

再生医療分野におけるpH測定の要望と今後の展開

Request for pH Measurement in Regenerative Medicine Field and Future Development

宮村 和宏

Kazuhiro MIYAMURA

市成 祐一

Yuichi ICHINARI

再生医療は人体の組織を人工的に作り機能を回復する治療法として普及すべく、目まぐるしい研究開発が行われている。この再生医療を一般化するためには、iPS細胞などの幹細胞を大量に培養する必要がある。安定して大量培養するには培養液のpHモニタリングは必須項目である。この細胞培養用pHセンサーには「無菌環境の維持」、「溶出物の細胞への影響」、「測定の安定性」が必要である。細胞培養用シングルユースpH電極の一例として、細胞培養容器に接続可能なγ線滅菌済みのpH電極を紹介する。結果、本電極にて2週間以上の細胞培養を実施し、培養液の0.1 pH以内のpH制御を実現した。今後も、我々は再生医療分野からの新しい分析への要望に応え、再生医療の発展へ計測の断面から貢献する。

Regenerative medicine is undergoing rapid research and development in order to disseminate it as a therapeutic method that artificially creates human tissue and restores function. To generalize the regenerative medicine, it is necessary to cultivate a large amount of stem cells such as iPS cells. pH monitoring of culture solution is an indispensable item for mass culture. The pH sensor for cell culture are “maintenance of sterile environment”, “influence of eluted material on cells” and “stability of measurement” necessary. As an example of a single-use pH electrode for cell culture, we introduce γ-ray sterilized pH electrode connectable to cell culture vessel. As a result, the performance of this electrode, in cell culture for 2 weeks or more, was pH control within 0.1 pH of the culture solution. We will continue to respond to requests for new analyzes from the field of regenerative medicine and contribute with measurement technology to the development of regenerative medicine.

はじめに

再生医療とは、機能不全に陥ったり欠損した生体組織を、人工的に作り、機能を回復する治療法である。近年、生体組織を人工的に作製する方法として、胚性幹細胞(ES細胞)による皮膚や神経、血管などの再生や、人工多能性幹細胞(iPS細胞)を用いた網膜や幹細胞や心筋細胞の再生にも成功している。しかしながら、現状ではこれら再生医療を行うためには莫大な時間と経験、コストが必要であり、一般的な医療としてまだまだ普及していない。さらなる実用化を進めるにはプロセス工学のような工学的な考えや、産業界の製造技術や生産システムなどの「モノづくり」の考えが必要である^[1]。

医療として普及し、安心、安全な治療を行うためには、高品質な生体組織や細胞を安価に大量に培養しなければなら

ない。そのためには適切な培養環境の制御が重要である。たとえば、患者の状況や採取した細胞部位によって異なる特性を有しており、その条件に合わせた培養環境を整えることや、培養途中でのわずかな温度変化やpH変化によって、細胞の増殖および分化に大きく影響を与える可能性もある。原因となる培養環境の状態変化を防止するためには、温度、pH、溶存酸素、ガス流量、攪拌速度などをリアルタイムに計測する必要がある。Figure 1に細胞培養の流れと、Figure 2に未分化大量細胞培養の模式図を示す。

