载体来源的小粒径的具有疏水部分的聚合物。

[0102] 在细胞悬液中,优选粒径为典型的细胞尺寸以下的具有疏水部分的聚合物的个数少,例如,优选 $1\mu\text{m}$ 以下的具有疏水部分的聚合物的个数少。

在细胞悬液中, $1\mu\text{m}$ 以下的具有疏水部分的聚合物的个数相对于 $1\times 10^4$ 个细胞优选为10个以下,更优选8个以下,进一步优选6个以下。

在细胞悬液中, $1\mu\text{m}$ 以下的具有疏水部分的聚合物的个数相对于 $1\times 10^4$ 个细胞可以为0个,即不能检测出的状态,但在不需要用于完全去除小粒径的具有疏水部分的聚合物的追加工序的范围内,相对于 $1\times 10^4$ 个细胞可以为超过0个,也可以为一个以上。

例如, $1\mu\text{m}$ 以下的具有疏水部分的聚合物的个数相对于 $1\times 10^4$ 个细胞可以为0~10,可以为超过0~8,可以为1~6。

[0103] 这里,对于细胞悬液中 $1\mu\text{m}$ 以下的具有疏水部分的聚合物相对于 $1\times 10^4$ 个细胞的个数的测定方法,能够通过向细胞悬液中添加荧光色素,在使具有疏水部分的聚合物染色的状态下,使用显微镜观察等进行图像观察,测定在规定区域内观察到的具有疏水部分的聚合物的粒径,对在该规定区域内观察到的细胞的个数和 $1\mu\text{m}$ 以下的具有疏水部分的聚合物的个数进行计数而求出。另外,具有疏水部分的聚合物能够根据通过荧光显微镜观察而观察到的照片图像来判别尺寸。

$1\mu\text{m}$ 以下的具有疏水部分的聚合物相对于 $1\times 10^4$ 个细胞的个数也能够使用用于图像观察的图像进行图像分析并进行运算处理而求出。具有疏水部分的聚合物的粒径也同样能够通过图像解析求出。

在图像观察中,可以直接使用细胞悬液,也可以在不改变细胞和具有疏水部分的聚合物的比例的范围内添加溶剂进行稀释后,使用该稀释后的细胞悬液。

[0104] 作为基于另一实施方式的细胞悬液,其特征在于,包含细胞和能够对具有疏水部分的聚合物进行染色的荧光色素,所述具有疏水部分的聚合物被所述荧光色素染色而发出荧光的荧光强度比所述细胞被所述荧光色素染色而发出荧光的荧光强度更高。

由此,能够提供评价了有无混入微载体来源的杂质的细胞悬液。

[0105] 细胞悬液是细胞分散在分散介质中的状态的液体。关于详细内容如上所述。作为以细胞悬液形式提供的物质,优选是在细胞培养后去除微载体等细胞载体的状态的物质。

在细胞培养后去除了微载体等细胞载体的细胞悬液中,当然优选不包含微载体,进而,优选不包含微载体、尤其是疏水性的微载体来源的小粒径的具有疏水部分的聚合物。

例如,如上所述,在细胞悬液中, $1\mu\text{m}$ 以下的具有疏水部分的聚合物的个数相对于 $1\times 10^4$ 个细胞优选为10个以下。

[0106] 在该细胞悬液中优选包含细胞和荧光色素。作为荧光色素,如上所述。在细胞悬液中包含细胞和荧光色素的状态下,如果对细胞悬液照射激发光,则在细胞悬液中包含具有疏水部分的聚合物的情况下能够检测荧光。换言之,在细胞悬液中包含细胞和荧光色素的状态下,如果对细胞悬液照射激发光,则在细胞悬液中不包含具有疏水部分的聚合物或者为不发出荧光的程度的量的情况下,不能检测出荧光。

例如,该细胞悬液在细胞培养后添加荧光色素,在使用细胞悬液时照射激发光,由

此能够确认细胞悬液中具有疏水部分的聚合物的存在或能够根据荧光强度来确认浓度等。在准备细胞悬液的工序和使用细胞悬液的工序在时间上或空间上分开的情况下,即使在准备细胞悬液的工序中不进行严密的制品管理,在使用细胞悬液的工序中,也能够确认细胞悬液中的具有疏水部分的聚合物的存在或能够根据荧光强度来简便地确认浓度等。

[0107] <细胞悬液的评价用试剂>

作为基于一个实施方式的细胞悬液的评价用试剂,其特征在于,包含能够染色具有疏水部分的聚合物的荧光色素和缓冲液,渗透压为100~400mosm/Kg。

通过使用该试剂,能够评价微载体来源的杂质有无混入细胞悬液。

[0108] 通过将该试剂添加到细胞悬液中,在细胞悬液中包含具有疏水部分的聚合物的情况下,通过对细胞悬液照射激发光来检测来自细胞悬液的荧光,能够评价细胞悬液中存在具有疏水部分的聚合物。在细胞悬液中不存在具有疏水部分的聚合物的情况下,检测不到来自细胞悬液的荧光。

将该试剂添加到细胞悬液中,对细胞悬液照射激发光并且用荧光显微镜观察来自细胞悬液的荧光,在存在具有疏水部分的聚合物的情况下,能够进一步评价具有疏水部分的聚合物的形状、分布、浓度等。

将该试剂添加到细胞悬液中,对细胞悬液照射激发光并且对来自细胞悬液的荧光进行分光荧光光度分析,在存在具有疏水部分的聚合物的情况下,能够进一步评价具有疏水部分的聚合物的量、浓度等。

关于详细内容能够适用上述工序。

[0109] 在该试剂中,荧光色素能够使用上述荧光色素。在该试剂中,缓冲液能够使用磷酸缓冲液等。成为评价对象的具有疏水部分的聚合物与上述具有疏水部分的聚合物相同。

在该试剂中,荧光色素的浓度优选为1~1000 $\mu$ g/mL。

[0110] 该试剂的渗透压优选为100~400mosm/Kg。由此,抑制了试剂自身向细胞浸透,能够选择性地对具有疏水部分的聚合物进行染色,有助于评价细胞悬液中的具有疏水部分的聚合物的存在或其量。

该试剂的渗透压优选100mosm/Kg以上,更优选200mosm/Kg以上,进一步优选250mosm/Kg以上。

该试剂的渗透压优选400mosm/Kg以下,更优选375mosm/Kg以下,进一步优选350mosm/Kg以下。

在此,渗透压是在隔着半透膜将作为溶剂的水置于一方,将溶液置于另一方时,为了停止通过半透膜向溶液侧渗透的水的移动而施加于溶液侧的压力。

[0111] 根据一个实施方式,能够提供包含能够染色具有疏水部分的聚合物的荧光色素和缓冲液且渗透压为100~400mosm/Kg的试剂在用于评价细胞悬液中的用途。

