

# 生化学における熱測定研究法

## IV. 分析手段としての応用\*

高橋 克忠\*\*

生化学研究においても、状態や状態変化の性質を解析するための手段として熱測定を有効に利用できる場合がしばしばある。この講座のしめくりに、そのような分析的な立場での熱測定の応用をいくつか紹介することにする。

### 1. 反応速度解析

反応熱が反応量に正確に対応することを利用して、反応量あるいは反応の経時変化を追跡する方法である。反応速度は一般には、紫外吸収や蛍光変化などの分光学的性質の変化を利用して求められる。けれども特異的な分光学的変化を示さない系も数多くあるから、そのような系での動力学的解析をすすめる手段の一つとして反応熱の利用が期待されているのである。

#### 1.1 速い反応とストップフローカロリメーター

熱測定で反応速度論的な取扱いをする基本は反応熱の経時変化を正確にもとめることである。熱量計シグナルは理想的な断熱型熱量計のものでないかぎり、熱量計セルと周囲との熱交換があるため、反応熱の経時変化をあらわすことにならない。けれども、熱量計の中の反応がじゅうぶん速くて、熱交換が無視できる場合には熱量計シグナルを實際上反応熱に比例するものとして解析して差支えない。数秒ないし数十秒以内の反応（より断熱性の高い熱量計の場合には数分以内の反応）であるならば、熱量計シグナルが反応にともなう熱量変化をあらわすものとして解析の対象になると考えてよい。ただし、検熱体には、時定数のじゅうぶん小さいものを選ばなければならない。極細の熱電対や粒子径の小さなビード型サーミスターが用いられ、数ミリ秒の測定までなされている

\* 生化学における熱測定研究法 I (上) 熱測定 4 (2) 67-75 (1977); 同 I (下) 熱測定 4 (3) 117-125 (1977); 同 II 熱測定 4 (4) 165-171 (1977); 同 III 熱測定 5 (1) 34-44 (1978)

\*\* 大阪府立大学農学部生物物理化学研究室：堺市白舌島梅町 4 丁目

Katsutada Takahashi: Laboratory of Biophysical Chemistry, College of Agriculture, University of Osaka Prefecture, Sakai, Osaka 591, Japan

が、被覆材が時定数を支配することに注意しなければならない。

速い反応の熱解析として著名なものに Roughton のフロー法がある<sup>1)</sup>。これは試料液を一定速度で混合しながら細い反応管に導き、反応熱による反応液の温度変化を熱電対を用いて検出する方法である。流速一定の条件では熱電対と混合室との距離が反応時間に対応するので、熱電対の位置を種々に変えて測定して反応曲線を描くことができる。この方法でヘモグロビンと一酸化炭素の結合速度をはじめ、多くの生体反応系の解析がなされた。

ただこのようなフロー方式では測定時に反応液を定速で流しておかなければならないため、試料が大量に必要である。そこで近年になってフローを停止させて測る方法、すなわちストップフロー法が考案された。分光学的検出法をもつストップフロー装置は今日ミリ秒から秒の範囲の速い反応を解析する手段としてもっとも一般的に使われている。

このストップフロー法に熱検出を用いたものに Berger の装置がある<sup>2)</sup>。その概略を図 4.1 に示す。高速で混合した反応液を混合室直後にある観測室に導き、流れを停止させる。観測室にある検熱体が反応にともなう反応液

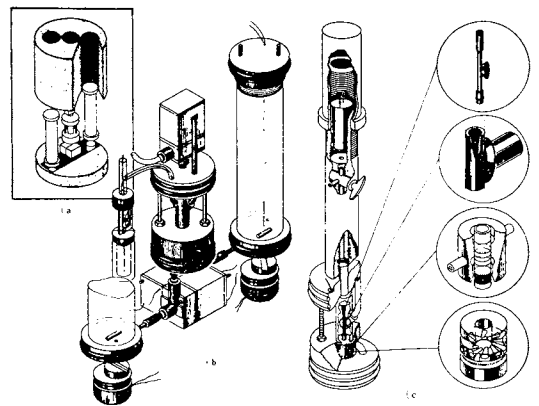


図 4.1 Berger の熱検出ストップフロー装置<sup>2)</sup>

- a) 30 × 30 cm アルミニウムブロック、恒温に保たれる
- b) 2つの反応系容器と混合系—測定部位(中央)、これが(a)の二つの穴に入る
- c) (b)の混合機構および測定セル、熱電対位置の拡大図

の温度変化を検出し、それをガルバレコーダーやオシロスコープで記録する。このBergerの装置では検熱体として単一の熱電対が用いられているが、酵素反応を速度論的に解析するための濃度条件が通常  $10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$  以下という希薄なものであるので、シグナルを記録するには高倍率の増幅が必要である。

いまかりに反応のエンタルピー変化を  $\Delta H = -10 \text{ kJ mol}^{-1}$  とする、反応液の濃度を  $C = 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$  とすると、発熱量は  $Q = 10^{-2} \text{ J cm}^{-3}$  である。溶液が希薄でその熱容量が水のそれにはほぼ等しいとし、また観測室の壁や検熱体の熱容量を無視すると、反応系の熱容量は  $W = 4.2 \text{ J K}^{-1} \text{ cm}^{-3}$  となる。したがって、反応熱により期待される反応液の温度上昇は

$$\Delta T = \frac{Q}{W} = 0.0024 \text{ K}$$

である。

熱電対の熱起電力は平均  $40 \mu\text{V K}^{-1}$  であり、単一の熱電対でこの温度差を検出するとすれば、検出端の電圧は

$$\Delta V = 0.0024 \times 40 = 0.1 \mu\text{V}$$

というきわめて微小なものにしかならない。ストップフロー法は試料の微量化が目的の一つであり、観測室のスペースも制限があるため、検熱感度を上げる目的で、通常の細工で熱電対を多数バイルすることは非常に困難である。かりに10対をバイルしたとしても上の検出端電圧は  $1 \mu\text{V}$  にしかならず、実際の使用からいってかなり厳密な温度制御が要求されることが理解されるだろう。

電気的な検出感度を高くするための方策の一つは、検熱体としてより温度係数の大きなサーミスターを用いることである。ただし時定数が多少長くなることはさげられない。また通電状態で測定することによる自己加熱を反応にもとづく温度変化と誤認しないよう注意が要る。

