

細胞塊の圧縮試験

近年、再生医療の治療応用に向けて、様々な研究機関や企業により精力的な研究が行われています。所望の細胞や組織を体外で培養した後に移植を行う事でケガや病気を治療する再生医療は、現状の医療では治療が困難とされる疾患を改善できる可能性があり、期待を集めています。2014年にヒトiPS細胞を用いた世界初の臨床研究として網膜色素上皮細胞の移植が実施されました。これを皮切りに培養神経細胞、培養軟骨細胞、培養心筋細胞シートなどの臨床試験が実施されており、再生医療が研究の段階から臨床応用の段階へ移行しつつあることを示しています。一方で、このような臨床応用に至るにはいくつかの問題があり、その中で重要なものの一つとして、移植に用いる培養細胞・組織の品質管理技術の確立があります。現状では、熟練者による良否判定に頼らざるを得ない部分があり、今後の再生医療の普及に向けて培養細胞・組織の様々な特性を定量的に評価する品質管理方法が求められています。

本報では、そのような特性の定量評価の一例として、培養組織のモデルである細胞塊の硬さに相当するものとして変形強度*1を測定した事例を紹介いたします。島津製作所微小圧縮試験機MCT™は微小なサンプルの圧縮試験に適しており、柔軟な試料である細胞塊にも適応可能です。一般に細胞や組織は脆弱であり、試験機を用いた力学的な定量評価を行うことが困難とされていますが、MCTの高精度な変位検出と試験力測定により、変形強度について定量的な評価を実現します。高精度な試験機を用いた定量評価により、再生医療の普及への一助となることが期待されます。

D. Hiramuru, C. Oya

*1 変形強度

本書2ページの式(1)の計算により求められる強度。JIS Z 8844(微小粒子の破壊強度及び変形強度の測定方法)にて定義されている。

試料

本試験では、HEK293、iPS細胞(ヒトiPS細胞株)A、Bの3種類の細胞から細胞塊を作成しました。HEK293はヒト胎児の腎由来の細胞株で汎用セルラインの1種類です。iPS細胞A、Bは、異なるヒト由来の細胞を同じ方法で樹立したiPS細胞株です。

上記3種類の細胞から細胞塊を形成する方法として、低接着U底96ウェルプレートを用いた方法を採用しました。使用した試薬などを表1に示します。また、形成方法の詳細は、表2の通りです。今回の細胞塊については、失活させるため固定化の処理をして試験を行っています。

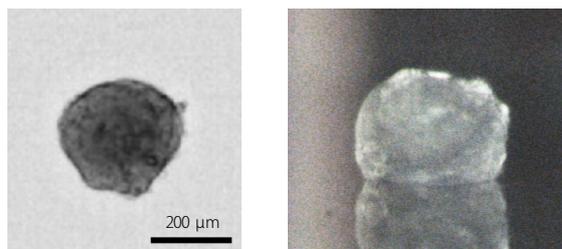
形成した細胞塊の様子を図1に示します。上面と側面の画像から適切な球状の形態の細胞塊が得られていることがわかります。

表1 使用試薬類

培養容器	: 低接着U底96ウェルプレート
HEK293	: 培地…D-MEM、FBS
iPS細胞	: 培地…AK02N、ROCK阻害剤…Y-27632
固定化試薬	: 4%パラホルムアルデヒド

表2 細胞塊形成手順

1	96ウェルプレートに細胞を播種(播種密度: 1×10^3 cells/well)
2	培養4日間
3	パラホルムアルデヒド固定化処理
4	PBS内で保存



a. 上面像(液中) b. 側面像(大気中)

図1 細胞塊(HEK293)

細胞塊の粒子径測定

培養した細胞塊の形状情報の評価にはCell³ imager duos(SCREEN社)を用いました。本装置では96ウェルプレート上で培養された細胞塊の形状情報を一度に取得することが可能です。本試験に必要な細胞塊のサイズ情報について約200ウェル(96ウェルプレート2枚分)の計測を4分以内に完了し、非常に簡便にサイズ情報を取得することができました。得られたHEK293、iPS細胞A、Bの3種類の細胞塊の平均サイズについて表3に示します。変形強度の算出には本手法で計測した粒子径を用いました。



a. 装置外観 b. 画像からの解析結果例

図2 Cell³ imager duosによる解析

表3 細胞塊サンプルの平均サイズ

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

■ 試験方法

図3に試験前処理方法を示します。マイクロピペットで細胞塊を1粒ずつスライドガラス上に滴下しました。液滴が細胞塊を覆っていると、圧縮開始時に液滴が先に圧盤に付着し試験の妨げとなるため、紙ワイパー・綿棒で軽く液滴をふき取り30秒以内にMCT-510を用いて圧縮試験を行いました。



a. 滴下後の細胞塊
b. 余分な水分を除去する様子
図3 試験前処理方法

表4にMCT-510の試験条件を示します。図4にMCT-510の外観と試験の模式図を示します。MCT-510では粒子一粒ずつの圧縮試験を実施でき、サイド観察キットを用いることで圧縮の様子を動画で確認できます。

