

in vitro 細胞曝露装置における試料ガス加湿方法の検討

Investigation of Test Gas Humidification Methods for an *in vitro* Cell Exposure System

田中 睦美 *1
Mutsumi TANAKA

佐々木 左宇介 *2
Sousuke SASAKI

1. はじめに

近年、自動車排気ガスを含む大気汚染物質の健康影響評価において、培養細胞を用いた *in vitro* 評価系への関心が高まってきている。自動車排気ガスは主に呼吸によって体内に取り込まれるため、その最初の標的器官は鼻腔、気管、肺などの呼吸器である。また、呼吸器は外気と接触している器官であるため、気液界面培養された呼吸器系細胞を使用した曝露評価の報告が近年増加している。一方、気液界面培養を活用した *in vitro* 細胞曝露装置に関しても、技術開発・改良が欧米を中心に進んでいる。

CULTEX® 装置はドイツの Fraunhofer Institute の Dr. Aufderheide らにより開発された *in vitro* 細胞曝露装置である¹⁾。培養細胞へのガス状物質の曝露に適したシステムであり、ディーゼル排気、タバコ煙など、浮遊粒子およびガス成分の培養細胞への曝露方法として数多くの研究で使用されている。この装置はドイツの CULTEX Laboratories 社から市販されており、また、同じタイプの装置がドイツの VITROCELL SYSTEMS 社からも市販されている。よって、入手・導入が容易であることが利点である。

これまで CULTEX® 装置は加湿不要の細胞曝露法として報告されている²⁾。しかし、実際にこの装置を使用して培養細胞に乾燥空気を送気した場合、その有害性に関係なく細胞傷害が生じる³⁾。実際の生体において、吸気は気道で速やかに加湿される⁴⁾。また、気液界面培養での細胞曝露に関するいくつかの研究では加湿装置を用いて湿度条件が調整されており、さらに VITROCELL SYSTEMS 社からは専用の加湿ユニットが販売されている。そこで、

CULTEX® 装置への加湿装置の導入を目的に、試料ガスの加湿方法の調査を実施し、そのうち2種の加湿方法について、基礎データの収集・検討を行った。

2. 細胞曝露試験における試料ガスの加湿方法の調査

加湿装置の必要条件として、細胞曝露における試料ガス温度、すなわち 37°C (細胞の至適温度) の条件における加湿を前提として、①現実的な加湿方法であること、②調整した湿度を長時間安定して維持できること (特に高湿度領域)、③細胞曝露システムを構築する配管内に結露が発生しないこと、④加湿による試料ガスの希釈を最小限にすること、などが挙げられる。

相対湿度と水分濃度の関係を図 1 に示す。37°C の飽和水蒸気濃度は 43.9 g/m³ となり、例えば相対湿度 85%RH の水分濃度は 37.3 g/m³ であるため、この条件の水分濃度を調整するには、水分濃度が 37.3 g/m³ になるように、試料ガス中に存在する水分量を差し引いた量の水分を供給すればよいことになる。

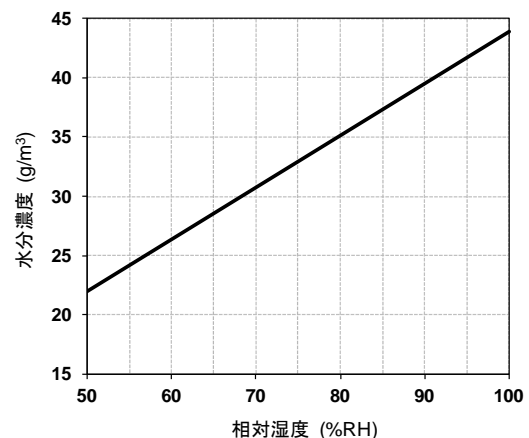


図 1 37°C における相対湿度と水分濃度の関係

*1 一般財団法人日本自動車研究所 エネルギー・環境研究部 博士(保健学)

*2 一般財団法人日本自動車研究所 エネルギー・環境研究部

実験室レベルで構築できる加湿システムとして、バブリング法、Nafion[®]膜により水分を気体に供給する方法(Nafion[®]法)、ネブライザーにより水のみを発生させて供給する方法(ネブライザー法)などが考えられる。以下、それぞれの方法について説明する。