有意な速度論的解析をすすめるためには、反応物質の濃度が適切な範囲—通常  $10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$  以下—にあるようにして測定しなければならない。したがって、検熱体として高感度のものを用いても、温度変化は依然として微小であることには変わりがないから、熱量計構成要素の温度制御をじゅうぶん精密におこなわなければならない。そのためには熱量計の各部分(液溜め、混合室、検熱部)が熱的に一体であること、すなわち熱伝導の良い材料で接続されていることが必要である。けれども、このことは熱量計シグナルを反応経過とみなすためには不利な条件である。反応液と接する検熱部の壁面の断熱性が良い程、実測される温度変化が反応経過をより忠実にあらわすからである。実際には測定対象である反応系の速度とのかねあいで、ある程度の断熱性は必要である。そのため測定の都度装置を温度平衡にするのに時間を要するこ

とになり、反応時間は短くても実験時間は長くなる。

ストップフローカロリメトリーは原理的にはすでに確立されたものといえよう。けれども上に述べたような問題が原点にあり、そのためまだ一般性のある装置の開発には到っていない。先のBergerの装置は設計時においてそれなりの目的があったと思われるが、実際の測定例の報告も乏しく、適用しうる反応系が非常に制限されているものと想像される。この点、昨日本学会討論会で報告された中村の方法は、サーミスターを検熱体としていくつかの酵素反応系で一応の成果を挙げており、注目される<sup>3)</sup>。技術的な問題点が多く残されていて難しいテーマではあるが、このような方法がより一般化されることにより、未開拓の生化学反応の解析が一段とすすめられるようになるであろう。

## 1.2 遅い反応とサーモジェネシス

1.1の場合とは逆に、きわめて遅い反応を熱量計でみる場合である。熱量計の熱交換がセルの中の反応にもとづく熱量変化に比べじゅうぶん速いときには熱量計シグナルは熱量変化速度、すなわち、反応速度に比例する。これは理想的な伝導型熱量計の動作状態に対応するものであり、そのような熱量計シグナルの終時変化をサーモジェネシス(thermogenesis)と呼ぶ。低温における重合反応の熱量計シグナルは各時間における重合速度とみることができる。生物系では植物種子の発芽や昆虫の変態などマクロな状態の長時間の熱変化の記録は生物学的な代謝速度をあらわしている。

## 1.3 熱量計中の温度変化の性質

より一般化して、熱量計シグナルと反応熱終時変化の関係を示す。

反応熱により熱量計セルの温度が変化し、その熱量計の平衡温度に対する温度差が熱量計シグナルとして表示されるものとする。時間  $t$  において熱量計が示すシグナルを  $g(t)$  とすると熱量計セルが熱交換のない理想的な断熱状態におかれたときの温度変化  $f(t)$  は次式で与えられる<sup>4)</sup>

$$f(t) = g(t) + K \int g(t) dt \quad (4.1)$$

ここで  $K$  はその系に固有の熱伝導定数(heat leakage modulus)(或はニュートンの冷却定数 Newton's cooling constant)であり、実験的に容易に決めることができるものである。

この式は熱量計セルの見掛けの温度変化に対して、周囲との熱交換による温度変化の補正を施す式であり、したがって  $f(t)$  は反応熱にもとづく本来あるべき熱量計セルの温度変化すなわち反応の時間経過に対応するものである\*。

\*この場合、熱量計の熱交換が定常状態にあり、その実効熱容量も時間とともに変わらないという前提がある。

(4.1)式の微分形

$$f'(t) = g'(t) + Kg(t) \quad (4.2)$$

から、熱量計セルの中の熱量変化速度が熱交換速度に比べて著しく速いとき ( $g'(t) \gg Kg(t)$ )、(4.1)式は

$$f(t) \approx g(t) \quad (4.2a)$$

となる。これは速い反応において熱量計シグナルを反応熱変化とみてよい条件である(1.1)。また熱量計セルの中の熱量変化速度が熱交換速度に比べて著しく遅いとき ( $g'(t) \ll Kg(t)$ )、(4.1)式は

$$\frac{1}{K} f'(t) \approx g(t) \quad (4.2b)$$

となる。これは熱量計シグナルが真のサーモジェネシスを与える条件である(1.2)。

$f(t)$ を求めるには卓上計算機を用いるのがもっとも簡便である。任意の時間間隔で  $g(t)$  をインプットし、 $f(t)$  を演算することができる。演算のためのフローチャートとプログラムの一例を図4.2(a)に示す<sup>4)</sup>。

$f(t)$ の演算をアナログ回路でおこなうことも便利である<sup>5)</sup>。図4.2(b)に示すような演算回路を組み  $g(t)$  を入力として  $f(t)$  を描かせる。装置定数としての  $K$  の値は任意に電位で設定できるようにしておく。10分を越すような時間の長い測定では積分回路をコンデンサー積分ではなく機械的な積分に置き換えなければならない<sup>6)</sup>。

熱量計シグナルを適当なインターフェースを通してデジタル化し、紙テープあるいは磁気テープで記録して大

型の計算機で処理するのも一つの方法である。データの解析がシステム化できるものについては  $f(t)$  の演算だけでなく、その後の解析も同時にすすめられるよう計算機のプログラムを組むと効率が良い。

## 2. 反応熱による平衡定数の決定

反応熱は反応量に比例するから、可逆反応系の正逆両反応の熱量測定値から平衡定数を求めることができる。たとえば



という可逆反応の反応熱測定をおこなう。Aから出発して平衡状態を得るときの反応熱を  $q_A$ 、Bから出発して平衡状態を得るときの反応熱を  $q_B$  とすると、その系の平衡定数は

$$K_{eq} = \frac{q_A}{q_B} \quad (4.4)$$

で与えられる。

あまり平衡が偏ったものでなく、どちらから出発しても同じ平衡組成を得る異性化反応系において、平衡組成の化学分析をおこなわずに平衡定数が決定できる。

また酵素反応系に反応生成物をあらかじめ加えておいて反応熱測定をおこなうとき、熱の出入りのない反応系組成を求めて平衡定数を知ることできる<sup>7)</sup>。