[0112] <微载体的评价方法>

作为基于一个实施方式的微载体的评价方法,其特征在于,包括:准备包含用于细胞培养的微载体和液体,或包含处理所述微载体后的液体的试样的工序;在所述试样中添加能够对具有疏水部分的聚合物进行染色的荧光色素并进行荧光分析的工序;和根据所述试样的荧光分析来评价所述微载体的工序。

由此,能够提供一种评价了有无混入聚合物小片的微载体。例如,在使用该评价方

法确认微载体中小粒径的具有疏水部分的聚合物的含量少的基础上,通过使用该微载体准备细胞悬液,从而在得到的细胞悬液中,能够降低小粒径的具有疏水部分的聚合物的含量。

[0113] 用于细胞培养的微载体可以是未使用状态微载体,也可以是细胞培养后回收再利用的微载体。作为该评价对象的微载体,能够使用上述微载体。在一个实施方式中,能够优选评价由疏水性聚合物、具有疏水性基团的聚合物等形成的微载体。

[0114] 在包含微载体和液体的试样中,作为液体,优选为水性液体,主溶剂优选为水。

作为包含处理微载体后的液体的试样,例如包含使微载体原料分散于液体中后去除微载体的状态的液体。具体地说,是用液体清洗微载体,并回收微载体后的液体。作为该液体,优选为水性液体,主溶剂优选为水。

在试样中,微载体的浓度没有特别限定,能够设为0.1~100g/L、1~100g/L、1~50g/L或1~20g/L。在试样中微载体为高浓度的情况下,也可以用追加的液体稀释成适合于荧光分析的范围。

[0115] 添加到试样中的荧光色素能够使用上述荧光色素。在微载体的评价方法中,由于在试样中不存在细胞,所以只要是能够对具有疏水部分的聚合物进行染色的荧光色素都能够优选使用。从通用性或荧光强度的观点出发,能够优选使用香豆素色素、DCM色素。

荧光色素的添加方法、荧光的分析方法能够应用上述方法。

[0116] 以下,对在试样中添加荧光色素并照射激发光而进行荧光分析,评价微载体的方法进行说明。

[0117] 对添加了荧光色素的试样的荧光进行分析的方法没有特别限定。

在对添加了荧光色素的试样照射激发光的情况下,能够通过观察在试样中观察荧光,确认在试样中存在具有疏水部分的聚合物。

另外,能够通过分析来自试样的荧光,根据荧光强度的差来对比、评价具有疏水部分的聚合物的量。

[0118] 根据试样的荧光分析,能够评价具有疏水部分的聚合物的存在或其量,还能够测定具有疏水部分的聚合物的尺寸、形状、浓度等或这些的组合。在测定中例如能够使用荧光显微镜、分光荧光强度分析。关于详细内容,能够应用上述测定方法。

[0119] 作为微载体的评价方法,例如能够包括下述工序:对试样中粒径1 $\mu$ m以下的具有疏水部分的聚合物的存在或其量进行评价。典型的微载体的平均粒径为120~250 $\mu$ m,因此可以评价1 $\mu$ m以下的小粒径的小片的存在或其量。

[0120] 在使用包含微载体和液体的试样进行评价的情况下,是在试样中包含微载体的状态,进而是能够包含小粒径的具有疏水部分的聚合物的状态。因此,如果在试样中添加荧光色素,则能够检测出来自微载体的荧光,但还有从小粒径的具有疏水部分的聚合物发出荧光的可能。在此情况下,能够通过使用荧光显微镜等进行图像观察,判别微载体与小粒径的具有疏水部分的聚合物,评价小粒径的具有疏水部分的聚合物的存在。

[0121] 作为包含处理微载体后的液体的试样,在使用从液体中去除微载体后的试样进行评价的情况下,是在试样中不包含微载体的状态,是可能包含粒径比微载体更小的具有疏水部分的聚合物的状态。因此,能够通过添加荧光色素来检测荧光,评价试样中是否存在小粒径的具有疏水部分的聚合物。根据该评价结果,能够进一步评价在供给处理的微载体中是否包含小粒径的具有疏水部分的聚合物。另外,能够通过用荧光显微镜观察添

加了荧光色素的试样,评价具有疏水部分的聚合物的形状、分布、浓度等,评价可能包含在处理对象的微载体中的小粒径的具有疏水部分的聚合物的存在。另外,通过测定添加了荧光色素的试样的荧光强度,能够评价可能包含在处理对象微载体中的小粒径的具有疏水部分的聚合物的量、浓度等。

[0122] <细胞悬液的制造方法>

以下,对使用微载体的评价方法、细胞悬液的评价方法或这些的组合来制造细胞悬液的方法的一例进行说明。

作为一例的细胞悬液的制造方法(A)包括:清洗、过滤细胞培养用的微载体的工序;在过滤后的滤液中添加能够染色具有疏水部分的聚合物的荧光色素并进行荧光分析的工序;通过滤液的荧光分析来评价微载体的工序;和使用所评价的微载体进行细胞培养的工序。

[0123] 作为另一例的细胞悬液的制造方法(B)包括:使用包含微载体的组合物培养细胞的工序;从包含培养后的细胞和微载体的细胞悬液中去除微载体的工序;在去除了微载体的细胞悬液中添加能够染色具有疏水部分的聚合物的荧光色素并进行荧光分析的工序;和通过去除了微载体的细胞悬液的荧光分析来评价细胞悬液的工序。

[0124] 另外,作为另一例的细胞悬液的制造方法(C)包括:使用在上述制造方法(A)中评价的微载体进行细胞培养而得到细胞悬液的工序;从包含培养后的细胞和微载体的细胞悬液中去除微载体的工序;在去除了微载体的细胞悬液中添加能够染色具有疏水部分的聚合物的荧光色素并进行荧光分析的工序;通过去除了微载体的细胞悬液的荧光分析来评价细胞悬液的工序。

根据这些实施方式,分别地,能够评价具有疏水部分的聚合物有无混入到细胞悬液并提供细胞悬液。

[0125] 以下,使用图5所示的流程图说明细胞悬液的制造方法(A)。

首先,在清洗、过滤微载体的工序(S11)中,通过将粉末状或分散液状的微载体与液体混合并搅拌来进行清洗,清洗后使用过滤器等进行过滤,分离微载体与滤液。例如,为了分离典型尺寸的微载体,可以使用孔径1~100 $\mu\text{m}$ ,优选10~50 $\mu\text{m}$ 的过滤器。