2.1 バブリング法

バブリング法とは、図2のような容器を用いて純水に気体を通気し、飽和水蒸気を発生させる方法である。このとき、気液接触面積をできるだけ大きくするために、できるだけ多くの細かい気泡ができるような工夫が必要となる。また飽和水蒸気量は温度に依存するため、純水の温度を精度よく制御する必要がある。

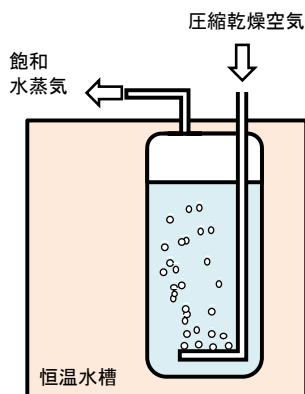


図2 バブリング法

また、純水温度を低下させないようにするため、供給するガスを予め加熱するような機構が必要である。発生した加湿ガスは相対湿度100%RHであるために、発生時の温度よりも低い管壁に接すると必ず結露してしまう。このため、よほど精度のよい温度調節装置でないと100%RHの加湿ガスは曝露条件としては使用することができず、それより低い湿度に設定する必要がある。また、発生した飽和水蒸気は乾燥空気と混合することにより任意の湿度へ調整されるが、混合ポイントまでの配管は、ヒータの温度制御精度も考慮し、発生時の純水温度よりも高温に設定する必要がある。さらに混合後は結露を防ぐために、配管の温度を加湿ガスの露点温度以上に設定する必要がある。

2.2 Nafion[®]法

Nafion[®]はDuPont社が開発した素材で、Perfluoro-3,6-Dioxo-4-Methyl-7-Octene-Sulfonic AcidとTeflonとの重合体であり、図3のようなスルホン酸基をもつ構造をしている。

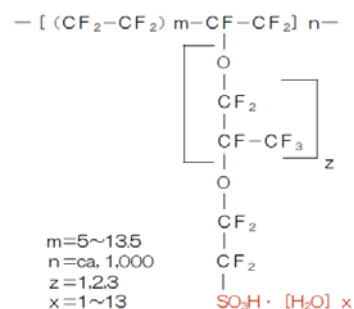


図3 Nafion[®]の化学構造(水和物)⁵⁾

Nafion[®]の性質/物理特性は以下のとおりである⁵⁾

- ・ 非多孔質である
- ・ 化学的に不活性である
- ・ スルホン酸基の強酸性特性のため、酸触媒として作用する。また強酸性により細菌や菌が死滅しやすい。
- ・ 蒸気や液相から容易に水を吸収する。各スルホン酸基は13の水分子まで吸収し、イオン経路を通して水を容易に搬送する。水蒸気に対して半浸透膜のように作用する。
- ・ 水を吸収すると22%、アルコールに曝されると88%まで膨潤する。
- ・ 物理特性は他のフルオロポリマーに類似している。適度なフレキシビリティを持つ透明なプラスチックである。
- ・ 融点は200°C以上、膜としての最大使用温度は190°C (DuPont社の規定)。
- ・ 溶液に曝されたときイオン交換樹脂として作用する。

これらの性質をもつNafion[®]は管状にして、管(シェル)内に複数本入れて、図4のような構造にして、Nafion[®]管に試料ガスを通し、外側のシェルに乾燥ガスを通気すれば乾燥管として、また、外側のシェルに水を流せば、加湿器として使用することができる。使用時には気化熱が奪われるため、供給する水あるいはシェルを加熱する必要がある。

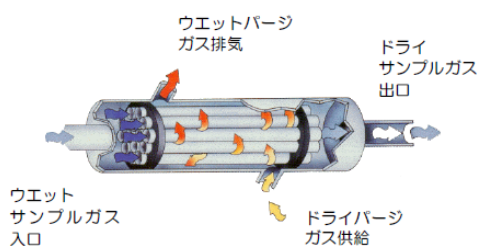
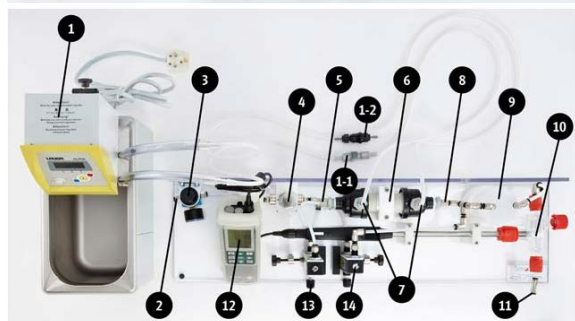


