

実は奥が深いpH測定とその制御

尾島 由紘*・田谷 正仁

1909年にデンマークのSørensenがpHなる概念を初めて提唱し、これを測定し得ることを示した。現在では、ガラス複合電極を用いた簡便なpH測定が可能となっているが、その測定方法にはいくつかの仮定が含まれることや、厳密な定義が複雑であることを、みなさんはご存じだろうか？

一方で、細胞培養や酵素反応を伴う生物プロセスにおいて、pHは基本的ながら依然として非常に重要なパラメータである。筆者らも微生物を用いた発酵生産において、フラスコからジャーファーメンターへのスケールアップを行う際に、ファーメンター中のpHを一定値に保つのではなく、フラスコ培養中のpH挙動を厳密に再現することが重要であるという経験からpH制御の難しさを実感した。

今回の解説では、前半でpHの定義や測定原理を、後半では細胞培養における典型的なpHの計測・制御方法やpHにまつわる最新のトピックスに関して概説する。

pHの定義

pHの誕生 当初、SørensenによってpHは下記のように定義された¹⁾。

$$\text{pH} = -\log_{10}([\text{H}^+]/(\text{mol}/\text{dm}^3)) \quad (1)$$

ここで、 $[\text{H}^+]$ は水素イオンのモル濃度である。式(1)に従えば、たとえば0.1 mol/dm³のHCl水溶液のpHは1ということになる。これは、おおよそ正しいが厳密にいうと違う。0.1 mol/dm³のHCl水溶液の25°CにおけるpHを正しく調整したpH計で測定すると1.088くらいになるはずである。つまり、式(1)は、ほぼ成立するが、pHの定義そのものではないのである。その後の研究により、pHは理想溶液からの補正を考慮した、水素イオン活量(a_{H^+})に関係することが判明し、1920年代に次式の定義に変更された。

$$\text{pH} = -\log_{10}(a_{\text{H}^+}) \quad (2)$$

ここで $a_{\text{H}^+} = \gamma \times [\text{H}^+]$ 、 γ は活量係数である。以降、現在に至るまで、この定義に基づきpH値は議論されているが、国際純正・応用化学連合(英: International

Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC)は、現在、各国の規格で用いられているpHの定義は、すべて操作的定義であるとしている。なぜなら水素イオン活量 a_{H^+} は、物理的および科学的方法では直接測定できないものであったからである。水素イオン活量のみを測定するためには、試料溶液の電気的中性を保ちながら陽イオンである水素イオンの濃度のみを変化させる必要があるが、それは現実的には不可能だからである。

しかしながら、水素イオン活量が水溶液の性質に大きく作用していることは明らかであり、溶液の酸性度合いを一定の尺度によって精密に評価したい。こういう実際のニーズに答えるために、測定可能な実用pHが検討された。 a_{H^+} を正しく決める一般的方法がないことから、妥協したものが実用pH(操作的定義)である。この実用pHを決定するための操作的定義に関しては、実は各国でまちまちであり、pHはそれぞれ異なっている。

Harnedセル pHの操作的定義を統一するための一次測定法として、Harnedセル法がIUPACなどで指定されている。Harnedセルは、白金黒電極と参照電極(銀/塩化銀電極など)を液絡のない容器中の溶液に組み込んだものである。図1に示す、産業技術総合研究所の計測標準研究部門で開発が進められているHarnedセルでは、白金黒電極側には1本の筒の中に4枚のガラスフィルターを用いて、測定液中の水素ガスが飽和状態になるように供給されている^{2,3)}。Harnedセルは恒温槽内で一定温度に保たれ、二つの電極間の起電力は高精度で測定され、pH値が決定される。Harnedセルのデザイン自体は各国ごとに異なっているが、よく一致したpH値が報告されている。

pHの測定方法

ガラス電極 水素イオン濃度の異なる溶液の間に薄いガラス膜を置くと、ガラス薄膜の両側の溶液に電位差が発生する。この現象は、1906年にCremerによって報告され、1920年代以降に、pH測定に応用されるようになった。