接着,在向滤液中添加荧光色素的工序(S12)中,向滤液中添加荧光色素。荧光色素优选使用能够对具有疏水部分的聚合物进行染色的色素,例如可以使用上述荧光色素。另外,向滤液中添加荧光色素的方法没有特别限定,可以使用上述方法。

[0126] 接着,在判断添加了荧光色素的滤液的荧光强度是否在基准值以下的工序(S13)中,对添加了荧光色素的滤液照射激发光并测定荧光强度,判断测定值是否在基准值以下。该荧光强度低表示滤液中包含的具有疏水部分的聚合物的量少,作为结果能够评价微载体中包含的具有疏水部分的聚合物的小片少。在确认微载体中不含有具有疏水部分的聚合物的小片,或者具有疏水部分的聚合物的小片的量少的基础上,将微载体供于细胞培养,从而能够进一步防止具有疏水部分的聚合物的小片混入到最终得到的细胞悬液中。

作为S13中的基准值,只要设定为满足各种细胞培养所要求的适当基准即可。作为一个例子,能够将以浓度10质量%、优选1质量%包含将用于清洗的微载体破碎成1 $\mu\text{m}$ 以下的状态的具有疏水部分的聚合物的水的荧光强度用作基准值。在另一例中,能够使用以10g/L,优选1g/L包含平均粒径1 $\mu\text{m}$ 的聚苯乙烯的水的荧光强度作为基准值。进而,在其他方

法中,能够将在荧光显微镜观察下粒径 $1\mu\text{m}$ 以下的聚合物的小片为每单位面积 $10\text{个}/\text{m}^2$ 的状态作为基准值使用。

[0127] 在S13中,代替对添加了荧光色素的滤液照射激发光来测定荧光强度的方法,也可以使用对添加了荧光色素的滤液照射激发光来通过荧光显微镜或目视来检测荧光的方法。另外,也可以对添加了荧光色素的滤液照射激发光,使用荧光显微镜测定具有疏水部分的聚合物的形状、尺寸、浓度等,根据这些结果观察具有疏水部分的聚合物混入到滤液中的状态。根据该观察结果,也能够判断是否将微载体用于细胞培养。

[0128] 接着,在S13中满足基准值的情况下,能够将微载体供于细胞培养(S14)。在S13中不满足基准值的情况下,也能够再次返回S11,反复进行再清洗直到满足基准值。

[0129] 接着,使用图6所示的流程图说明细胞悬液的制造方法(B)。

首先,在使用包含细胞和微载体的组合物进行培养的工序(S21)中,能够使用包含细胞和微载体的组合物按照通常的方法进行细胞培养。

接着,在将细胞从微载体剥离的工序(S22)中,能够按照通常的方法将细胞从微载体剥离。例如,能够在细胞悬液中添加胰蛋白酶等蛋白水解酶等,从微载体中剥离细胞。

[0130] 接着,在从细胞悬液中去除微载体的工序(S23)中,能够按照通常的方法分离细胞与微载体。例如,通过使用过滤器等去除具有比细胞大的粒径的粗大颗粒,可以分离细胞与微载体。例如,为了去除典型尺寸的微载体,可以使用孔径为 $10\sim 150\mu\text{m}$ ,优选为 $50\sim 100\mu\text{m}$ 的过滤器。在该方法中,由于具有与细胞相同或比细胞更小的粒径的微小颗粒没有被去除,所以细胞和具有疏水部分的聚合物的小片没有被分离,具有疏水部分的聚合物的小片可能与细胞一起残留在细胞悬液中。另外,在细胞和微载体的比重不同的情况下,也可以使用离心分离进行分离。

[0131] 接着,清洗细胞悬液的工序(S24)是任选的工序,可以根据需要进行设置。在该S24中,例如通过置换细胞悬液的分散介质等,能够去除细胞悬液中可能包含的微小颗粒。在细胞悬液中,可能包含能够混入到微载体的原料自身中的具有疏水部分的聚合物的小片等。这样的具有疏水部分的聚合物的小片在比细胞更小的粒径的范围内,能够通过清洗来去除。

通过S23和D24,能够去除比细胞更大的粗大颗粒和比细胞小的微小颗粒,但是为与细胞相同或与细胞同程度的大小的颗粒未能从细胞悬液去除的状态。

[0132] 接着,在向滤液中添加荧光色素的工序(S25)中,向细胞悬液中添加荧光色素。荧光色素优选使用能够对具有疏水部分的聚合物进行染色的色素,例如可以使用上述荧光色素。另外,向细胞悬液中添加荧光色素的方法没有特别限定,可以使用上述方法。

[0133] 接着,在判断添加了荧光色素的细胞悬液的荧光强度是否在基准值以下的工序(S26)中,对添加了荧光色素的细胞悬液照射激发光来测定荧光强度,判断测定值是否在基准值以下。该荧光强度低表示细胞悬液中包含的具有疏水部分的聚合物的量少。

作为S26中的基准值,只要设定为满足各种细胞培养所要求的适当基准即可。作为一个例子,能够将以浓度 $10\text{质量}\%$ 、优选 $1\text{质量}\%$ 包含将用于清洗的微载体破碎成 $1\mu\text{m}$ 以下的状态的具有疏水部分的聚合物的水的荧光强度用作基准值。在另一例中,能够使用以 $10\text{g}/\text{L}$ ,优选 $1\text{g}/\text{L}$ 包含平均粒径 $1\mu\text{m}$ 的聚苯乙烯的水的荧光强度作为基准值。进而,在其他方法中,能够将在荧光显微镜观察下粒径 $1\mu\text{m}$ 以下的聚合物的小片为每单位面积 $10\text{个}/\text{m}^2$ 的状

态作为基准值使用。

[0134] 在S26中,代替对添加了荧光色素的细胞悬液照射激发光来测定荧光强度的方法,也可以使用对添加了荧光色素的细胞悬液照射激发光来通过荧光显微镜或目视来检测荧光的方法。另外,也可以对添加了荧光色素的细胞悬液照射激发光,使用荧光显微镜测定具有疏水部分的聚合物的形状、尺寸、浓度等,根据这些结果观察具有疏水部分的聚合物混入到细胞悬液中的状态。根据该观察结果,也可以评价具有疏水部分的聚合物向细胞悬液的混入量。另外,也能够使用该观察结果,从细胞悬液进一步去除具有疏水部分的聚合物。

