

近年来, 各种研究机构和企业再生医疗的治疗应用方面投入了越来越多的精力。通过在体外培养细胞和组织后进行移植, 治疗受伤和疾病的再生医疗有望改善在现有的医疗条件下难以治愈的疾病, 因此受到了广泛关注。2014年, 作为世界上首次使用人类 iPS 细胞的临床研究, 进行了视网膜色素上皮细胞的移植。以此为开端, 实施了培养神经细胞、培养软骨细胞、培养心肌细胞片等的临床试验, 表明再生医学正在从研究阶段逐步转向临床应用阶段。另一方面, 在进入临床应用之前, 还有一些问题需要解决, 其中一项最为重要的品质问题是建立用于移植的培养细胞与组织的质量管理技术。在目前的情况下, 有些时候必须依赖于专家进行质量判断, 因此需要提供一种可以对培养细胞和组织各种特性进行定量评估的质量管理方法, 以促进再生医学的未来普及。

作为上述特性的定量评估示例, 本文中介绍相当于细胞团(培养组织模型)硬度的变形强度*1 检测案例。岛津制作所的微压缩试验机 MCT™ 适用于微型样品的压缩试验, 可应用于柔软试样——细胞团的测量。一般来说, 细胞和组织比较脆弱, 很难使用试验机进行力学定量评估, 但通过 MCT 的高精度位移检测和试验力测量, 可以完成变形强度的定量评估。使用高精度试验机进行定量评估, 有望对再生医疗的普及贡献一份力量。

D. Hiramaru, C. Oya

* 1 变形强度

通过本文第 2 而的公式 (1) 计算求得的强度。在 JIS Z 8844 (微小颗粒破坏强度及变形强度的测量方法) 中进行了定义。

■ 试样

本试验中使用 HEK293、iPS 细胞 (人类 iPS 细胞株) A、B 等三种细胞制作了细胞团。HEK293 是源于人类胎儿肾脏的细胞株, 是一种通用细胞系。iPS 细胞 A、B 是使用源于不同人的细胞, 通过相同的方法建立的 iPS 细胞株。

通过上述三种细胞形成细胞团的方法采用了使用低粘附力 U 型底 96 孔板的方法。所使用的试剂等如表 1 所示。另外, 形成方法的详情如表 2 所示。在对本次的细胞团进行试验时, 为使其失活而进行了固定化处理。

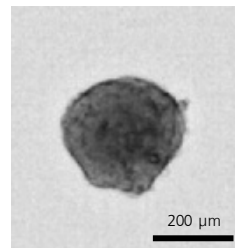
形成的细胞团情形如图 1 所示。从上面和侧面的图像可以看出, 得到了具有合适球形形态的细胞团。

表 1 使用试剂类

培养容器	: 低粘附力 U 型底 96 孔板
HEK293	: 培养基...D-MEM、FBS
iPS 细胞	: 培养基...AK02N、ROCK 抑制剂...Y-27632
固定化试剂	: 4% 多聚甲醛

表 2 细胞团形成步骤

1	在 96 孔板中播种细胞 (播种密度: 1×10^3 cells/well)
2	培养 4 天
3	多聚甲醛固定化处理
4	在 PBS 内保存



a. 上面图像 (溶液中)



B. 侧面图像 (大气中)

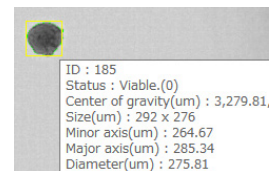
图 1 细胞团 (HEK293)

■ 测量细胞团的粒径

使用 Cell³ imager duos (SCREEN 公司) 评估了所培养细胞团的形状信息。使用本装置可以一次性获取在 96 孔板上培养的细胞团形状信息。关于本试验所需的细胞团尺寸信息, 本装置可以在 4 分钟之内完成约 200 个孔 (相当于两个 96 孔板) 的测量, 非常方便地获取尺寸信息。所得到的 HEK293、iPS 细胞 A、B 等三种细胞团的平均尺寸如表 3 所示。计算变形强度时, 使用了通过本方法测量的粒径。



a. 装置外观



B. 图像分析结果示例

图 2 基于 Cell³ imager duos 的分析

表 3 细胞团样品的平均尺寸

HEK293	Φ 231.31 μm
iPS 细胞 A	Φ 243.13 μm
iPS 细胞 B	Φ 225.59 μm

■ 试验方法

图3所示为预处理方法。用微量移液管将细胞团逐个滴到载玻片上。如果液滴覆盖了细胞团，开始压缩时，会首先附着在压盘上，对试验造成影响，因此，使用擦拭纸和棉签轻轻擦拭液滴，在30秒以内使用MCT-510进行了压缩试验。

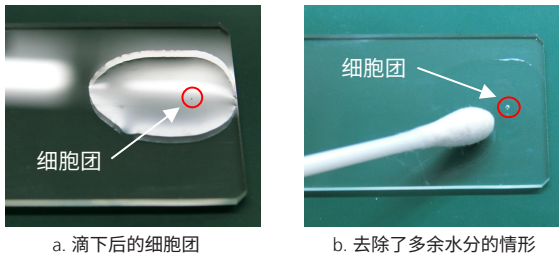


图3 试验预处理方法

表4所示为MCT-510试验条件。图4所示为MCT-510的外观和试验示意图。使用MCT-510可以对颗粒逐个进行压缩试验，并且可以通过使用侧面观察套件，用视频观察压缩情形。