この電位差の発生機構については次のように考えられている。ガラスは、ケイ素原子と酸素原子(酸化イオ

*著者紹介 大阪市立大学大学院工学研究科化学生物系専攻(講師) E-mail: ojima@bioa.eng.osaka-cu.ac.jp

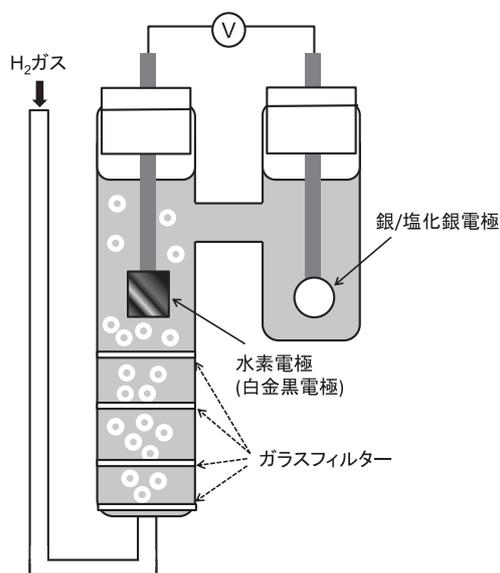


図1. 産業技術総合研究所による試作Harnedセル

ン) でできた不規則な3次元構造の隙間にナトリウムイオンなどの陽イオンを含んだ構造である。ガラス膜を水や希釈な酸水溶液につけておくと、表面の加水分解により陽イオンが溶け出し、それに見合った電荷の水素イオンがガラス構造内に入ってくる。この結果、図2の左端に示すように厚さ数十 μm 程度のケイ酸の水和層が形成する⁴⁾。この状態で、ガラス膜がある溶液と接すると、溶液中の水素イオン濃度と平衡し電位を発生する。このときに、中性やアルカリ性であれば電位差は大きくなり、酸性であれば小さくなる。電位差は、ガラス膜の内側(ガラス電極内部液)に発生する電位をガラス電極で測り、

外側(被検液)に発生する電位を比較電極で測定し、算出する。そして、このときの電位差をあらかじめpH標準液で測定したときの電位差と比較すれば、被検液のpHを知ることができるということになる。

複合電極(ガラス電極+比較電極) 現在、一般的に使用されるpH電極は、複合電極と呼ばれるものである。外見上は1本のガラス電極のようにまとめ上げられているが、実はガラス電極と比較電極との組合せとなっている。図2に示すように、複合電極は、支持管が二重になっていて、中心部がガラス管、外周部が比較電極である。外周部の側面につけたセラミックプラグが液絡部になっている。複合電極は、洗浄・取扱いが容易で、試料溶液の体積も1/5くらいですむ。もう一つ大きな長所は、応答速度が速いことである。ある溶液が入っていたガラス電極を引き上げて洗浄した後に、他の溶液を入れたとき、pH計の指示が安定するまでには相当な時間がかかる。これはガラス電極自身の応答が遅いからではなく、pH計の指示部がきわめて入力抵抗の大きい電圧計であるということに起因する。ガラス電極を溶液から引き上げておくと、ガラス電極上に静電気がたまっていく。ガラス電極単独では、この正電荷の逃げ道としては、ガラス電極の支持管、ケーブルおよび指示部のガラス電極用端子しかないが、これらはきわめて高い抵抗をもつように作られているので、いったん帯電すると容易に電荷が抜けない。これに対して、複合電極の場合にはガラス膜と液絡部とが接近しているの、溶液から引き上げた状態でガラス膜が帯電しても支持管表面を伝って電荷が比較電極(これはアースにつながっている)に逃げるこ