反応熱を指標として滴定曲線を描き、反応の平衡定数を決定する方法はすでに I-2.1のタンパク質とリガン

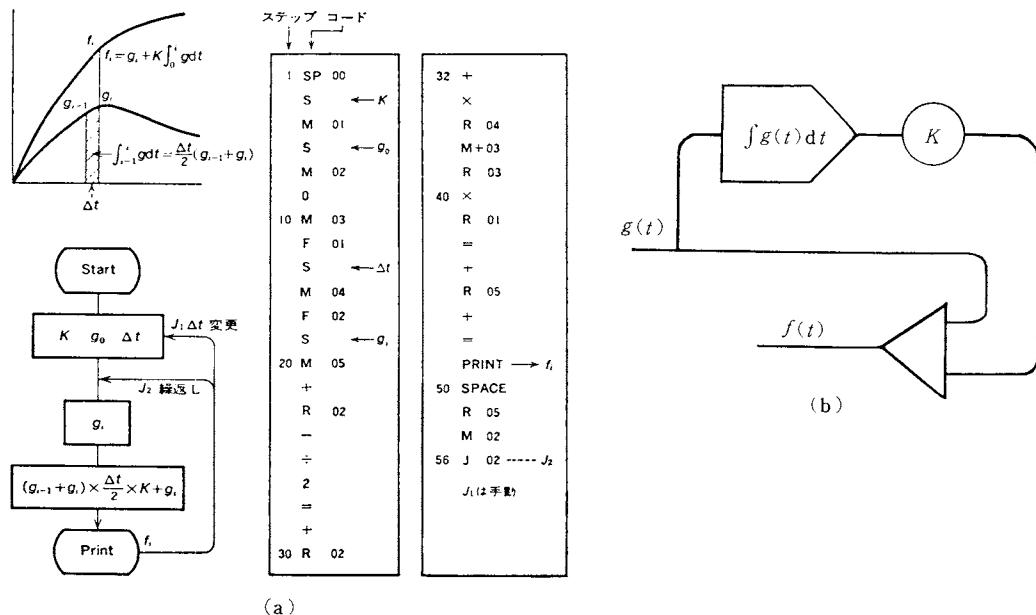


図4.2  $f(t)$ の演算

a) 卓上計算機による演算のフローチャートとプログラムの一例 (ただし計算機SEIKO S-500の用語で表示), b) アナログ演算回路

下の相互作用のところで述べた。反応熱によるリガンド  
 滴定曲線からタンパク質とリガンドの特異的の会合を解析  
 し、タンパク質の物理化学的機能を詳しく論ずる方法は  
 ひろくおこなわれている。またタンパク質のpH滴定を  
 熱量計を用いておこなうのは、タンパク質表面の状態を  
 探る重要な方法の一つになっている。

### 3. 間接的に推測された生体高分子の 温度転移と熱容量差理論曲線

生体高分子の活性や特定の物性値が温度とともに急激  
 に変化する現象をみとめたとき、その温度領域の前後で  
 状態転移がおこなっていると推測される場合がしばしばあ  
 る。熱容量差測定はこのように間接的に推測される状態  
 変化の妥当性をチェックする手段として使える。

生体高分子溶液のある物性値、たとえば特定の波長に  
 おける吸光係数が図4.3(a)に示すような温度依存性を  
 示したとする。このような場合に、分子に二つの状態を  
 考え、温度  $T_t$  を中心に状態が温度転移をしているとみ  
 なして、図4.3(b)のような転移曲線の van't Hoff プロ  
 ットから転移のエンタルピー  $\Delta H_{vH}$  を求めて示すことが多  
 い。

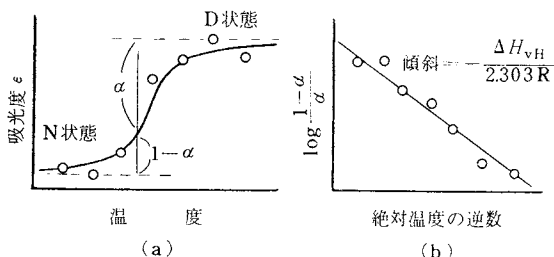


図4.3 生体高分子溶液の吸光度温度依存性でみた  
 転移曲線(a)とそのvan't Hoffプロット(b)

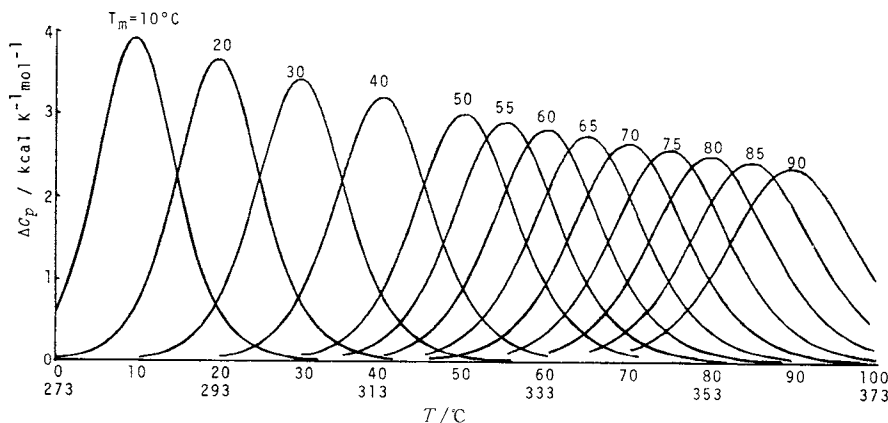


図4.4 熱容量差理論曲線

$\Delta H_t = 50 \text{ kcal mol}^{-1}$  として  $T_t = 10 \sim 90^\circ\text{C}$  の範囲で計算

もし  $-\Delta H_{vH}$  が正しいものであるなら、それに相当  
 するエンタルピー変化  $\Delta H_t$  が熱容量測定により過剰熱容  
 量  $\Delta C_{p,ex}$  として実測されてよいはずである(1-3)。  
 すなわち

$$\Delta H_{vH} = \Delta H_t \int \Delta C_{p,ex} dT \quad (4.5)$$

いま二状態(N状態、D状態とする)ともそのエンタ  
 ルピーが温度により変わらず、また転移のエンタルピーも  
 温度により変わらないと仮定すると、すなわち

$$\left(\frac{dH_N}{dT}\right) = \left(\frac{dH_D}{dT}\right) = \left(\frac{d\Delta H_t}{dT}\right) = 0 \quad (4.6)$$

のとき、ある温度におけるN状態のモル分率を  $\alpha$  として  
 そのときの過剰熱容量は次の如く書くことができる。

$$\Delta C_{p,ex} = \Delta H_t \left(\frac{d\alpha}{dT}\right) \quad (4.7)$$

転移が van't Hoff の関係を満たすなら

$$\frac{1-\alpha}{\alpha} = \exp\left\{\frac{\Delta H_t}{R}\left(\frac{1}{T_t} - \frac{1}{T}\right)\right\} \quad (4.8)$$

となり、これを書き直すと

$$\alpha = \frac{1}{1 + \exp\left\{\frac{\Delta H_t}{R}\left(\frac{1}{T_t} - \frac{1}{T}\right)\right\}} \quad (4.9)$$

が得られる。

(4.9)式を(4.7)式に代入して解くと

$$\Delta C_{p,ex} = \frac{\Delta H_t^2}{RT^2} \frac{\exp\left\{\frac{\Delta H_t}{R}\left(\frac{1}{T_t} - \frac{1}{T}\right)\right\}}{\left[1 + \exp\left\{\frac{\Delta H_t}{R}\left(\frac{1}{T_t} - \frac{1}{T}\right)\right\}\right]^2} \quad (4.10)$$