[0135] 以下,说明使用微载体来培养细胞的方法的一例。

基于一个实施方式的细胞培养方法能够包括:准备微载体的工序;将微载体配置在培养系统中的工序;和在微载体的存在下培养细胞的工序。

在将微载体配置在培养系统中的工序中,例如,能够预先将对象细胞接种在培养系统中,其后在培养系统中配置微载体。

[0136] 作为能够作为培养对象的细胞,可以使用在被微载体支撑的状态下细胞生长能够得到促进的细胞,例如优选粘附细胞。细胞可以是体细胞,例如可以是干细胞、前体细胞、分化后的细胞等,优选干细胞。

细胞优选为动物来源的细胞,更优选为哺乳动物来源的细胞。作为哺乳动物,例如,可举出:人、猴子、黑猩猩、牛、猪、马、绵羊、山羊、兔、大鼠、小鼠、豚鼠、狗、猫等。细胞来源的组织没有特别限定,例如可以是皮肤、肝脏、肾脏、肌肉、骨、血管、血液、神经组织等。细胞可以是原代培养细胞、培养细胞株、重组培养细胞株等。

[0137] 作为干细胞,例如,可举出:间充质干细胞、造血干细胞、神经干细胞、骨髓干细胞、生殖干细胞、牙髓干细胞等体干细胞等,优选间充质干细胞。间充质干细胞广义上是指存在于个体的各种组织中,能够分化为成骨细胞、软骨细胞和脂肪细胞等间充质细胞的全部或几种的体干细胞。作为间充质干细胞,例如,可举出:骨髓来源的间充质干细胞、脐带来源的间充质干细胞、脂肪组织来源的间充质干细胞等,优选骨髓来源的间充质干细胞。

作为干细胞,例如可以使用人工多能性干细胞(iPS细胞)、胚胎干细胞(ES细胞)、胚胎生殖干细胞(EG细胞)、多能性生殖干细胞(mGS细胞)、胚胎癌细胞(EC细胞)、Muse细胞等多能性干细胞。

[0138] 作为细胞,例如,可举出:内皮细胞、表皮细胞、上皮细胞、心肌细胞、成肌细胞、神经细胞、骨细胞、成骨细胞、成纤维细胞、脂肪细胞、肝细胞、肾细胞、胰细胞、肾上腺细胞、牙周膜细胞、牙龈细胞、骨膜细胞、皮肤细胞、树突细胞、巨噬细胞、淋巴细胞等分化后的细胞;也可以是处于从干细胞向这些分化后的细胞的前阶段的前体细胞等。

上述细胞能够单独使用一种或组合两种以上使用。

[0139] 用于培养细胞的培养基优选含有无机盐、氨基酸、糖和水。培养基还可以含有血清、维生素、激素、抗生素、生长因子、粘附因子等任意的成分。作为培养基,能够使用作为细胞培养用的基础培养基而公知的培养基。

[0140] 即,作为培养基,只要是已知的用于培养所选择的细胞的培养基,就能够没有特别限制地使用,例如,可举出:DMEM(达尔伯克改良伊格尔培养基)、MEM(伊格尔最小必须培养基)、 $\alpha$ MEM培养基(伊格尔最小必须培养基 $\alpha$ 改良型)等,但不限于这些些。

[0141] 在培养基中添加血清时,例如能够使用胎牛血清(FBS)、马血清、人血清等血清等。

用于培养的培养基能够不含有异源成分。不含有异源成分的培养基能够代替动物来源的血清而包含血清的代替添加物(例如血清替代物(KSR)(Invitrogen公司制造)、化学成分确定的脂质浓缩物(Gibco公司制造)、Glutamax(Gibco公司制造)等)。

此外,还能够使用Essential 8(Thermo Fisher公司)、mTeSR1(STEMCELL Technologies公司)、StemFit系列(TakaraBio株式会社)、StemFlex(Thermo Fisher Scientific公司)等无血清培养基。

[0142] 培养基中可以根据需要添加添加剂。作为添加剂,例如,可举出:维生素A、维生素B1、维生素B2、维生素B6、维生素B12、维生素C、维生素D等维生素;叶酸等辅酶;甘氨酸、丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、异亮氨酸、亮氨酸等氨基酸;乳酸等作为碳源的糖或有机酸;EGF、FGF、PDGF、TGF- $\beta$ 等生长因子;IL-1、IL-6等白介素;TNF- $\alpha$ 、TNF- $\beta$ 、瘦素等细胞因子;转铁蛋白等金属转运蛋白;铁离子、硒离子、锌离子等金属离子; $\beta$ -巯基乙醇、谷胱甘肽等SH试剂;白蛋白等蛋白质等。

[0143] 细胞培养方法没有特别限定,可以使用适合于各种细胞的方法。通常,细胞的培养能够在30~40°C的范围内,优选36~37°C的温度,pH在6.2~7.7的范围内,优选7.4,CO<sub>2</sub>浓度为4~10体积%,优选5~7体积%的环境下进行。

[0144] 使用微载体的培养根据细胞的种类、微载体的种类而不同,但例如能够相对于 $1 \times 10^3 \sim 20 \times 10^5$  cells/mL,优选 $5 \times 10^3 \sim 10 \times 10^5$  cells/mL的细胞,组合例如0.1~100g/L,优选1.0~20g/L的微载体来进行。

[0145] 第二实施方式能够包括以下各种实施方式。

实施方式(1)是包括评价细胞悬液的工序的方法,所述评价细胞悬液的工序包括:在包含细胞的细胞悬液中添加能够对具有疏水部分的聚合物进行染色的荧光色素的工序;对添加了所述荧光色素的细胞悬液照射激发光而进行荧光分析的工序;和根据所述荧光分析来评价所述细胞悬液的工序。

[0146] 实施方式(2)是包括评价所述微载体的工序的方法,所述评价所述微载体的工序包括:准备包含用于细胞培养的微载体和液体,或包含处理所述微载体后的液体的试样的工序;在所述试样中添加能够对具有疏水部分的聚合物进行染色的荧光色素并进行荧光分析的工序;和根据所述荧光分析来评价所述微载体的工序。

[0147] 实施方式(3)是一种细胞悬液,其包含细胞,并且1 $\mu$ m以下的具有疏水部分的聚合物的个数相对于 $1 \times 10^4$ 个所述为10个以下。

实施方式(4)是一种细胞悬液,其包含细胞和能够对具有疏水部分的聚合物进行染色的荧光色素,所述具有疏水部分的聚合物被所述荧光色素染色而发出荧光的荧光强度比所述细胞被所述荧光色素染色而发出荧光的荧光强度更高。

实施方式(5)是一种细胞悬液的评价用试剂,其包含能够染色具有疏水部分的聚合物的荧光色素和缓冲液,渗透压为100~400mosm/Kg。

实施方式(6)是一种包含能够染色具有疏水部分的聚合物的荧光色素和缓冲液且渗透压为100~400mosm/Kg的试剂在用于评价细胞悬液中的用途。

[0148] 在实施方式(1)、(2)、(5)或(6)中,所述荧光色素可以包含选自由卟啉色素、酞菁色素、聚亚苯基亚乙烯色素、苝色素、咕吨色素、香豆素色素和DCM色素组成的组中的至少一种。