図4 Nafion®を利用したガス乾燥管⁵⁾

現在、流量や必要湿度により様々なサイズのNafion®膜を利用したガス乾燥管が販売されている。また、加湿器として利用する場合、未使用時に(通気していない状態)、シエル内の水はNafion®管の内側に浸透してくるため、使用時に内側にたまった水を排水できるようなシステム構成が必要である。

VITROCELL SYSTEMS製の加湿ユニット⁶⁾は、Permeation tubeと記載されているが、おそらく同様な膜を利用したものと考えられる(図5)。実際の使用に当たっては、ユニット全体を恒温槽にいれるか、部分的な加熱を行うなどのユニットの温度管理が必要と考えられる。



- | | |
|----------------------------|-----------------------|
| 1. 温水器+ポンプ | 2. エア接続口 |
| 3. 圧力調整弁 | 4. 安全バルブ |
| 5. Permeation Unit 入口 | 6. Permeation Unit |
| 7. Permeation Unit 水出入口 | 8. Permeation Unit 出口 |
| 9. 液体分離器 | 10. 加熱プローブ |
| 11. 加湿空気 出口 | 12. 温湿度計 |
| 13. Permeation Unit 用流量調節器 | 14. バイパス用流量調節器 |

図5 VITROCELL SYSTEMS 社の加湿ユニット⁶⁾

2.3 ネブライザー法

ネブライザーとは液体を微小な液滴にして発生するもので、その発生方法としてジェット式と超音波式がある。ジェット式は霧吹きと同じ原理であり、圧縮空気を供給しながら純水を吸引し、ノズル先端で液滴にするものである。図6はICP-MS(誘導結合プラズマ質量分析計)用に設計された試料溶液供給用のネブライザーの一例である。一方、超音波式は超音波振動作用により水を霧化させるものである。液滴の発生方法にかかわらず、ネブライザーを加湿用として用いるためには液滴を気化させるための加熱システムが必要となる。ここで生成した水蒸気と任意の乾燥空気を混合して湿度を調整することになる。また、配管などのシステムの温度制御が重要であることは他の方法と同様である。市販されているネブライザーはその用途に合わせて通気流量などに制限があるため、細胞曝露装置に導入するためには専用のネブライザーを設計製作する必要がある。



図6 ICP-MS用に設計された試料溶液供給用のネブライザー⁷⁾

以上、可能性のある3種類の加湿方法について説明した。これらのうち、より現実的な加湿方法として、バブリング法とNafion®法について次章で検討した。

3. 試料ガスの加湿方法の検討

2種類の加湿方法(バブリング法とNafion®法)について、温度と試料ガス流量および水分発生量の関係を検討した。試料ガスにはResearch Air(高千穂商事)を使用した。加湿装置の構築にあたり、調湿した空気の湿度を測定するために、測定装置としてTESTO社製の温湿度変換機TESTO 6681、センサーにTESTO 6614(高湿度環境用)を用いた。計測範囲は0~100%RH、計測

の不確かさは $\pm(1\%RH+0.007\times\text{計測値}(0\sim 100\%RH))$ である。このセンサーは加熱型のプローブを有し、センサー温度を雰囲気温度よりも 5°C 高温に保つことにより、センサー表面での結露を防止できるようになっている。

3.1 Nafion[®]法による加湿システム

Nafion[®]管 (PD625-12pp, Perma Pure 社) を用いて加湿特性を確認した。加湿システムとして、図 7 のような装置を作成し、乾燥空気 (ボンベガス) の流量制御を行い、Nafion[®]管に通気し、発生した加湿空気を恒温水槽内に設置した容器に導き、温湿度計にて湿度を計測した。Nafion[®]管シェルへの水の供給は HPLC ポンプを使用した。Nafion[®]管は垂直に設置し、使用前に内壁に浸透した水分を簡単に除去できるようにドレインバルブを設けた。Nafion[®]管の加熱はリボンヒータにより任意の温度に加熱した。Nafion[®]管から湿度計測までのラインは、ライン内での結露防止のために Nafion[®]管の加熱温度よりも高く設定した。