となり、 $\Delta H_t$  および  $T_t$  が与えられていると、任意の温  
 度における過剰熱容量  $\Delta C_{p,ex}$  が計算により求められる。

すなわち温度転移にともなう熱容量差曲線が理論的に予測されるのである。

図4.4は転移曲線の van't Hoff プロットから得たエンタルピー変化を  $\Delta H_t = 50 \text{ kcal mol}^{-1}$  として(4.10)式を用いて描いた熱容量差-温度曲線である。転移温度  $T_t$  が  $10^\circ\text{C}$  から  $90^\circ\text{C}$  の範囲の種々の場合について示してある<sup>8)</sup>。図4.5は転移温度を  $T_t = 70^\circ\text{C}$  として、転移のエンタルピー  $\Delta H_t$  を  $10$  から  $100 \text{ kcal mol}^{-1}$  の範囲で変化させた場合の  $\Delta C_p(\text{ex.})$  の理論曲線である<sup>8)</sup>。このように図4.3(a)のような転移曲線を解析して  $\Delta H_{\text{vH}}$  および  $T_t$  が得られたならば、それに対応する熱容量差曲線が実際の熱測定で観測されなければならない。もし理論的に予測されるような過剰熱容量が実測されなければ、最初に得られた転移曲線がアーティファクトであるかもしれないし、また他の要因にその説明を求めなければならないことになる。

熱量計で実測された転移エンタルピーと van't Hoff のエンタルピーが一致しないときには、転移挙動を示す単位が1分子ではないという可能性もある。生体高分子の温度転移における  $\Delta H_{\text{cal}}(\Delta H_t)$  と  $\Delta H_{\text{vH}}$  の比が分子の転移挙動単位(協同効果単位)を示すものであることはすでに1.3.3で述べた。

精密な熱容量差測定装置を用いるのではなく、市販のDSC装置、定量DTA装置によってもある程度の目安になるデータをとることにはできる。これらの装置ではシグナルが経験的にはほぼ対照側に対する熱容量差を与える。ただ熱力学的な平衡状態に対応する真の熱容量差でない

し、同様にシグナルのピークが厳密に転移温度  $T_t$  でないことも承知しておかねばならない(1.3.4)。

#### 4. 医療目的での応用

近年、熱測定の生化学的応用の一つとして臨床検査手段として導入するための基礎的な研究が精力的になされている。臨床検査では代謝異常を調べるために特定の代謝産物を酵素反応を用いて定量することが多い。反応物質の定量に分光学的測定をすることが一般的であるが、これを熱の出入りの測定に置きかえてみようという試みである。特異的な吸光度変化を示さない系で、従来検査手段のない物質分野にまで範囲が広げられる可能性がある。原理的に可能であることが示されたものも多数あるが、これまでの検査手段に代るものとして実用化されるにはまだ道のりがあるようである。

図4.6はタンパク質代謝や腎機能に関連して、血清中の尿素量を熱測定で定量する試みを示したものである<sup>9)</sup>。固定化した尿素分解酵素のカラムに検熱体を取りつけ、検体を注入して酵素による尿素の分解熱をカラムの通過前後の溶液の温度差で検出する。一試料の測定が約1分間でおこなわれる。このような固定化酵素のカラムを利用するのは分析手段としてルーチン化するのに非常に有効であろう。

赤血球の代謝反応熱と種々の疾患や治療の診断に応用しようという試みもある<sup>10)</sup>。治癒前後の患者および正常人から採取した赤血球について比較されているが、被検体の個体差が大きいところに問題があるようである。

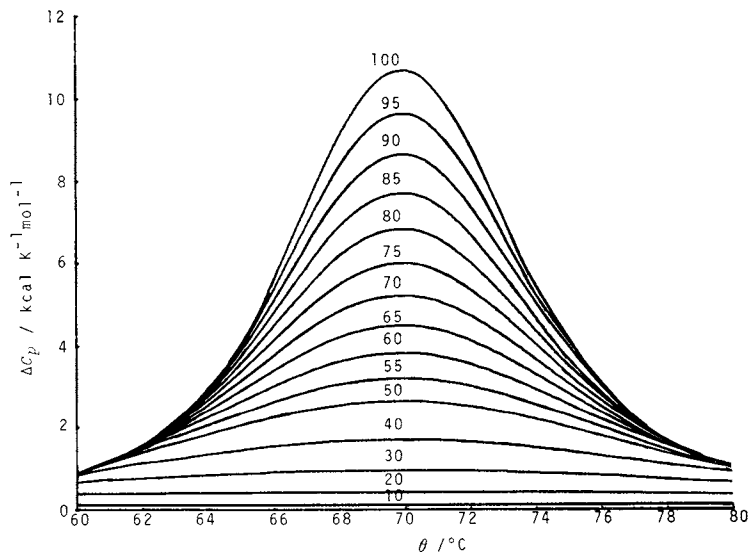


図4.5 熱容量差理論曲線

$T_t = 70^\circ\text{C}$  とし、 $\Delta H_t = 10 \sim 100 \text{ kcal mol}^{-1}$  の範囲で計算

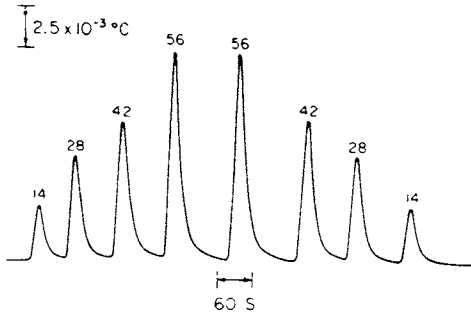


図4.6 固定化酵素による尿素分解の  
反応熱を利用した尿素の定量<sup>9)</sup>

試料量 120  $\mu$ l, 数字は尿素濃度 (mg/100 ml) をあらわし, 熱量計シグナルは尿素濃度に比例している。

これらは臨床検査への熱測定の導入の可能性を示す具体例といえる。分析化学が益々微量化の方向に発展しつつある今日、一般論としてこのような分野で熱測定が実用化されるのは検出感度が飛躍的に改善されないかぎり難しいとみられているが、いろいろな方向で検討をつけることは決して無駄ではないと思われる。

### 5. 微生物を含む系での応用

微生物細胞の熱測定はすでに III 2.2 で述べた、マイクロな状態の熱測定ではその生化学的な対応がじゅうぶんでないと有用な解析ができないといえるが、そうした中で定量性が非常に高い微生物反応系の熱測定については、特にその分析手段としての応用範囲が広い。