本稿では細胞培養時のpH測定に関して、要望と今後の展開について紹介する。

pHガラス電極の構造と原理

ガラス電極法は、Figure 3に示すようにガラス電極と比較電極の二つの電極間に発生した端子間電圧から、溶液中の

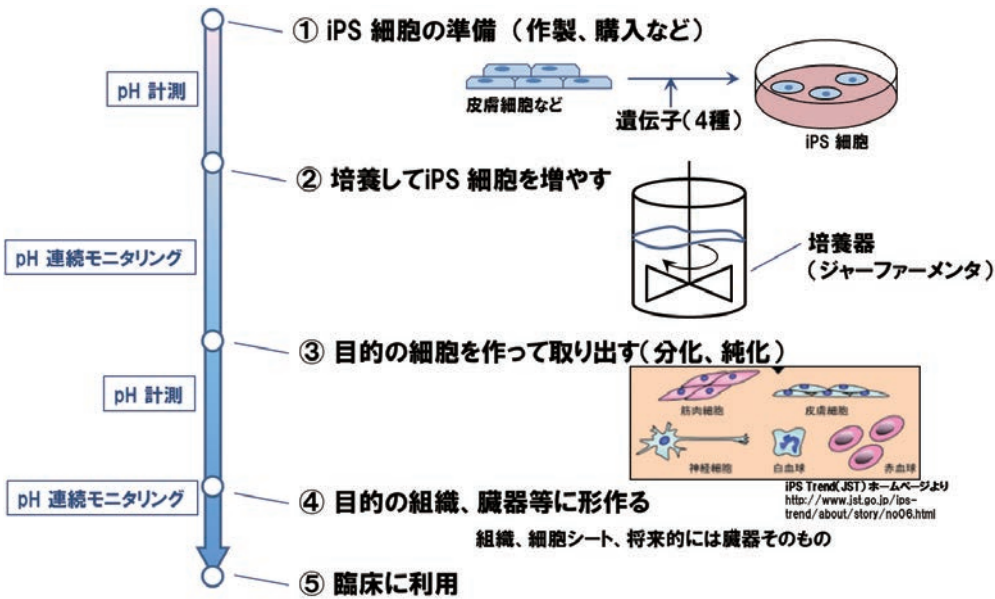


Figure 1 細胞培養の流れ

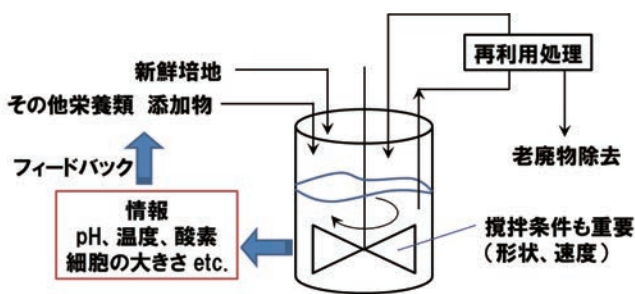


Figure 2 未分化大量細胞培養の模式図

pHを算出する^[2]。本稿では、ガラス電極と比較電極を一体に複合したものをpHガラス電極とする。

ガラス電極はpH応答性のガラス膜、それを支えている高絶縁の支持管、ガラス電極内部液、銀/塩化銀電極で構成される。このガラス膜が最も重要で、溶液のpHに応じた電位がガラス膜表面で発生する。さらに、このガラス膜には、酸やアルカリに侵されない化学的耐久性と衝撃への耐久性が要求される。現在も高機能なガラス膜開発のために、様々な組成のガラス膜が検討されている。

一方の比較電極は、溶液のpHと無関係に一定の電位を示す必要がある。比較電極はFigure 3で示すように、液絡部、補充口、支持管、比較電極内部液、銀/塩化銀電極で構成されている。比較電極内部液には、ほとんどの場合、高濃度の塩化カリウム溶液が使用される。所定量の内部液が液絡部に構成された微細孔から流出することで、内部液と資料液とが電氣的に接続する。銀/塩化銀電極表面では、内部液の塩化物イオン濃度に応じた電位が発生するため、塩化物イオン濃度が変化しない限り、比較電極電位は一定であ

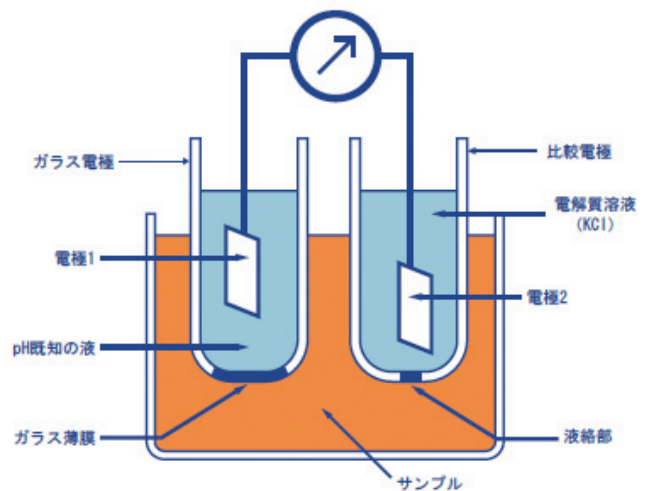


Figure 3 pHガラス電極の模式図

る。しかし、実際には液絡部で液間電位差が生じる。測定中にこの液間電位差が変動すると、比較電極電位も変動し、測定値が不正確になる。液間電位差の変動を低減させるには、液絡部におけるイオンの拡散を一定に制御しなければならない。一般的なpHガラス電極では、比較電極の補充口を開け、かつ内部液に水頭圧がかかる構造になっている。水頭圧によって、所定量の内部液が試料液側へ流出する。その結果、液絡部でのイオン拡散が制御でき、かつ液間電位差の変動が抑えられる。