また以下に変形強度の算出式を示します。この式に用いられる粒子径 d には Cell³ imager duos で測定した値を使用しました。通常、粒子径の測長には MCT-510 に付属された光学顕微鏡を用いますが、本試験で用いた細胞塊は乾燥や細胞塊自身の柔軟性による変形の恐れがあるため、Cell³ imager duos で測定した値を使用しました。

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

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

- $\sigma_{10\%}$: 粒子径の10%の圧縮変位に対する変形強度 [Pa]
- $F_{10\%}$: 粒子径の10%の圧縮変位に対する試験力 [N]
- A : 代表面積 [m²]
(圧縮前に計測した粒子径によって求めた相当円の面積)
- d : 粒子径 [m]

表4 MCT-510の試験条件

試験機	: MCT-510
上部加圧圧子 (μm)	: Φ500
試験モード	: 軟質測定モード
試験力 (mN)	: 400
負荷速度 (mN/sec)	: 3.8736
測定回数 (回)	: 5

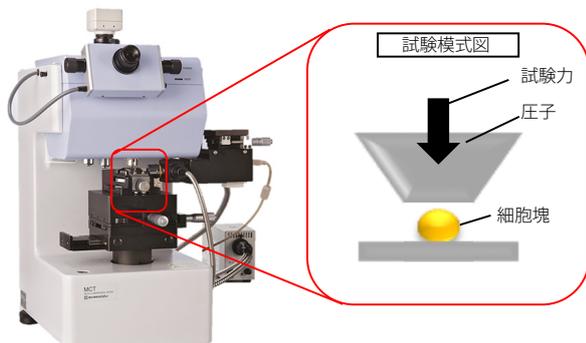


図4 MCT™-510の外観と試験の模式図

MCTは、株式会社島津製作所の日本およびその他の国における商標です。その他、本文中に記載されている会社名および製品名は、各社の商標および登録商標です。本文中では「TM」、「®」を明記していません。

本文中に記載されている製品は、医薬品医療機器等法に基づく医療機器として承認・認証を受けた機器ではありません。本文中に記載されている分析手法を診断目的で使用することはできません。

株式会社 島津製作所

分析計測事業部
グローバルアプリケーション開発センター

初版発行：2020年9月

島津コールセンター ☎0120-131691
(075) 813-1691

※本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。改訂版は下記の会員制 Web Solutions Navigator で閲覧できます。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/>

会員制 Web の閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。

■ 試験結果

表5に試験結果(各5点の平均値)を示します。明確な破壊点が見られなかったため、粒子径の10%変形時の試験力から変形強度 $\sigma_{10\%}$ を算出しました。それぞれの変形強度の順は以下の通りです。HEK293とiPS細胞Aについては、有意な差が見られ、さらに由来の異なるiPS細胞間でも差が見られることが明らかとなりました。

HEK293 > iPS細胞B > iPS細胞A

試験力-変位線図を図5に、MCT-510による細胞塊圧縮の様子を図6に示します。HEK293では変位量約20~60μm、iPS細胞では約20~40μmの部分で試験力の変化が小さい領域があり、この領域で細胞塊が大きく変形しています。

表5 試験結果

サンプル	HEK293	iPS細胞A	iPS細胞B
平均径 [μm]	271.78	243.13	225.59
変形強度 $\sigma_{10\%}$ [MPa]	1.91	1.26	1.77

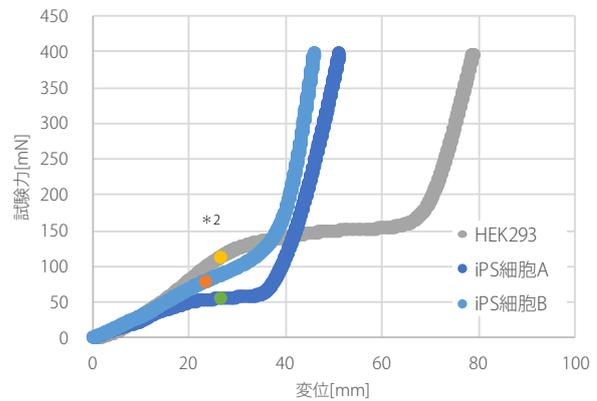


図5 試験力-変位線図

*2 グラフ中の点は粒子径の10%変形を示す。



a. 圧縮前
b. 圧縮後
図6 MCT-510による細胞塊圧縮の様子(サイド観察キット)

■ まとめ

本報は、今後の再生医療の普及において必要とされる細胞・組織の定量的な品質管理の一例として、その力学的特性である変形強度を利用し定量的な評価とする事例を紹介しました。

一般的に軟らかく評価が困難とされる細胞塊に対して、島津のMCT-510を使用して圧縮試験を実施することができました。その結果は細胞種ごとの特徴を判別できる可能性を示しています。さらに同種の細胞であってもその由来による差異を検出できたことから、細胞・組織の品質管理への応用が期待できます。微小圧縮試験機MCT-510は軟らかく変形しやすい試料の新しい評価指標として有用な試験機です。