#### 5.1 装置と方法

微生物反応とりわけ増殖系の熱測定は 10 時間、30 時間あるいは 1 週間というように長時間にわたることが特徴である。熱量計としてはフロー式(フローセルを使用)またはバッチ式が用いられるが、通常の用途からいえば現時点では後者の方が有利な点が多いので、ここではバッチ式の測定の場合についてのみ述べる。

バッチ式の熱量計では熱量計セルそのものが培養槽になる。熱量計セルに微生物の増殖に必要な各種の設備を備えることで様々な条件での培養一回分培養、連続培養もともに一をおこなうことができる。

この分野でもっとも系統的に研究をすすめているベルリン自由大学の Lamprecht<sup>11)</sup> は、熱電対を検熱体とするカルヴェの熱量計を用い、主として酵母の増殖系で幅広い解析をすすめている(図4.7)。一方やはり基礎的な実験を数多く示した Forrest<sup>12)</sup> はサーミスターを検熱体とする微生物用熱量計を製作して用いている(図4.8)。この装置の特徴は温度検出の時定数が短いことである。けれども微生物系のように長時間の測定を要するものを

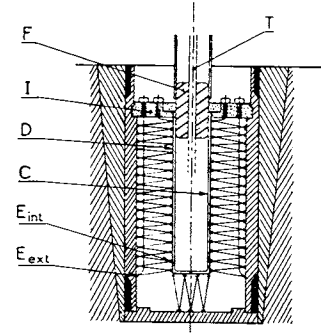


図4.7 Lamprecht が用いている  
カルヴェの熱量計<sup>11)</sup>

$E_{ext}$ : 熱電対の外側接点,  $E_{int}$ : 熱電対の内側接点,  
C: 熱量計セル, D: 銀製熱伝導壁, I: セル支持板,  
F: セル蓋, T: 試料注入管

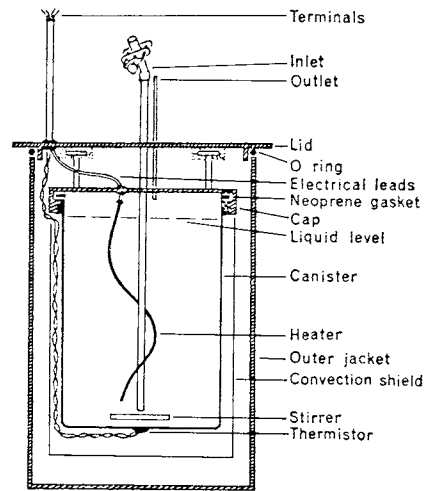


図4.8 Forrestの微生物用熱量計<sup>12)</sup>

対象とする場合には、通電状態で抵抗値を測るサーミスターの利用は安定性の点から問題があり、特別な用途で用いる場合のほかはあまり有用でない。

図4.9は筆者らの微生物用熱量計である<sup>13)</sup>。これは天谷らのサーモジュールを検熱体とする双子型伝導熱量計を基本として製作したもので、熱量計セルは 300  $\text{cm}^3$  容の独立したステンレス製培養セルになっている。セル容量が大きいため、カルヴェの装置に比べ温度検出の時定数は多少長くなるが、pH電極、酸素電極を挿入して、それらによる同時測定ができること、また攪拌や通気のための機構が種々に変更されるなど、の利点がある。さらに培養途中で培養液を適宜サンプリングしても、熱容量が大きいため熱測定にほとんど影響がなく、培養液の生化学分析を並行しておこなうことが可能である。

操作は、まず調製した培地を含む培養セルをオートク

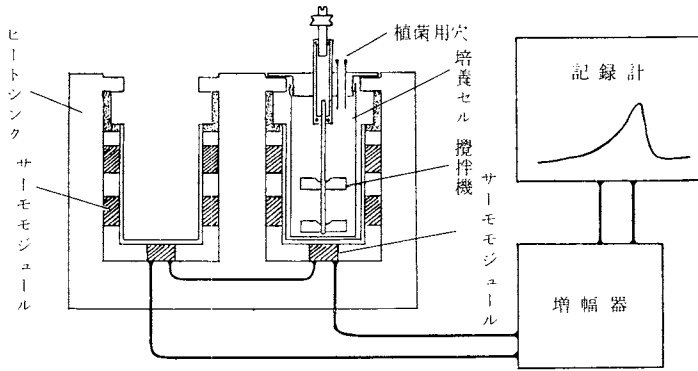


図4.9 筆者らの微生物用熱量計とその検出法<sup>13)</sup>

レーブ殺菌し、それを熱量計中に設置する。セルがじゅうぶん温度平衡に達した後、種菌を植えつけ、以後の増殖にともなう熱変化を記録する。

5.2 増殖サーモグラムの性質

サーモグラムの典型的な例を図4.10に示す<sup>13)</sup>。酵母を0.3%のグルコースを含む合成液体培地でほぼ嫌氣的に培養したときの増殖サーモグラムである。通常の微生物学的手段で用いられる培養液の濁度測定で得た増殖曲線を同時に示してある。これからわかるように、増殖のサーモグラムは増殖曲線のほぼ微分形で与えられている。すなわち、熱量計セルの中の熱量変化が熱量計の熱交換

速度に比べじゅうぶんゆるやかであり、サーモグラムは定性的にはほぼサーモジュネシスに等しいとしてよいわけである(1.2)。

制限基質としてグルコースとそれ以外の各種糖類を用いたサーモグラムを比較したものが図4.11(a)である。糖の資化性の微妙な違いが浮きぼりにされる。図4.11(b)は培養の温度によるサーモグラムの形状の変化をあらわしている。また培養時の植菌数(初期細胞数)が異なる場合には図4.11(c)に示すようにサーモグラムが時間軸に対して平行移動したような形で得られる。

サーモグラムでみた増殖のパターンは微生物種によっても当然違ってくる。図4.12は四種の腸内細菌のサーモグラムを比較したものであり、それぞれ固有の形状をもつことが明らかである<sup>14)</sup>。

以上のようにサーモグラムは増殖の状態をきわめて鋭敏に反映したものであり、このことから微生物系の熱測定が、単に熱化学的な意味だけでなく、増殖速度、基質の資化性、微生物種の同定、薬物抗生物質の作用、その他微生物工業における培養の管理等、非常に広範な用途をもつことが理解されるであろう。