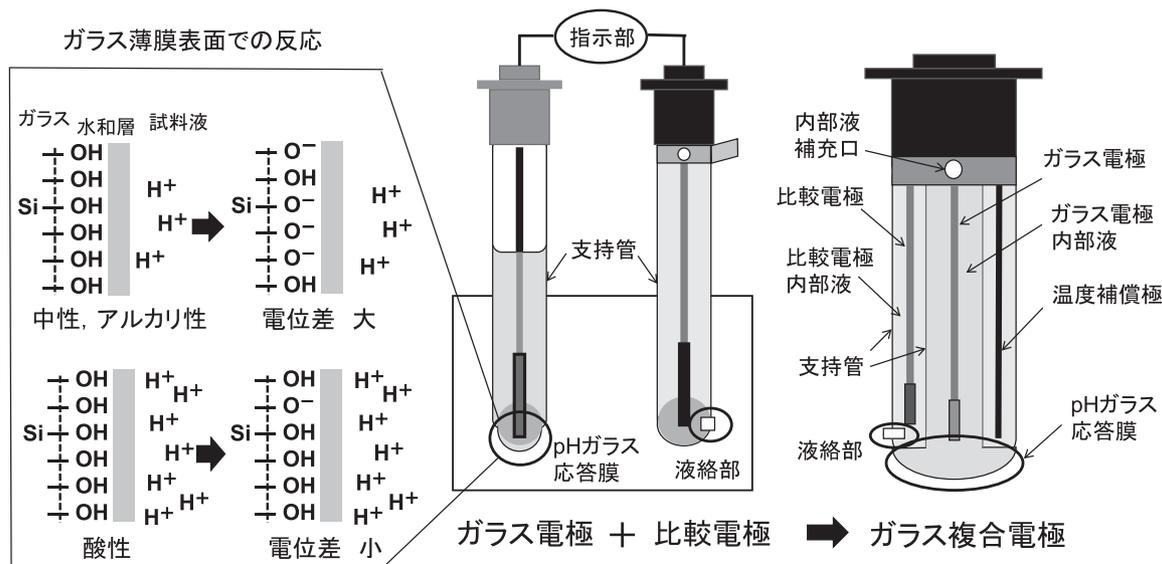


図2. ガラス複合電極の概略図

とができる。そのため、複合電極は、次の溶液に入れてから指示が安定するまでに要する時間がずっと短くて済むのである⁴⁾。

このようなわけで複合電極が現在は主流となっている。ただし、特に精密な測定をする場合やそのほか特殊な目的の場合には、ガラス電極と比較電極とが別となっている形式が良い場合も少なくない。

フラスコレベルでの計測を伴わないpH保持

実際に実験室でpHを測定する場合、上記のような複合電極を用いるケースが多いであろう。では次に、どのようにして実際に細胞培養中のpHをコントロールするかについて紹介したい。まずは、フラスコなどの比較的小スケールでの培養において、pH計測を行わない場合のpH保持のノウハウについて説明する。

微生物培養 微生物の多くは、糖を基質として消費し酢酸や乳酸などの有機酸を生産するため、培養の経過とともに培地中に酸が蓄積してpHが大きくなり下がり、強い増殖阻害が引き起こされる場合がある。そのため、フラスコ培養などを行う際には、酸の中和剤として培地中にあらかじめ炭酸カルシウムを加えておくことによって、培地の酸性化を抑え、培養時間を長く維持することができる。図3に示すように、培養液中で炭酸イオンは水素イオンと反応しCO₂を排出することでpHの低下を抑制する。炭酸カルシウム由来の添加量は培地に含まれる糖の半分量が目安となる。他の培地組成を溶解してpHを調整した後に、炭酸カルシウム（必要な場合は寒天も）を加えてオートクレーブ滅菌して作製する、ないしは乾熱滅菌を行った炭酸カルシウムをオートクレーブ後の培地に添加することも可能である。固形培地の場合は固まるまでに炭酸カルシウムが底に沈んでしまうため、平板培地の場合はなるべく冷ましてから、加えるほうがよい。高層培地の場合は、オートクレーブ後にミキサーなどでよく攪拌してから氷水などで急冷すると、炭酸カルシウムが分散した状態で固まらせることができる。また、液体培地で培養する場合は、微生物の増殖を濁度などで測定する機会が多いが、炭酸カルシウムは不溶性のため、測定に影響を与える。そこで、サンプリングを行った培養液を薄い塩酸水溶液で希釈することで、菌体を残したまま炭酸カルシウムのみを溶かすことができる⁵⁾。