培養液のpHモニタリングの注意点

pHガラス電極による細胞培養液のpHモニタリングには、一般的なpH計測とは異なる注意点がある。ここでは特に注意すべき項目を紹介する。

無菌環境の維持

細胞や組織の培養において無菌環境の維持は必須であり、すべての工程においてクロスコンタミネーションは許されない。使用する容器や試薬、センサーなども当然滅菌された状態を維持しながら使用される。滅菌の方法としては蒸気滅菌(オートクレーブ)、電子線滅菌、過水ガス滅菌、EOG(エチレンオキサイドガス)滅菌、 γ 線滅菌等がある。それぞれの方法には特徴があり、その部材、状況に合わせて選択される。操作ミスによるコンタミネーションを防ぐため、最近では滅菌済みのシングルユース製品が多く使用される傾向がある。多くのシングルユース製品は γ 線滅菌を採用している。 γ 線は透過性が高く、梱包状態であっても、複雑な形状であっても、製品を滅菌することが可能であり、滅菌の確実性が高い。

γ 線滅菌対応のpHガラス電極を実現するためには、 γ 線によるガラスや樹脂へのダメージを見極め、pH応答に γ 線の影響が無視できる材料選定と、 γ 線によって分解、溶出する物質が細胞培養への影響がない必要がある。

pHガラス電極からの溶出物質による細胞への阻害影響

培養に使用する設備、器具から溶出した物質が、細胞培養の阻害や細胞自体の変性による腫瘍形成などを発生しないか、十分考慮すべきである。現在、再生医療等製品製造におけるシングルユース製品について、科学的知見や水準に基づく安全性のガイドラインを検討中であり、近く明確になると思われる。本稿では日本薬局方^[3]を参考に、pHガラス電極による培養液pHモニタリングの注意点を述べる。

pHガラス電極の構成材料の中で培養液と接するものは、ガラス材料と比較電極の内部液、液絡部である。ガラス材料は、ケイ酸塩や種々の金属酸化物等を含む化合物であり、ガラス中に含まれるアルカリ金属などが極微量にサンプルへ溶解することが考えられる。同じく液絡部の材料も極微量の溶解の可能性がある。これら材料の溶出物は実際の培養条件と日本薬局方を参考に、溶出試験を行うことが望ましい。溶出物の量を把握し、一連の培養工程でどれだけの量の溶出物が残存するか把握できる。同様に比較電極内部液も培養液中への溶出量を把握すべきである。この内部液である塩化カリウム溶液が培養液中へ拡散する濃度を把握することができ、培養細胞への影響を推測できる。また、比較電極内部液にゲル化剤を使用している場合も同様に溶出量の把握が必要だが、 γ 線によりゲル化剤の高分子結合が切断され、別の材料に変質する可能性には特に注意が必要である。比較電極内極に使用している銀/塩化銀にも注意が必要である。通常と比較電極では銀イオンが培養液中に溶出することが考えられる。銀イオントラップ^[4]などの銀イオンを極力培養液へ溶出させない工夫が必要である。

これら溶出物を極力抑えたうえで、日本薬局方等で定められた細胞毒性試験や、実培養液を用いた溶出物質影響の確認を行うことで、培養細胞へのpHガラス電極の阻害影響を把握できる。

培養期間中のpHガラス電極の安定性

再生医療においては、患者疾患部の大きさや状態によって必要とされる細胞数が変わる。その必要量に応じた生産スケジュールが必要であり、長期の場合、多回の継代培養を含む数週間の培養が行われる。この長期培養を想定したpHガラス電極の安定性が必要になる。

pHガラス電極の安定性には、ガラス電極と比較電極の両方の電位が安定し続けなければならない。一般的な培養液は中性付近であり、通常安定であるが、培養液にはタンパクや細胞が含まれており、これらがガラスや液絡部に付着することで電位が不安定となる。タンパクが付着しにくいガラス組成や、浮遊物が堆積しにくい構造が必要である。一方、比較電極電位の安定性には、常に一定量の内部液が培養期間中に培養液へ流出し続ける必要がある。内部液流出量を常に制御するには、一般的には水頭圧を用いる方法であるが、細胞培養に用いる場合、開口部より菌等が入る恐れがあり、使用できない。そこで、密閉系で動作可能なように、バネ等の機械的な加圧機構や、内部液の高粘度化(ゲル化)等の工夫が必要である。