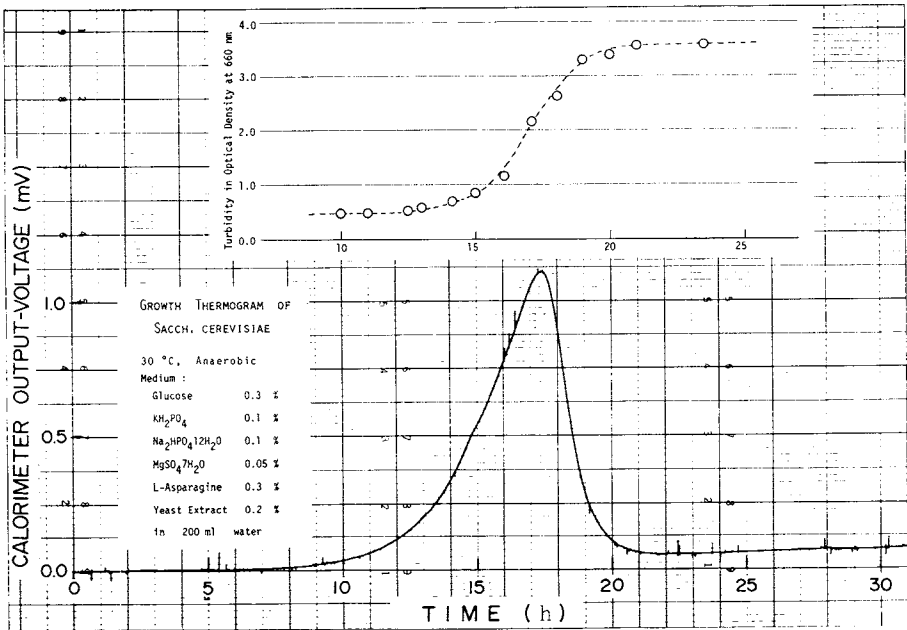


図4.10 酵母の嫌氣的増殖のサーモグラム<sup>13)</sup>

0.3%のグルコースを含む培地で培養、培養温度 303 K、 $1mV \approx 0.017 K$ 、挿入図は濁度測定でみた生育曲線、サーモグラムは生育曲線のほぼ微分形になる。

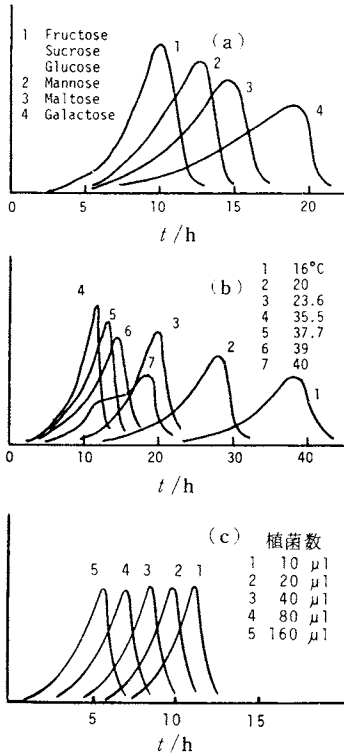


図4.11 酵母増殖のサーモグラム形状の変化  
(a) 糖の種類が異るとき、(b) 培養温度が異るとき、  
(c) 植菌数が異るとき

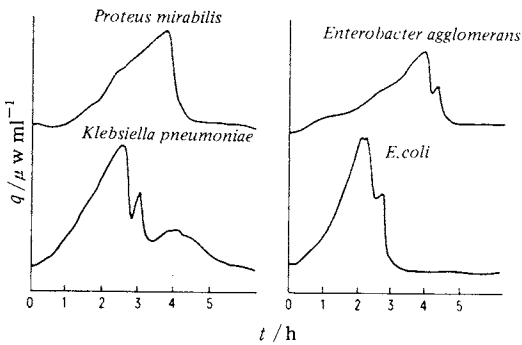


図4.12 四種の腸内細菌の増殖サーモグラム<sup>(4)</sup>

適切な条件のもとでは菌種に特異的なサーモグラムを与え、菌の同定や分類に応用できる

### 5.3 増殖サーモグラムの定量的取扱い

サーモグラムは定性的にはばサーモジェネシスを示すとみてよいが、定量的に解析するためにはより厳密に取扱わなければならない。

微生物増殖系で記録される熱量計シグナル  $g(t)$  も (4.1) 式を用いて、真の温度変化  $f(t)$  に変換される。 $f(t)$  は温度差に相当する量であるが、系の実効熱容量

が普通は測定時を通じて一定とみなせるので、真の温度変化  $f(t)$  はまたセルの中の熱量の経時変化とみてよい。

図 4.10 のサーモグラムと温度の関係から、この  $f(t)$  が増殖曲線に対応することを直観的に予想することができる。実際ある範囲で  $f(t)$  が細胞重量実測値と一致することを示した実験も数多い。また  $f(t)$  が温度変化や制限基質の消費量と一定の範囲で比例関係が成り立つことも示されている。

制限基質がじゅうぶんにあり、微生物が対数増殖をおこなう条件では、増殖は一般に次のように記述される。

$$n = n_0 \exp\{\mu(t - \tau)\} \quad (4.11)$$

ただし、 $n$  : 時間  $t$  における細胞数

$n_0$  :  $t = 0$  における細胞数 (植菌数)

$\mu$  : 細胞の増殖速度定数 (細胞の分裂速度)

$\tau$  : 誘導時間

増殖にともなう熱量変化  $f(t)$  が増殖曲線をあらわすものとし、誘導期における単位細胞当りの発熱速度を  $q_0$   $\text{J s}^{-1} \text{cell}^{-1}$ 、対数増殖期における単位細胞当りの発熱速度を  $q_1$   $\text{J s}^{-1} \text{cell}^{-1}$  とすると、 $f(t)$  は次のように表わされる。

$$f(t) = \int_0^{\tau} n_0 q_0 dt + \int_{\tau}^t q_1 n_0 e^{\mu(t-\tau)} dt \quad (4.12)$$

定義から  $q_0$  は時間の関数であるのに対し、 $q_1$  は定数である。したがって (4.12) 式は次のようになる。

$$f(t) = n_0 A e^{\mu t} + n_0 B \quad (4.13)$$

$$\left( \text{ただし、} A = \frac{q_1}{\mu e^{\mu \tau}}, B = \int_0^{\tau} q_0 dt - \frac{q_1}{\mu} \right)$$

(4.13) 式は対数増殖期の熱量変化を表わすもっとも単純な式であり、サーモグラムから (4.1) 式を用いて得た  $f(t)$  をもとに増殖速度定数  $\mu$  を回帰分析で決定することができる。また手計算による場合は Guggenheim の式を用いるのが便利である。任意の時間間隔  $\Delta t$  をとることにより、次式を導く。

$$\log \{f(t + \Delta t) - f(t)\} = \log n_0 A (e^{\mu \Delta t} - 1) + \frac{\mu}{2.303} t \quad (4.14)$$

すなわち、一定時間差  $\Delta t$  における熱量変化の差の対数を時間  $t$  に対してプロットすると直線が得られ、その傾斜から細胞の増殖速度定数  $\mu$  が求められる。