動物細胞培養 動物細胞培養で使用されるインキュベーターは、一般的にCO₂インキュベーターと呼ばれるものであり、95%空気および5% CO₂の雰囲気下で使用される⁶⁾。培養中の動物細胞も、微生物細胞と同様に

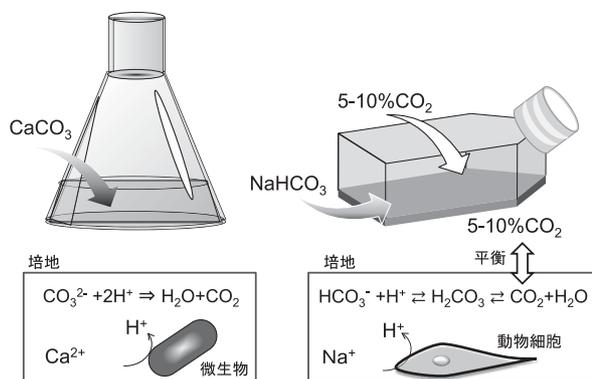


図3. フラスコレベルでの計測を伴わないpH保持

有機酸などを生産し、培養液のpHが低下する傾向があるため、図3に示すような重炭酸バッファー系が利用されている。生じた水素イオンは、培地中の重炭酸イオンHCO₃⁻と反応することで炭酸H₂CO₃を生じる。炭酸からのCO₂生成は気相中のCO₂濃度との平衡関係に従うため、5% CO₂雰囲気下ではpH 7.4前後に保たれるようになっている。したがって、CO₂濃度が低い通常の空気雰囲気下などで保持すると、pHは7.4前後よりも高い値で平衡に達するため、CO₂インキュベーター外での作業は早く終える必要がある。重炭酸/CO₂を用いた方法は、血液の緩衝系を模したものであり、細胞に適したバッファー系といえる。一方、HEPESなどの両性イオンを用いる系では、気体環境の制御は必要なくpH 7.2~7.4での緩衝能に優れているが、比較的高価で、高濃度では一部の培養細胞に対して毒性を示すことがある。市販の動物細胞培養用培地の大部分は、フェノールレッドが添加されており、色によってpHを目視で確認できるようになっている。

バイオリアクターでの測定を伴うpH制御

バイオリアクターなどを用いて、より大きなスケールでの細胞培養を行う場合は、前述の複合電極などにより培養中のpHをリアルタイムで計測しながら、状況に応じたpH制御を行うことが一般的である。

微生物培養 一般的に、ペプトンや酵母エキスなどで構成される天然培地ではアミノ酸が炭素源と窒素源を兼ねるが、窒素より炭素の必要量が多く、余剰窒素がアンモニウムイオンとして放出されるため、pHは次第に上昇する⁵⁾。このような場合は、希硫酸を用いてpHを調整する。一方で、グルコースが主な炭素源となる合成培地では、酢酸などの有機酸の生産によりpHは低下するため、水酸化ナトリウムで調整する。塩化アンモニウ

ムなどの無機窒素を窒素源とする場合は、アンモニウムイオンの消費によってpHは低下するため、窒素源の補充を兼ねてアンモニア水でpHを調整する。

動物細胞培養 動物細胞培養のバイオリアクターにおけるpH制御は、CO₂とアルカリ溶液を両方用いる方法が取られる場合が多い。細胞を播種した直後の培養初期は、リアクター中に空気が混入するため培養液中のCO₂が抜けpHが上がるので、CO₂を供給しpHを下げる。CO₂の供給に関しては、ラボスケールでは上面通気が多く、スケールが大きくなると液深の影響で、培養液全体に供給できないため、培養液中に直接CO₂を供給する。一方で、細胞の増殖に伴い乳酸などの有機酸生産によりpHが低下するため、アルカリ液（NaOH, NaHCO₃水溶液など）を供給し、pHを上げることになる。