在实施方式(1)、(2)、(5)或(6)中,所述荧光色素可以在细胞内环境和细胞外环境中具有不同的荧光特性。

在实施方式(1)、(2)、(5)或(6)中,所述荧光色素在所述细胞悬液中对所述具有疏水部分的聚合物进行染色而发出的荧光强度可以比在所述细胞悬液中对所述细胞进行染色而发出的荧光强度高。

[0149] 在实施方式(1)中可以是:通过所述细胞悬液的荧光分析,评价所述细胞悬液中的所述具有疏水部分的聚合物的存在或其量。

在实施方式(1)中可以是:通过所述细胞悬液的荧光分析,测定选自所述细胞悬液中的所述具有疏水部分的聚合物的尺寸、形状和浓度组成的组中的至少一种。

在实施方式(1)中可以是:通过所述细胞悬液的荧光分析,测定所述具有疏水部分的聚合物的粒径,评价粒径为所述细胞尺寸以下的具有疏水部分的聚合物的存在。

在实施方式(1)中可以是:通过所述细胞悬液的荧光分析,测定所述具有疏水部分的聚合物的粒径,评价粒径为所述细胞尺寸的0.01倍~5倍的具有疏水部分的聚合物的存在。

在实施方式(1)中可以是:在所述细胞悬液中,在选自所述细胞悬液的温度、浓度和pH组成的组中的至少一种满足一定的范围的情况下,所述荧光色素在所述细胞悬液中对所述具有疏水部分的聚合物进行染色而发出的荧光强度比在所述细胞悬液中对所述细胞进行染色而发出的荧光强度高。

在实施方式(1)中可以是:所述细胞悬液是使用细胞和微载体进行细胞培养,细胞培养后分离所述细胞与所述微载体,去除所述微载体后的细胞悬液。

在实施方式(1)中可以是:通过所述细胞悬液的荧光分析测定所述具有疏水部分的聚合物的粒径,评价粒径为所述微载体的平均粒径以下的具有疏水部分的聚合物的存在。

[0150] 在实施方式(2)中可以是:通过所述试样的荧光分析,在所述微载体中评价具有1 $\mu$ m以下的粒径的疏水部分的聚合物的存在或者其量。

在实施方式(2)中可以是:所述试样是使用液体清洗所述微载体、过滤而得到的滤液。

[0151] 在本说明书中,使用“~”表示的数值范围表示“~”的前后记载的数值分别作为最小值和最大值而包含的范围。在本说明书中阶段性记载的数值范围中,某阶段的数值范围的上限值或下限值能够与其他阶段的数值范围的上限值或下限值任意组合。本说明书中示例的材料只要没有特别说明,能够单独使用一种或组合两种以上使用。在本说明书中,组合物中的各成分的含量,在组合物中存在多个相当于各成分的物质,只要没有特别说明,是指组合物中存在的该多个物质的总计量。术语“工序”不仅是独立的工序,即使在不能与其他工序明确区分的情况下,只要能够实现该工序所期望的作用,也包含在本用语中。

#### 实施例

[0152] 以下,通过实施例更详细地说明本发明,但只要不脱离本发明的技术思想,本发明并不限定于该实施例。

[0153] <制造例1>

准备表1所示浓度的果胶的水溶液和PBS溶液(以下,称为“果胶溶液”),分别在螺

旋盖试管中加入果胶溶液0.5mL、浓盐酸(12mol/L)0.5mL和间萘二酚10mg,制备混合物,一边在90℃下搅拌两小时一边进行加热,得到反应混合物。

[0154] 将反应混合物冷却至室温后,向冷却后的反应混合物中添加1.0mL的乙酸丁酯,搅拌1分钟。接着,从试样去除水相,得到有机相与不溶物的混合物。

在得到的混合物中添加1.0mL的乙醇,通过搅拌而得到均匀的溶液。

[0155] 将得到的溶液进一步用乙醇稀释100倍后,测定激发波长512nm下的荧光强度。此外,荧光分析使用荧光分光光度计(日本分光株式会社)。结果示于表1。

[0156] [表1]

果胶浓度 [ $\mu\text{g/mL}$ ]	荧光强度 [a.u.]
10	14.44
20	30.95
40	64.75
80	113.65

[0157] 由表1的结果可知,能够对试样中的果胶进行荧光分析处理,并且能够通过使用相对于果胶量多的量的间萘二酚来定量。另外,可知果胶的浓度与荧光强度成比例关系,通过使用标准曲线等,能够从荧光强度确认果胶的浓度。根据该方法,通过对糖类进行荧光分析或吸收光谱分析,能够简便且灵敏度良好地测定或定量试样中的糖类。因此,即使是多糖类,也能够通过组合水解和荧光分析或吸收光谱分析,简便且灵敏度良好地测定多糖类的水解物。

[0158] 因此,通过应用本公开的测定方法,对于在使用可溶性的多糖类细胞支撑体培养细胞后,溶解细胞支撑体并回收细胞而得到的细胞悬液,能够以细胞支撑体的残留物的有无、残留量等为指标,简便地进行评价。

[0159] <制造例2:细胞悬液的评价方法>

[色素溶液、细胞悬液、微载体碎片分散液的制作]

通过用磷酸缓冲盐水(PBS)稀释下述的色素粉末或色素原液,制备 $1\mu\text{g/mL}$ ~ $1000\mu\text{g/mL}$ 浓度的色素溶液。

人间充质干细胞(hMSC;从TakaraBio株式会社购入)的细胞悬液,是通过胰蛋白酶处理回收培养后的hMSC后,进行离心分离和PBS清洗而制备的。细胞密度为 $8.2 \times 10^5 \text{ cells/mL}$ 。

作为微载体碎片分散液,准备了在玻璃小瓶中装入5g的微载体(直径 $125 \sim 212\mu\text{m}$ ;球状的交联聚苯乙烯;Pall公司制造“SoloHill Star-Plus”,用磁力搅拌子破碎1天,用 $60\mu\text{m}$ 的筛网过滤而成的滤液。即,准备了包含通过 $60\mu\text{m}$ 网眼的小粒径的微载体碎片的分散液。

[0160] [色素溶液]

使用的色素和色素溶液的浓度如下。

色素(a1):四苯基卟啉四磺酸(TPPS); $1\mu\text{g/mL}$ 。

色素(a2):聚(5-甲氧基-2-(3-磺丙氧基)-1,4-苯乙炔); $100\mu\text{g/mL}$ 。

色素(a3):甲氧基聚乙二醇苾;1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

色素(a4):萘并荧光素;10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0161] 色素(a5):BD140;1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