另外，变形强度的计算公式如下所示。该公式中的粒径d使用的是用Cell³imager duos测量的值。通常，测量粒径长度时使用MCT-510附带的光学显微镜，但在本试验中使用的细胞团会因为干燥、细胞团本身的柔软性而进行变形，因此，使用了Cell³imagerduos的测量值。

$$\sigma_{10\%} = \frac{F_{10\%}}{A} \dots (1)$$

$$A = \frac{\pi d^2}{4}$$

- $\sigma_{10\%}$: 相对于粒径压缩位移10%的变形强度 [Pa]
- $F_{10\%}$: 相对于粒径压缩位移10%的试验力 [N]
- A : 代表面积 [m²]
(通过压缩前测量的粒径求得的等圆面积)
- d : 粒径 [m]

表4 MCT-510的试验条件

试验机	: MCT-510
上部加压块 (μm)	: Φ500
试验模式	: 软质测量模式
试验力 (mN)	: 400
加载速度 (mN/sec)	: 3.8736
测量次数 (次)	: 5

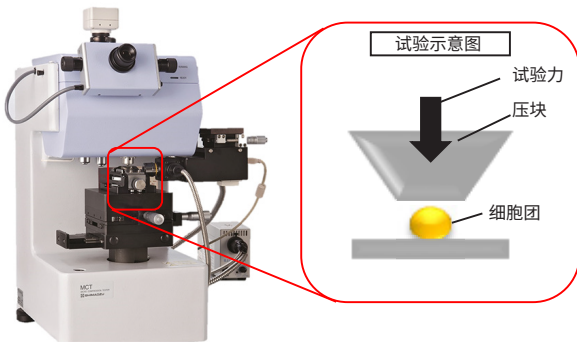


图4 MCT™-510的外观和试验示意图

MCT是岛津制作所株式会社在日本和其他国家的商标。
此外，本文中出现的公司名称和产品名称是各公司的商标及注册商标。
本文中有些部分对“TM”和“®”进行了省略。
本文中记载的产品不作为《药品和医疗器械法》批准或认证的医疗器械。
本文中记载的分析手法不可用于诊断目的。

■ 试验结果

表5所示为试验结果（各5点的平均值）。因为未检测到明确的破坏点，因此，根据粒径变形10%时的试验力计算了变形强度 $\sigma_{10\%}$ 。各变形强度的顺序如下所示。结果表明，HEK293和iPS细胞A可见显著差异，同时，不同来源的iPS细胞之间也可见差异。

HEK293 > iPS 细胞 B > iPS 细胞 A

试验力-位移图如图5所示，使用MCT-510压缩细胞团的情形如图6所示。HEK293的位移约为20~60μm、iPS细胞的位移约为20~40μm的部分是试验力变化较小的范围，该范围内的细胞团变形较大。

表5 实验结果

样品	HEK293	iPS 细胞 A	iPS 细胞 B
平均直径[μm]	271.78	243.13	225.59
变形强度 $\sigma_{10\%}$ [MPa]	1.91	1.26	1.77

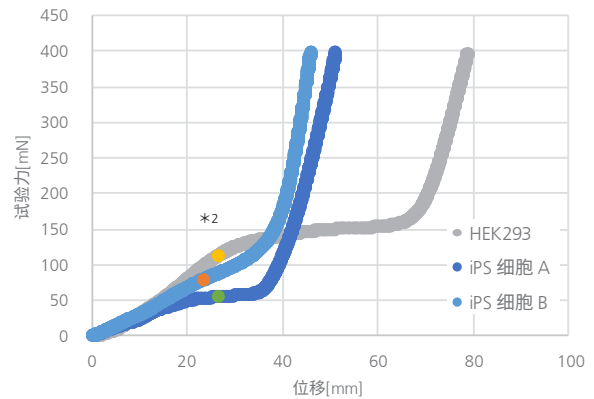


图5 试验力-位移图

*2 图表中的点表示粒径变形10%。

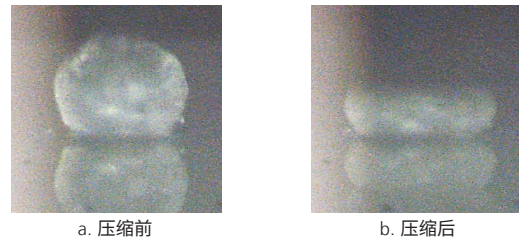


图6 使用MCT-510压缩细胞团的情形（侧面观察套件）

■ 总结

作为在今后的再生医疗普及中所需的对细胞和组织进行定量质量管理示例，本文介绍了利用力学特性——变形强度进行定量评估的实例。使用岛津的MCT-510，可以对质地柔软、评估困难的细胞团进行压缩试验。结果表明可以区分每种细胞类型的特征。此外，即使是同类的细胞，也可以检测到不同来源引起的差异，因此有望用于细胞和组织的质量控制。微压缩试验机MCT-510是一种可作为柔软、易变形试样的新评估指标使用的试验机。

岛津应用云



岛津企业管理（中国）有限公司
岛津（香港）有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

用户服务热线电话：800-810-0439
400-650-0439

免责声明：

* 本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售；
* 本资料中的所有信息仅供参考，不予任何保证。
如有变动，恕不另行通知。

第一版发行日：2020年9月