シングルユースpHガラス電極

細胞培養容器に搭載可能なpHガラス電極は各社で開発されている。本章では新規に開発中のシングルユースpHガラス電極(Figure 4)を紹介する。



Figure 4 シングルユースpHガラス電極

シングルユースpHガラス電極の特長

γ 線の影響の少ないpH応答ガラスを選択し、電極の先端にドーム状に形成している。比較電極は、はかまをはいた形状の摺合せ面を持つスリーブ型を用いた。スリーブ型の液絡部は、一般的なpHガラス電極に用いられるセラミックス型(ガラスに多孔質セラミックスを接合させた液絡部)よりも、内部液の流出量が多い。内部液には細胞への阻害影響を考慮し、ゲル化剤を含まない塩化カリウム溶液を用いた。また、コンタミネーションを避けるためと、単回使用のため、比較電極内部液を補充する補充口を無くし、密閉構造とした。pHガラス電極のガラス部の直径は6 mmであり、一般的な電極直径(12 mm程度)に対して約半分であり、浮遊攪拌培養下で培養液の対流によって細胞が受けるシェアストレス低減が期待できる。

シングルユースpHガラス電極の性能

新規シングルユースpHガラス電極のpH測定性能を、日本品質保証機構(JQA)の「第23章 ガラス電極式水素イオン濃度検出器」で定める器差検定^[5]に則って確認したところ、検定公差の規格3 mV以内を満足した。加えて、25 kGyのガンマ線照射後も、検定公差を満足しており、このpHガラス電極を使用することで、無菌環境を維持しながら正確なpH計測が可能である。

次に、37°Cの中性リン酸塩緩衝溶液中で、このpHガラス電極の比較電極電位を連続して計測した結果をFigure 5に示す。液絡部をスリーブ型にしたもの(○)とセラミックス型のもの(□)、2種類の比較電極を用意し評価した。図からわかるようにセラミック型の電位は、測定開始直後から顕著に正方向へ変動した。セラミックス型は液絡部での液の行き来が難しく、不安定であると考えられる。一方でスリーブ型の場合は、約3週間においても比較電極電位は安定しており、測定値の変動は2 mV(pH換算すると約0.03 pH)以内であった。スリーブ型の液絡部は、内部液の流出量を一定量に制御できるように最適化しており、その結果、長期培養期間内に置いても比較電極電位が安定した。

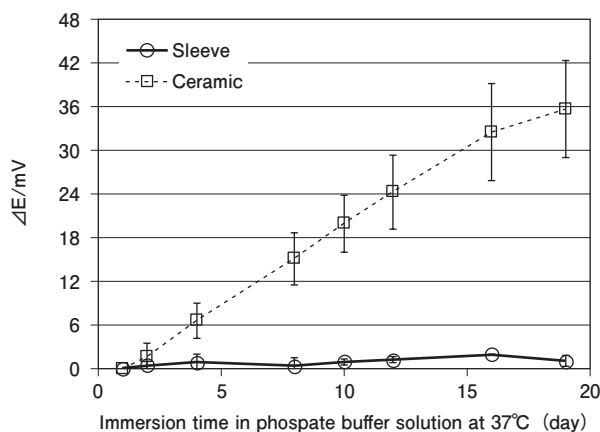


Figure 5 比較電極電位の安定性

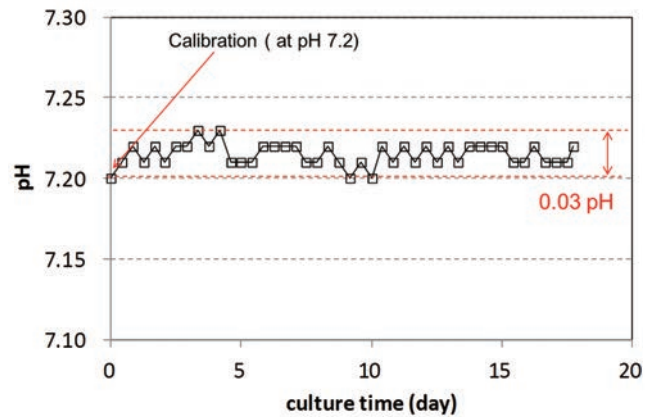


Figure 6 シングルユースpHガラス電極による培養液pHモニタリング

たとえばES細胞の細胞培養において、培養細胞の代謝物によって培養液のpHが0.1 pH程度酸性側へ変動すると、培養細胞の増殖に影響する^[6]。そのため培養液のpHを0.1 pH以内に制御する必要がある。本シングルユースpHガラス電極はこの要望に対応できる安定性を示した。