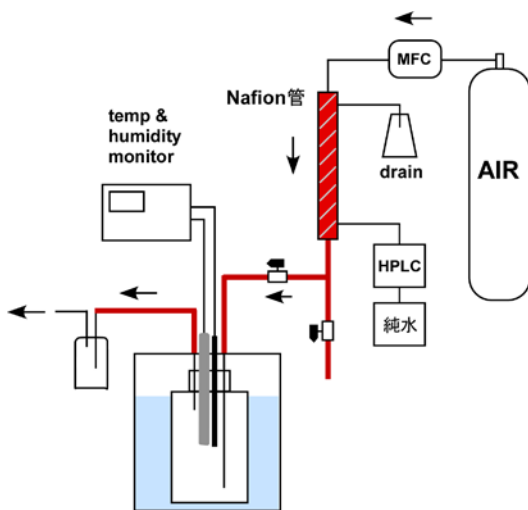


図 7 Nafion[®]法による加湿法検討システム

Nafion[®]管の温度を 50°C 、もしくは 60°C に加熱して使用した場合の単位時間あたりの水分発生量と通気流量の関係を図 8 に示した。

水分発生量は Nafion[®]管の温度や通気流量に依存していることがわかる。通気流量を 2 倍にしても発生水分量は 2 倍にはならないことから、使用流量や温度に適したものを選択する必要があることが推測できる。

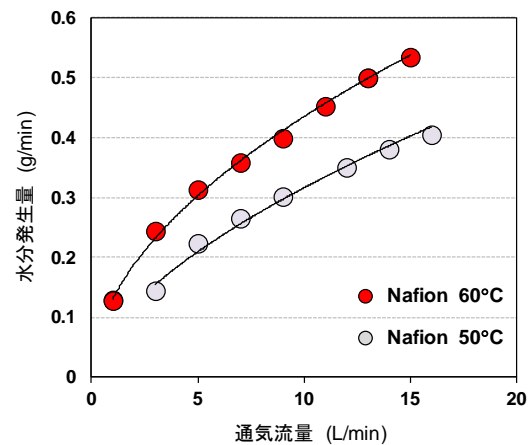


図 8 Nafion[®]管通気量と水分発生量の関係

3.2 バブリング法による加湿システム

バブリング法による加湿システムとして、図 9 のような装置を作成した。

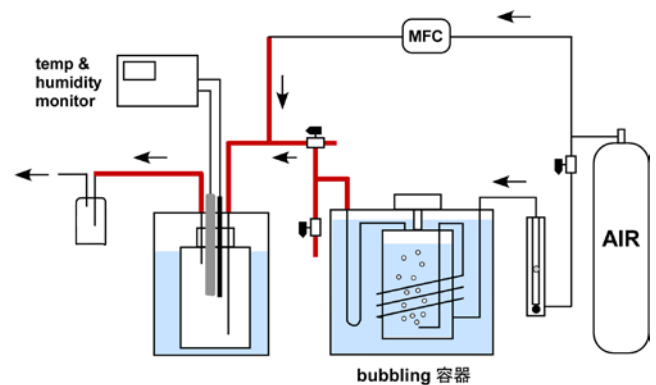


図 9 バブリング法による加湿法検討システム

ステンレス製のバブリング容器は恒温水槽内に設置し、温度を一定に保つようにした。供給ガスを予備加熱するために、供給ラインを恒温水槽内でコイル状にしてからバブリング容器へ接続した。発生した飽和水蒸気を任意の割合で乾燥空気と混合し、別の恒温水槽に設置した混合瓶に導き、温湿度を計測した。混合瓶の恒温水槽は発生した加湿空気が結露しない温度に設定した。また、バブリング容器から湿度計測までのラインは、ライン内での結露防止のため、バブリング容器の恒温水槽の設定温度よりも高く設定した。