(4.13) 式はまた  $f(t)$  が培養時の植菌数  $n_0$  の関数であることを示している。実際図 4.11 (c) のサーモグラムを解析することにより (4.13) 式の妥当なことが裏付けられる。

### 5.4 増殖サーモグラムの速度論的解析

細胞の増殖は経験的に Monod の式で取扱われることが多い。その場合、増殖速度定数  $\mu$  が制限基質濃度  $s$  に



対して酵素反応速度論におけるMichaelis - Menten型の依存性を示すとして次式で表わされる。

$$\mu = \frac{\mu_m s}{K_s + s} \quad (4.15)$$

ここで $K_s$ は基質定数と呼ばれる定数、 $\mu_m$ は最大増殖速度定数、すなわち制限基質がじゅうぶんに存在するときの増殖速度定数である。 $\mu_m$ は定義から先に述べた対数増殖期における増殖速度定数に等しい。

細胞の増殖速度定数は単位細胞当りの増殖速度であり次式で定義されるものである。

$$\mu = \frac{1}{n} \frac{dn}{dt} \quad (4.16)$$

熱量変化が増殖に比例する条件で、増殖時の単位細胞当りの発熱量を $q$ とすると、実験的に測定される熱量変化速度 $f'(t)$ は

$$f'(t) = nq \quad (4.17)$$

であるから、(4.16)式の $\mu$ は次式のようになる

$$\mu = \frac{f''(t)}{f'(t)} \quad (4.18)$$

したがって $f(t)$ の一階微分および二階微分の比から、増殖速度 $\mu$ が時間の関数として得られることになる。

また発熱量 $f(t)$ は一般に制限基質の消費量に比例することから、基質の初期濃度を $s_0$ 、時間 $t$ における基質濃度を $s$ とすると次式を置くことができる。

$$f(t) = \alpha (s_0 - s) \quad (4.19)$$

ここで $\alpha$ は単位基質消費当りの発熱量である。さらに制限基質を消費し尽した時点での総発熱量を $f(\infty)$ とすると次の関係が成り立つ。

$$f(\infty) = \alpha s_0 \quad (4.20)$$

増殖速度定数が制限基質濃度に対してMichaelis - Menten型の依存性を示すものとする(4.15)式、(4.18)式、(4.19)式、(4.20)式より

$$\mu = \frac{f''(t)}{f'(t)} = \frac{\mu_m \{f(\infty) - f(t)\}}{\alpha K_s + \{f(\infty) - f(t)\}} \quad (4.21)$$

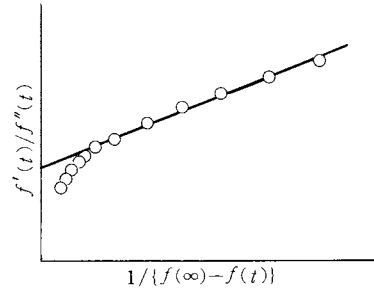


図4.13 増殖サーモグラムのLineweaver - Burkプロット(本文参照)

または

$$\frac{f'(t)}{f''(t)} = \frac{\alpha K_s}{\mu_m} \times \frac{1}{\{f(\infty) - f(t)\}} + \frac{1}{\mu_m} \quad (4.22)$$

が得られる。

(4.22)式より $f'(t)/f''(t)$ を $1/\{f(\infty) - f(t)\}$ に対してプロットすることにより、 $K_s$ 、 $\mu_m$ が決定できる。これは酵素反応速度論解析におけるLineweaver - Burkプロットに相当する(図4.13)。適切な測定条件を設定することにより、このような取扱いから図4.11に示されているような増殖パターンの違いを速度パラメーター $K_s$ 、 $\mu_m$ でもって表わすことが可能である。

ここで注意しておきたいのは、この取扱いで基本となるMonodのモデルが余りにも単純化されていて、熱測定のように、従来の微生物学的手段による測定値に比べはるかにシグナル-ノイズ比(S/N)の大きな情報を与えるものに適用するにはじゅうぶんでないということである。増殖サーモグラムの定量的な解析法をさらに発展させるためにはより適切なモデルを導くことの方が重要であろう。

### 5.5 新しい観点での方法論の提案

サーモグラムがもちあわすすぐれた定量性からいって、次に示すような新しい観点での方法論が展開されてよいように思われる。

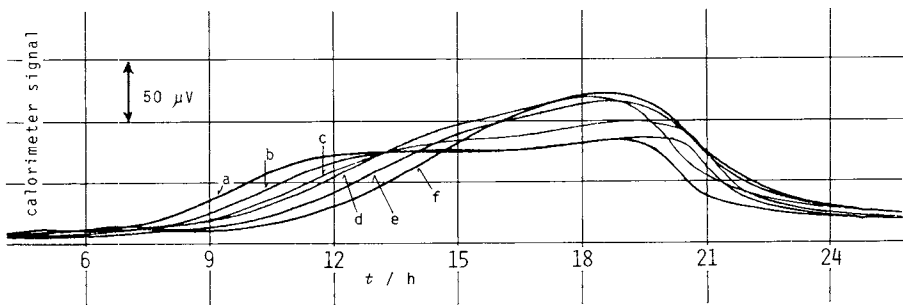


図4.14 汚染度の異なる市販牛乳の腐敗サーモグラム

汚染度(相対値)… a) 1, b) 1/2, c) 1/4, d) 1/8, e) 1/16, f) 1/32. 試料 10 ml, 温度 303 K

5.5.1 食品の腐敗

食品の腐敗の実体は微生物による汚染とその繁殖に伴う変質である。そのような解析は化学分析によるのが一般的であるが、熱測定による例を次に示そう

図4.14は人工的に微生物汚染度の異なる牛乳を調製して、その腐敗過程が与えるサーモグラムを示したものである<sup>15)</sup>。相対的な微生物汚染度とサーモグラムの対応が明らかであるが、両者の関係をさらに(4.13)式を使って定量的に記述することもできる。このサーモグラムの立ち上がり部分は図4.11(c)の植菌数の違いによるサーモグラムの形状変化に対応している。腐敗には複数種の微生物が関与しているのが普通であるが、この方法は系に含まれる群としての微生物活性を熱測定でマクロに捕えるという点を特徴とするものであり、単一の微生物種を対象とする方法が中心の従来の微生物学的手段では扱うことができなかった領域であろう

腐敗という現象の物理化学的解析、商業製品としての食品の流通過程における微生物汚染度の分析等に活用してみてもどうであろうか。

5.5.2 生態学的活性の評価

自然界の物質循環の中で重要な地位を占める土壌微生物の作用は、炭酸ガスの放出量や酸素の消費量あるいはその他の化学分析手段で測られている。けれども食品の腐敗の場合と同様に、土壌に含まれる集団としての微生物群の活性を生物反応熱として検出することも可能であり、特に定量的な解析を目的とする場合にはより優れた手段となりうるであろう。