心筋分化誘導工程における培養液pHモニタリング

iPS細胞由来の心筋細胞培養工程で、培養液pHモニタリングを実施した結果について紹介する。培養液pHモニタリングの結果をFigure 6に示す。培養開始直前に、数日間中性リン酸塩緩衝液(pH 7.2)中で試運転およびゼロ点校正を実施した。横軸は培養液への浸漬時間、縦軸は培養液のpHを示す。図中のプロットは、10時間ごとに培養液を計測した値を示す。

複数回の継代培養期間内で、pHガラス電極の変動は、0.03 pH以内となり、細胞培養で必要とされる0.1 pH以内で培養液pHを制御できた。また、培養工程中に細胞の吸着、蓄積や雑菌混入によるコンタミネーションも発生しなかった。このシングルユースpHガラス電極は細胞培養に適した性能を示した。

おわりに

培養液pHモニタリングにおけるpHガラス電極の注意点と最新のpH電極の一例を紹介した。今回紹介したpHガラス電極はジャーファーマンターなどと呼ばれるフラスコ状の硬質容器に適した電極形状であるが、培養の方式として、培養バックを用いた袋状や、セルスタックと呼ばれるシャーレを積層した形状も細胞培養の用途によって使い分けられる。いずれの培養でもpH計測は基礎となる重要なパラメーターであり、それぞれの培養方式に合わせたpH計測法やpHガラス電極の形状が求められている。

今後、再生医療の研究が進み、一般的な治療の選択肢となると言われている。学术界はもちろんのこと、すでに産業

界の著しい参入が始まっている。治療にかかるコスト低減へ向けた、大量培養による生産性向上と高純度化による歩留り向上が進められるであろう。そのために必要な生産設備、試薬、分析装置の開発も自ずと要求されるであろう。半導体ビジネスと同じようであると筆者は思う。生産プロセスの自動化や、シリコンウエハの大口径化、高いクリーン度や薬液の開発など、全く違う分野でありながら共通項が多い。実際、半導体製造装置メーカーの参入も見受けられる。我々は今まで培った技術と新しい技術を融合しながら、これら新しい分析要求に応え続け、再生医療分野へ計測の断面から貢献する。

Table 1 Readout関連記事(ラボpH製品)





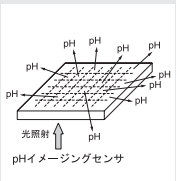


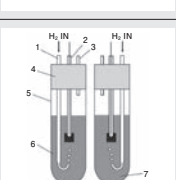

標題	著者	号 頁	発表年	
平面型電極を用いたコンパクトイオンメータとその応用	富田 勝彦 大川 浩美 小島 淳二	1 33	1990	
コードレスpHメータ F-20シリーズ-pHではかる	森 健	8 28	1994	
防水形コンパクトpHメータ「ツイン・ウォータープルーフ (B-211, B-212)」	吉岡 伸樹 中島 嘉之	9 71	1994	
ハンディpHメータ D-20シリーズ	武市 伸二 岡田 厚朗 Jeffery Fisher	15 75	1997	
光走査型化学顕微鏡 SCHEM	高松 修司	22 60	2001	
pH計 50シリーズ	小林 剛士	30 78	2005	
イオン液体塩橋搭載ガラス複合電極を用いた低導電率試料のpH値の決定	芝田 学	40 24	2013	
イオン液体塩橋を用いたpHの正確な決定	芝田 学	40 59	2013	
LAQUAシリーズ第3弾!!ポータブル水質分析計	山内 悠 芝田 学	42 110	2014	

Table 2 Readout関連記事(pHアプリケーション)