色素(a6):香豆素6;1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

色素(a7):DCM(4-(二氰基亚甲基)-2-甲基-6-(4-二甲基氨基苯乙烯基)-4H-吡喃);1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0162] [染色和观察]

将细胞悬液500 $\mu\text{L}$ 与微载体碎片分散液50 $\mu\text{L}$ 在24孔板中混合后,添加色素溶液50 $\mu\text{L}$ ,搅拌后静置10分钟。然后,用荧光显微镜观察得到的混合物的明视场图像和荧光图像。

[0163] 作为空白试样,将细胞悬液500 $\mu\text{L}$ 和PBS(磷酸缓冲生理盐水)50 $\mu\text{L}$ 在24孔板中混合后,添加色素溶液50 $\mu\text{L}$ ,搅拌后静置10分钟。然后,用荧光显微镜观察得到的混合物的明视场图像和荧光图像。

[0164] 蓝色荧光用360~370nm的激发光观察,绿色荧光用450~480nm的激发光观察,红色荧光用510~550nm的激发光观察。

色素(a1)用红色荧光观察,色素(a2)用绿色荧光观察,色素(a3)用蓝色荧光和红色荧光观察,色素(a4)用绿色荧光和红色荧光观察,色素(a5)用红色荧光观察,色素(a6)用绿色荧光观察,色素(a7)用红色荧光观察。

[0165] 得到的明视场图像和荧光图像示于图1。在图1中,左列的图像为包含细胞和荧光色素的空白试样,右列的图像为包含细胞、荧光色素和微载体碎片的试样。在图1中,上部是明视场像,下部是荧光像。

图中(a1)是使用色素(a1)的例子,下部是红色荧光的观察像。细胞几乎没有荧光,但是以强烈的红色荧光观察到微载体碎片。

图中(a2)是使用色素(a2)的例子,下部是绿色荧光的观察像。细胞几乎没有荧光,但是以强烈的绿色荧光观察到微载体碎片。

[0166] 得到的明视场图像和荧光图像示于图2。图2中,左列的图像为包含细胞和荧光色素的空白试样,右列的图像为包含细胞、荧光色素和微载体碎片的试样。在图2中,上部是明视场像,中间是蓝色(a3)或绿色(a4)的荧光像,下部是红色的荧光像。

图中(a3)是使用色素(a3)的例子。用360~370nm波长的光激发时,细胞和微载体碎片产生蓝色荧光,用510~550nm波长的光激发时,细胞不产生荧光,在红色荧光下观察到微载体碎片。

图中(a4)是使用色素(a4)的例子。用450~480nm波长的光激发时,细胞和微载体碎片发出绿色荧光,用510~550nm波长的光激发时,细胞不发出荧光,在红色荧光下观察到微载体碎片。

[0167] 观察色素(a5)得到的明视场图像和荧光图像示于图3。在图3中,上部的图像(a5-1)是包含细胞和荧光色素的空白试样,下部的图像(a5-2)是包含细胞、荧光色素和微载体碎片的试样。图中的试样(a5-1)和试样(a5-2)分别是左上为明视场像,左下为蓝色荧光像,右上为粉红色荧光像,右下为红色荧光像。

色素(a5)在粉红色荧光像和红色荧光像中观察到细胞和微载体碎片。根据粉红色或红色的荧光像,能够根据形状区别并判别细胞和微载体碎片。色素(a5)为蓝色荧光像,荧

光强度低,但观察到微载体碎片。能够根据蓝色的荧光像,判别有无微载体碎片的存在。

[0168] 色素(a6)和色素(a7)的情况也同样,能够分别从荧光像中根据形状区别并判别细胞和微载体碎片。

[0169] <制造例3:细胞培养前的微载体的评价>

[微载体的清洗]

准备了微载体(直径125~212 $\mu\text{m}$ ;球状的交联聚苯乙烯;Pall公司制造“SoloHill Star-Plus”)。

将3g的微载体与25mL的水混合,使用孔径10 $\mu\text{m}$ 的过滤器将混合液过滤并清洗。重复该清洗操作3次。

[0170] [色素溶液]

使用的荧光色素和色素溶液的浓度如下。

色素(b1):四苯基卟啉四磺酸(TPPS);1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

色素(b2):香豆素6;1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

色素(b3):DCM(4-(二氰基亚甲基)-2-甲基-6-(4-二甲基氨基苯乙烯基)-4H-吡喃);1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0171] [染色和观察]

在微载体的第3次清洗后的滤液500 $\mu\text{L}$ 中添加色素溶液50 $\mu\text{L}$ ,搅拌后静置10分钟。然后,用荧光显微镜观察得到的混合物的明视场图像和荧光图像。

[0172] 绿色荧光用450~480nm的激发光观察,红色荧光用510~550nm的激发光观察。

色素(b1)用红色荧光观察,色素(b2)用绿色荧光观察,色素(b3)用红色荧光观察。

[0173] 得到的明视场图像和荧光图像示于图4。在图4中,上部是明视场像,下部是荧光像。

图中(b1)是使用色素(b1)的例子,下部是红色的荧光像。在色素(b1)中,在上部的明视场像中观察到的微载体的小片在下部的荧光像中也被观察到,能够在红色荧光下确认微载体的小片。

图中(b2)是使用色素(b2)的例子,下部是绿色的荧光像。在色素(b2)中,在上部的明视场像中观察到的微载体的小片在下部的荧光像中也被观察到,能够在绿色荧光下确认微载体的小片。

图中(b3)是使用色素(b3)的例子,下部是红色的荧光像。在色素(b3)中,在上部的明视场像中观察到的微载体的小片在下部的荧光像中也被观察到,微载体的小片能够在红色荧光下确认。