最新のpH計測技術

近年の医療分野の進歩により、さまざまな人体内や組織内のpH計測技術が発案および実用化されてきている。その中でも特に興味深いトピックについて、以下に紹介したい。

人体内のpHモニタリング 人体内のpHモニタリングが必要となる場合として、胃食道逆流症などの診断があげられる。従来利用されてきた食道内pHモニタリングシステムは、pHセンサー付きカテーテルを経鼻的に食道と胃の接合部まで挿入し、経時的にpHを計測するもので、患者負担が非常に大きかった。これに対し、イスラエルのGiven Imaging社によって、カプセル型のセンサーを用いたワイヤレスpHモニタリングシステム「Bravo」が開発された⁷⁾。Bravoは、アンチモン電極と呼ばれる小型化に適したpH電極が内包された、カプセル型pHモニターである。カテーテルの先端に装着して経口的に挿入し、食道と胃の接合部にまで進めた後、pHモニター部のみを食道粘膜に固定する仕組みとなっている。具体的には、カテーテルを通して空気を吸引することで、小型カプセルのpHモニター本体に開いた小さな穴に粘膜組織を引き込み、そのまま針で固定する。pHモニターは48時間pHを計測し、患者が身につける記録装置へとデータを送信する。計測後、カプセルは自然に食道を離れ、排泄される優れたものだ。

生体組織内pHのモニタリング 再生医療技術の進歩に伴い、生体外で調製した細胞や細胞組織を体内に移植する試みが進められている。移植後の細胞状態を確認する方法としては、細胞標識法とレポーター遺伝子を用

いる方法があるが、細胞標識法は細胞死の有無に関わらず信号が出続ける可能性があり、レポーター遺伝子の使用は外来遺伝物質を導入するという臨床的デメリットがある。Johns Hopkins大学の研究グループは、磁気共鳴イメージング（MRI）を用いて生体内で非侵襲的にpHを計測することで、細胞死をモニタリングできるナノセンサーを報告している⁸⁾。これは、pHに応答する造影剤をリポソームマイクロカプセルに封入して、細胞死に伴う局所的なpH変化をMRIで検出する仕組みである。光学的イメージング法などを使用した場合には、信号が生体組織を透過しにくいなどの問題があるが、MRIではそういった問題が生じない。さらに、この方法で得られた情報は、解像度の高い解剖学的画像と重ね合わせ利用することができるので、臨床評価が容易になる。このセンサーを用いれば、生体への細胞移植後の細胞死の過程、特にもっとも重要な細胞死のタイミングについてpHモニタリングをベースに明らかにできると期待されている。

おわりに

pHは、依然として生物反応におけるもっとも重要なパラメータの一つである。ヒトの血液のpHが 7.40 ± 0.05 という精度でコントロールされており、上下0.4以上の変化で心停止してしまうことを考慮すれば、人体の恒常的な機能を保つために、いかにpH制御が重要であるかわかるだろう。今後、再生医療分野の進展に伴い、移植や治療に伴う生体内の局所的なpH変化のモニタリングや制御の必要性はますます高まっていくだろう。一方で、pH測定は、随分前に構築された技術であるにも関わらず、その操作的定義の違いにより、各国での実用pH定義が異なるなどの根本的な問題を依然として抱えている。古くても新しく奥が深いのが“pH”である。

文 献

- 1) 藤田秋治：pH測定の理論と実際、南江堂 (1953).
- 2) 大畑昌輝：産総研計量標準報告, **3**, 657 (2005).
- 3) 中村 進：THE CHEMICAL TIMES, **1** (2004).
- 4) 佐藤 弦ら：pHを測る, 丸善 (1987).
- 5) 片倉啓雄ら：有用微生物培養のイロハ～試験管から工業スケールまで～, NTS (2014).
- 6) 村上浩紀, 本橋亮一：動物細胞培養技術, 廣川書店 (1992).
- 7) Given Imaging社：http://www.givenimaging.com/en-us/innovative-solutions/Reflux-Monitoring/Bravo-pH/Pages/default.aspx (2016/04/04)
- 8) Chan, K. W. *et al.*: *Nat. Mater.*, **12**, 268 (2013).