一例として環境汚染との関連で、重金属で汚染された土壌が生態学的活性にどのような影響を与えるかを示した実験を紹介しよう。図4.15は畑作地で採取した生の土壌に種々の濃度で重金属セレンウムを添加し、人工的

に汚染度を変えた状態の土壌試料を調製して、同時にグルコースおよび窒素(硫酸)を加え、その後の微生物による分解の過程をサーモグラムで示したものである<sup>16)</sup>。セレンウムの濃度が高くなるにつれ、土壌中に含まれる微生物群の活性が抑制されている様子が明らかにとめられる

環境化学では分析技術の進歩により極微量の汚染物質まで精度よく定量することができるようになったが、そのようにして得られた汚染物質の分析値がはたしてどのような生物学的意味をもつのか、汚染の生態学的評価についてはその方法論すら確立されていないのが現状である。このような問題点を踏まえ、筆者らのグループは新しい生態学的活性の評価法として、上の例のような土壌微生物系での熱測定を導入することを提案してきている。

5.5.3 バイオアッセイにおける計量試験

バイオアッセイ(生物試験法)とはある物質を生物に与えたときの生物の反応をみて、その物質の定量をしたり、またその性質、生体に対する効果を評価したりする方法である。なかでも微生物試験法は個体差や生体条件の再現性などの点で精度も比較的良好、抗生物質の効果、ビタミンの定量、毒性試験、微量元素の検定など多くの分野で使われている。

生体に対する毒性を表わすものに致死量(LD<sub>50</sub>)や微生物の最低生育阻止濃度(MIC)が知られている。これは被検生物をまず生と死の二つの状態に選別し、それぞれの個体数を計測する計数的指数である。ところが、生体は毒物によって死には到らなくとも、それ以前に何らかの影響を受けているはずである。すなわち、毒物の生体に対する効果を記述するにはこのような生と死を二分することから出発する計数試験では不十分であり、どの程度生の状態が生体が影響を受けているのかを記述できる

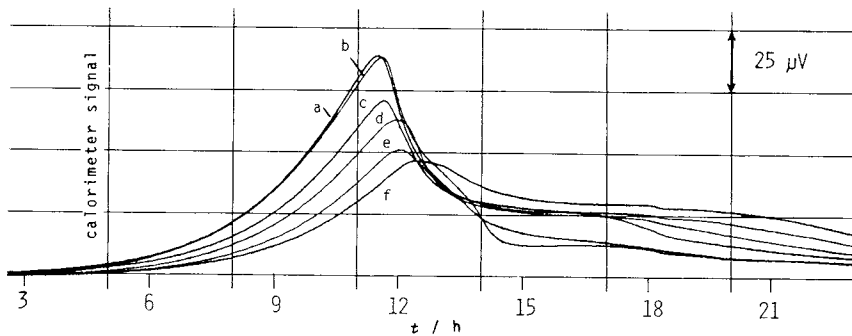


図4.15 生態学的活性の熱測定による評価：重金属セレンウムの土壌微生物活性に対する影響

セレンウム濃度… a) 0 ppm, b) 10 ppm, c) 30 ppm,  
d) 50 ppm, e) 70 ppm, f) 90 ppm  
試料畑作地土壌 30 g, 温度 303 K

計量試験法が実施されるべきであろう。この章で触れてきたいくつかの例からも明らかなように、微生物系の示す熱変化は生物のマクロな状態をきわめて忠実に反映するものであり、通常の微生物学的手段では得られない定量性の高い連続アナログ量を与える。こうした方法がより精度の高い計量試験法として、食品添加物や各種化学物質の有害性評価の場で採用されるよう強く提案したい。

生化学研究が多様化する中で、熱測定法のもつ意味も益々重要になりつつある。本講座では熱測定による生化学研究法について、いくつかの主要な題目を選び、主として技術よりも方法論を中心に、問題点も交えつつ紹介してきた。記述やテーマの選択にいろいろと不備な点があると思うが、この分野に関心をもつ方々にいくらかでも参考になればと願っている(おわり)。

#### 文 献

- 1) F. J. W. Roughton, B. Chance, "Technique of Organic Chemistry", ed by S. L. Friess, E. S. Lewis, A. Weissberger, vol. VIII part II, chap. XIV, Interscience Publishers, New York (1963); J. B. Bateman, F. J. W. Roughton, *Biochem. J.* **29**, 2622 (1935)
- 2) R. L. Berger, C. Stoddart, *Rev. Sci. Instr.* **36**, 78 (1965)
- 3) 中村隆雄, 松岡一郎, 第13回熱測定討論会, 東京(1977)
- 4) 高橋克忠, "生化学実験講座"(日本生化学会編) 12巻, p.19, 東京化学同人(1976)
- 5) M. Nakanishi, S. Fujieda, *Anal. Chem.* **46**, 119 (1974)
- 6) 高橋克忠, 第9回熱測定討論会, 大阪(1973)
- 7) C. Kitzinger, R. Hems, *Biochem. J.* **71**, 395 (1959), *ibid.*, 400 (1959)
- 8) 高橋克忠, 未発表
- 9) L. D. Bowers, L. M. Canning, Jr., C. N. Sayers, P. W. Carr, *Clin. Chem.* **22**, 1314 (1976)
- 10) M. Monti, I. Wadsö, *Acta Med. Scand.* **200**, 301 (1976); M. Monti, *Scand. J. Haematol.* **19**, 313 (1977)
- 11) I. Lamprecht, "Biological Microcalorimetry", ed by A. E. Beezer, Academic Press, London, in press; I. Lamprecht, B. Schaarschmidt, *Pressdienst Wissenschaft Freie Univ. Berlin* **4**, 52 (1974)
- 12) W. W. Forrest, "Biochemical Microcalorimetry", ed by H. D. Brown, p.165, Academic Press, New York (1969); W. W. Forrest, "Method in Microbiology", ed by J. R. Norris, D. W. Ribbons, vol 6B, p 285, Academic Press, London and New York (1972)
- 13) K. Takahashi, *Agr. Biol. Chem.* **37**, 2743 (1973)
- 14) B. Schaarschmidt, I. Lamprecht, *Experimentia* **32**, 1230 (1976)
- 15) 宮川金二郎, 川端達夫, 山野秀樹, 高橋克忠, 日本農芸化学会関西支部例会, 第301回講演会, 大阪(1977)
- 16) 川端達夫, 山野秀樹, 高橋克忠, 第13回熱測定討論会, 東京(1977)