由于在微载体清洗后的滤液中能够确认到微载体的小片,因此评价为在清洗前的微载体中混入有小片。另外,根据图像观察,评价混入清洗前的微载体中的小片的尺寸和分布。

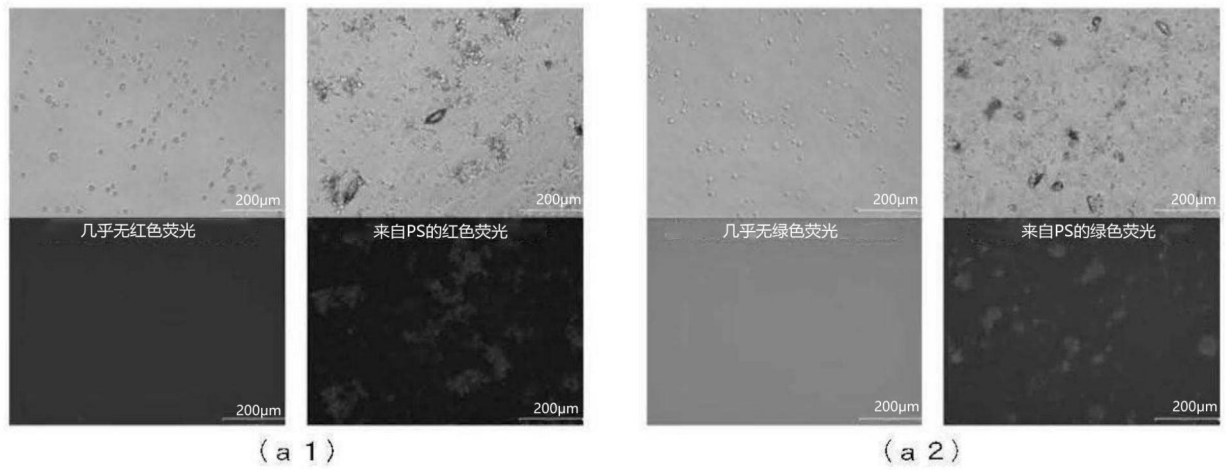


图1

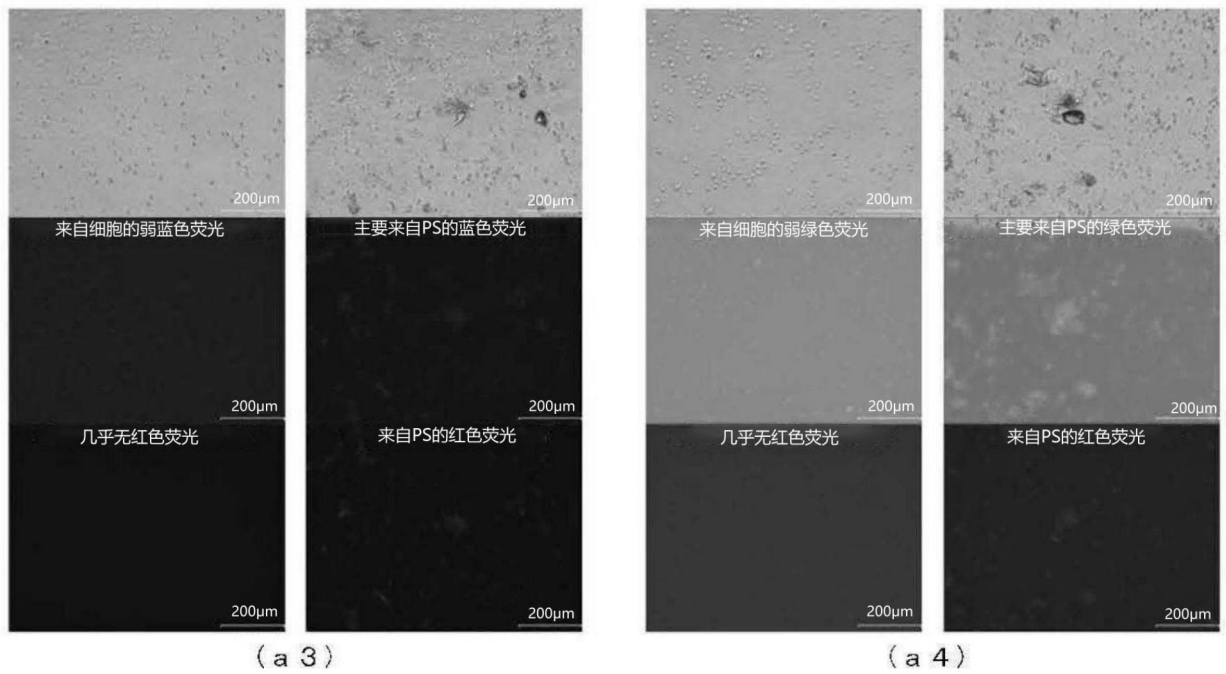


图2

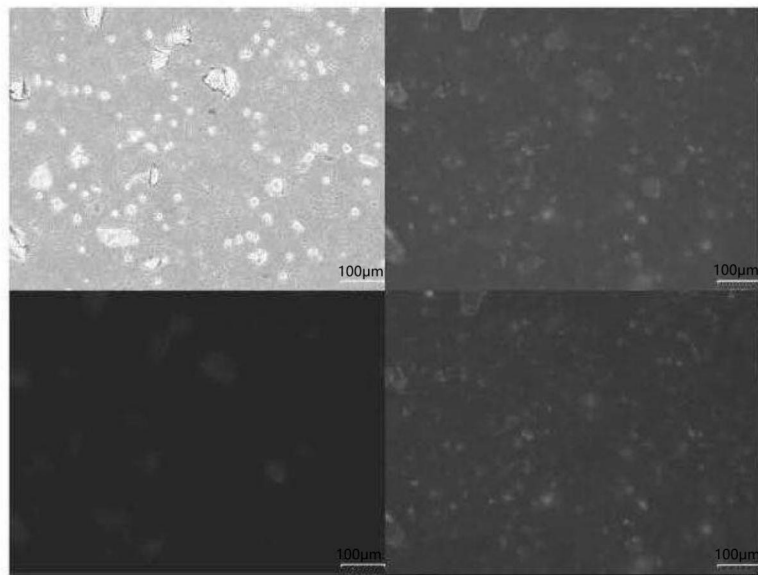
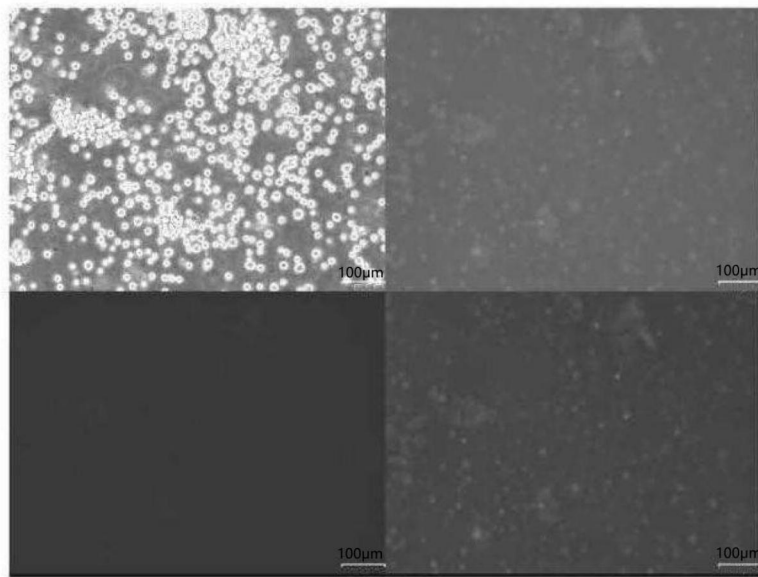