バブリング容器の恒温水槽の温度を 40 、 50 、 60°C に設定した場合の通気流量と単位時間あたりの発生水分量の関係を図 10 に示した。この装

置の最大許容通気量は 4 L/min であるが、この通気量の範囲では、通気量と発生水分量の関係に直線性が得られた。また、このシステムにより調湿した空気(37°C, 85%RH および 50%RH)の 6 時間の測定結果を表 1 に示した。いずれの場合でも変動は±2%の範囲であり、安定した加湿空気が発生できていることがわかる。加湿状態から急激に乾燥空気のみを流したときの湿度変化により、配管内に結露がないことを確認した。

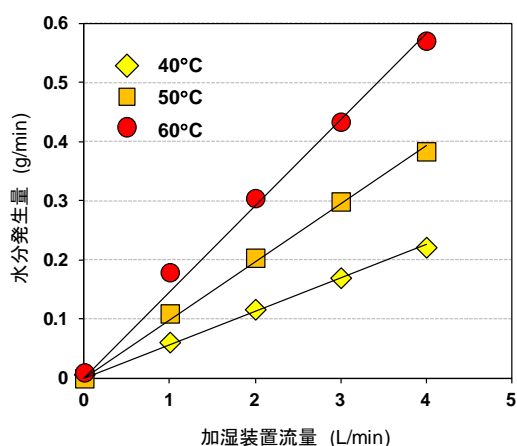


図 10 バブリング法による加湿装置の恒温水槽温度と通気量および水分発生量の関係

表 1 バブリング法により調整した加湿空気の湿度安定性(6 時間)

目標湿度	(%RH)	50	85
実測値	(%RH)	50.8±1.9	85.1±2.1
乾燥空気 設定流量	(L/min)	0.3	0.1
加湿装置 設定流量	(L/min)	0.3	0.5
飽和蒸気発生器 恒温水槽 設定温度	(°C)	37.0	37.0

4. 考察

Nafion®法とバブリング法の2種類についてその加湿特性を検討した。今回得られた結果を単純に比較すると、Nafion®法では水蒸気を発生させるのに、より多くの通気流量が必要となり、効率的ではないと考えられる。しかし今回、Nafion®管は既存のものを使用したため、最適なサイズの製品を使用すれば、発生量を増やすことができると考えられる。

一方、バブリング法では少ない流量で多くの水蒸気を発生でき、さらに通気流量や温度設定により計

算どおりの任意の水分量を容易に、かつ長時間安定して得ることができることから、目的にかなっていると考えられる。また、バブリング容器の設定温度を高くすることにより、水分発生量を増加させることができることから、加湿による試料ガスの希釈を最小限にすることが可能であると考えられる。

上記の結果を考慮した結果、バブリング法を細胞曝露システムにおいて最適な加湿方法として CULTEX®装置に導入することとした。この加湿方法の導入により、CULTEX®装置において培養細胞を長時間維持可能であるかを検討する必要があるが、それに関しては別報³⁾にて検討した。

参考文献

- 1) Aufderheide, M. and Mohr, U.: CULTEX-a new system and technique for the cultivation and exposure of cells at the air/liquid interface, *Exp. Toxic. Pathol.*, Vol. 51, p.489-490 (1999)
- 2) Aufderheide, M. et al.: Novel approaches for studying pulmonary toxicity in vitro, *Toxicol. Letters*, Vol. 140-141, p.205-2111 (2003)
- 3) 田中 睦美ほか: *in vitro*細胞曝露装置における最適な培養環境の探索, *JARI Research Journal*, 20150601
- 4) 磨田裕: 気道の給湿療法, 呼吸療法テキスト, 三学会合同呼吸療法士委員会編, 東京, 克誠堂出版, p.139-146(1992)
- 5) ジャパンコントロールズ株式会社 Perma Pure Nafion® ガスドライヤー&加湿器 : http://www.jct.co.jp/catalogs/permapure/permapure_04Nafion.pdf (2015.4.7)
- 6) VITROCELL SYSTEMS humidification station : <http://www.vitrocell.com/inhalation-toxicology/humidification-systems/humidification-station> (2015.4.7)
- 7) Glass Expansion社 ネブライザー : http://jp.geicp.com/cgi-bin/site/wrapper.pl?c1=Products_nebs_learnabout (2015.4.7)