標題	著者	号	頁	発表年
いまホットな注目を浴びる酸性雨草の根測定ネットHONEST	大石 正行	8	69	1993
微小領域のpH分布測定のための二次元pH測定技術	中尾 基 野村 聡 中西 剛 高松 修司 富田 勝彦	13	75	1996
微小領域の化学量のイメージング光走査型顕微鏡—イメージングにより広がる分析情報—	野村 聡	18	22	1999
唾液緩衝能測定装置 チェックパフ	野村 聡	29	74	2004
Ca ²⁺ イオン電極を用いた食品試料中のカルシウムイオンの簡易測定(LAQUAtwin)Ca ²⁺ イオンメーターを用いた測定例	山内 悠	40	18	2013
コンパクト水質計(LAQUAtwin)による土壌の簡易分析—土壌中の交換性カルシウムイオンおよびカリウムイオンの測定—	桑本 恵子	41	50	2013

Table 3 Readout関連記事(pH受賞報告)

標題	著者	号	頁	発表年
堀場雅夫最高顧問が“ピッツコン・ヘリテージ賞”を受賞、殿堂入り	報告	32	72	2006
イオンセンサの開発で文部科学大臣表彰科学技術賞を受賞!	報告	35	90	2009
pH計測の研究が認められ、日本分析化学会先端分析技術賞日本分析機器工業会(JAIMA)機器開発賞を受賞!	野村 聡	35	92	2009

Table 4 Readout関連記事(pH基礎)

標題	著者	号	頁	発表年
マイクロ電極を用いる高速掃引ボルタメトリーの分析	岡崎 敏 野村 聡	8	10	1994
堀場の電気化学分析装置	大川 浩美	8	20	1994
化学量(pH)をイメージングすると何がわかるか?—得られたこと、得られるであろうこと—	岩崎 博 野村 聡 青海 隆	22	51	2001
pH計測の新たな挑戦 ガラス電極の次に来るものは何か?	野村 聡	26	12	2003
50年前のpHメータ復元秘話	(コラム)	27	76	2003
堀場製作所の基礎技術 1 pH計、イオン計の検出部としてのガラス電極、各種イオン電極	青海 隆	40	90	2013
電気化学測定を応用した計測機器	石井 章夫 山内 悠	40	102	2013
pH計と導電率計の点検と校正	中村 ちひろ	41	55	2013
堀場製作所の基礎技術 2 pH電極	大川 浩美 西尾 友志	41	60	2013

Table 5 Readout関連記事(特別寄稿)

標題	著者*1	号	頁	発表年
pHの概念を確立したソーレンセン教授	清水 栄 京都大学名誉教授 理学博士 日本アイソトープ協会 副会長 京都市教育委員	3	60	1991
むし歯研究におけるイメージング分析の活用方法	北迫 勇一 田上 順次 平石 典子 奥田 真実子 二階堂 徹 東京医科歯科大学大学院	24	37	2002
新しい定義に基づくpH測定—国際的に認証されるpH値とするために—	中村 進 独立行政法人 産業技術総合研究所 計測標準研究部門無機分析科無機標準研究室	30	32	2005
電気化学テクノロジーの展開	逢坂 哲彌 早稲田大学理工学部応用化学科 教授	30	36	2005

*1 特別寄稿著者については、執筆当時のご所属を記載しています。

参考文献

- [1] 特集「再生医療におけるコトづくりと細胞製造性に基づくプロセス構築」, 紀ノ岡正博, 化学工学 第81巻第3号, pp28-31(2017)
- [2] 青海隆, 野村聡ほか, 「やさしいpH 水質の話」, 株式会社堀場製作所, p21(2013)
- [3] 第十六改正日本薬局方
- [4] 堀場製作所, 比較電極, 特開2014-115124
- [5] JIS Z 8802-2011: pH測定方法
- [6] Katsuhisa Matsuura, Masanori Wada, Kanako Konishi, et al, "Fabrication of Mouse Embryonic Stem Cell-Derived Culture System", *PLoS ONE*, e52176, pp1-11(2012)
- [7] Katsuhisa Matsuura, Masanori Wada, Tatsuya Shimizu, et al, "Creation of human cardiac cell sheets using pluripotent stem cells", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 425, pp321-327(2012)
- [8] 山内悠, 松浦勝久, 「pHガラス電極を用いた培養液pHモニタリング」, 医機学, Vol. 85, No.4, pp412-418(2015)



宮村 和宏

Kazuhiro MIYAMURA

株式会社 堀場アドバンスドテクノ
開発本部 要素開発部
Core Technology Development Department
HORIBA Advanced Techno, Co., Ltd.



市成 祐一

Yuichi ICHINARI

株式会社 堀場アドバンスドテクノ
開発本部 要素開発部
Core Technology Development Department
HORIBA Advanced Techno, Co., Ltd.