图3

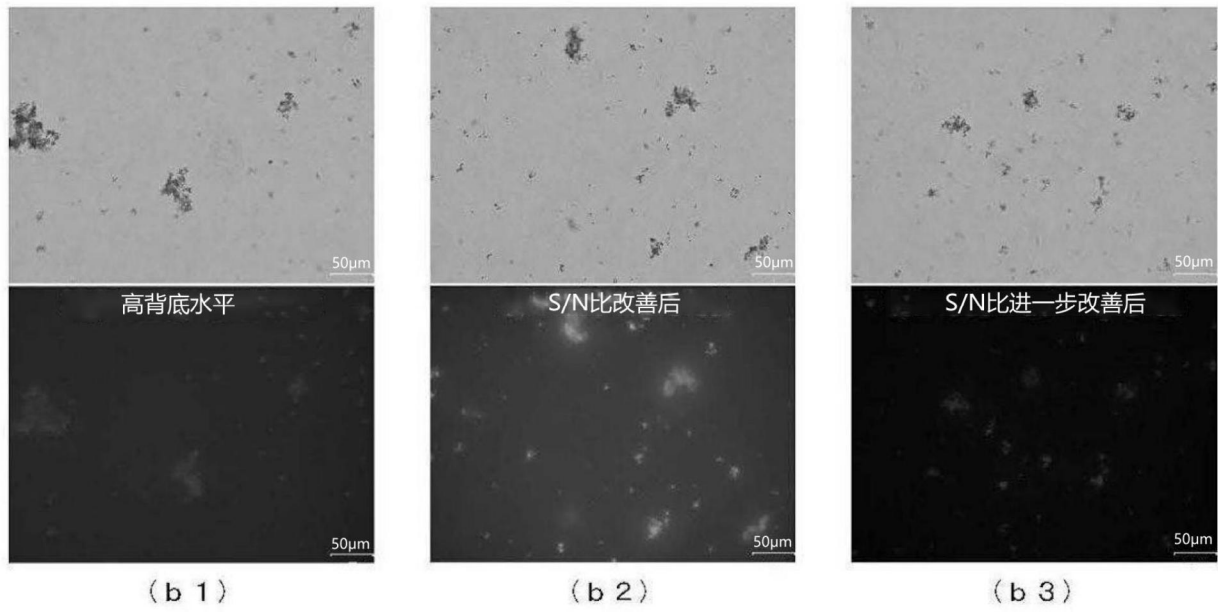


图4

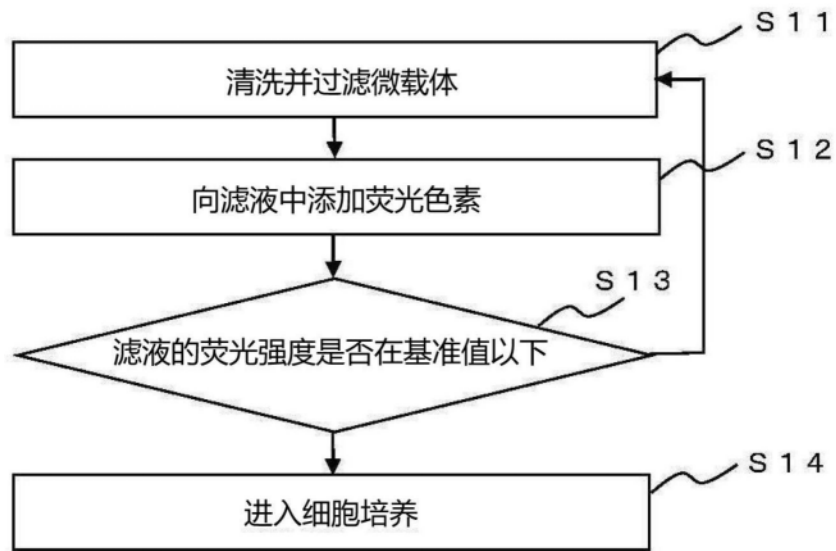


图5

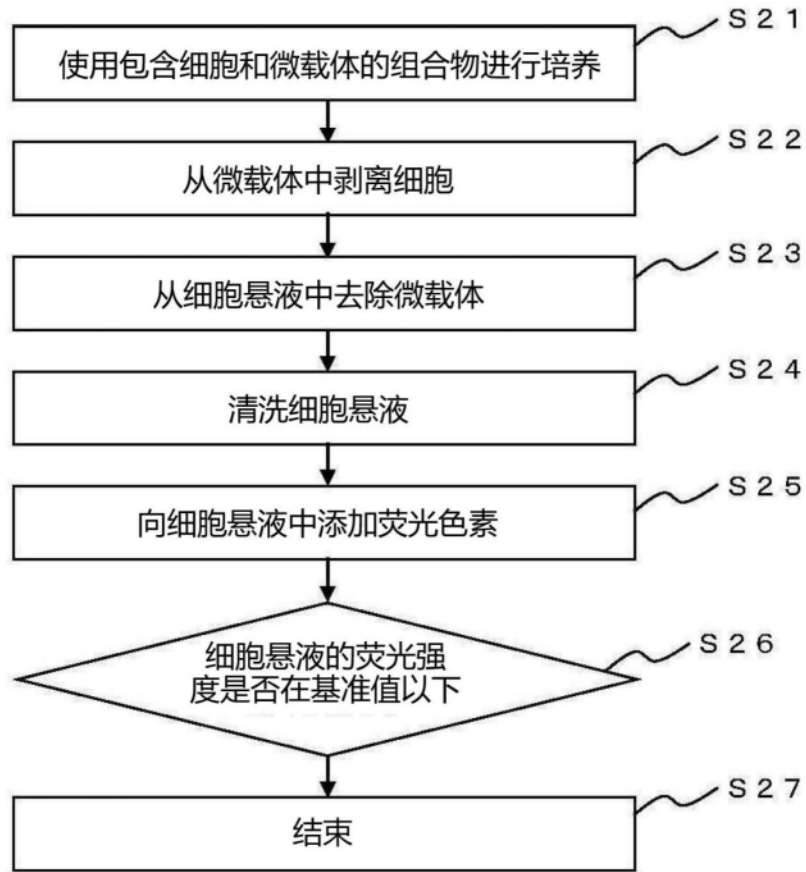


图6