

〈熱測定応用研究の頁〉

生物の状態と熱発生 —観察から測定へ—

Heat Productions for the States of
Organisms-from Observations to Measure-
ments

山村雅一

はじめに

生きている生物には熱発生が観察され、死んだら生物からは熱の発生がない。生きている生物の状態には大きく分けて活動期の状態と静止期の状態がある。生物の状態の変化は生物そのものの性質によって変化する場合と生物をとりまく環境によって変化する場合がある。いずれにしても仮説として、発生する熱の高低の程度は生きている生物の状態の反映であると考えることが出来る。

ここでは熱量計を生物の状態を把握することが出来る測定装置として考え、細胞や細菌の熱量の測定例を示し、更に全身から放出される熱量から動物への応用も可能であることを述べる。

熱量計

1. 細胞および細菌で使用した熱量計は電子科学(株)で開発した微小熱量計 Thermoactive Cell Analyzer ; ESCO-3000 で測定限界は1マイクロワットである。測定の様式は双子型、フロー式を採用した装置である。熱測定は全てストップフロー方法で行った。測定管内の容量は0.6mlで、測定に要した容量は0.5mlであった。簡単には細胞或いは細菌を含む懸濁液全体が検出部位内に到達したとき懸濁液の流れを停止し発生している熱を測定した。次の測定はチューブ内を表面活性化剤、時にはグルタルアルデヒド等で洗浄し、更に水、培養液で洗浄した後懸濁液を流して行った。
2. マウスおよびラットから放出される熱量を測定する目的で作られた全身熱量計(WBC-200, 電子科学社)

で、検出限界は0.1ワットである。測定室内温度は21℃、面積は20×20cmの広さで、10日以上の水と餌が入られ、更に実験によっては任意の運動が出来る Wheel を設置した。空気は毎分100mlの速度で空気のポンペから室内に入れられる。通常5日間連続で測定した。

1. 微生物への応用

1. 1. 動物細胞

細胞の発生する熱が細胞の状態の指標となり得るには以下の条件を考えておく必要がある。最も大切なことは測定の対象となる細胞集団はどの様な場合でも不均一な集団でしかありえない。逆に言えば均一な細胞集団を実験的に得る事は不可能であるということである。

細胞培養の条件

細胞培養の条件としては、細胞の種類によって温度、培養液、培養液中の炭酸ガス濃度や酸素濃度、血清濃度等を変化させ、最もよいものを見つけなければならない。必要な細胞数が期待できる培養条件を用い、細胞を集めそれぞれが希望する研究を行う。しかし、この様に細心の注意をはらって決定された培養条件であっても、培養期間全体を通じ変化しない条件は温度だけであって、その他の条件は培養期間に応じて刻々と変化している。すなわち新鮮な培養液であっても、栄養として加えられている成分は細胞の増殖に反比例し、少なくなるし、一定の濃度で供給されているはずの炭酸ガス、酸素も細胞周辺では細胞毎に微妙に異なると考えられる。細胞培養が一定の条件のもとで行われていると考えるのは間違いで、細胞培養で得られる細胞は、条件の変化の故、変化しているはずである。しかしながら実験している私たちには顕微鏡で観察する限り細胞には変化が識別出来ない。

熱量計による測定例

細胞を培養し適当な時間毎(12, 24, 48, 72及び96時間)細胞を取り出し遠心し、新鮮な培養液に一定の濃度に懸濁した後、細胞熱量を、測定した。細胞の発生する熱量は測定毎に変化し、また熱発生のパターンにも明かな差が観察された(Fig.1参照)。しかし、この細胞を顕微鏡下観察する限り細胞の変化は全く認められなかった。

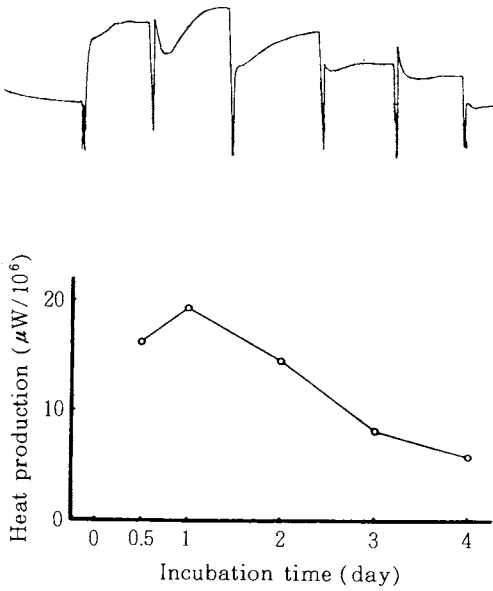


Fig. 1 細胞培養時間と発生する熱の関
細胞培養を開始後12, 24, 48, 72, 及び96時
間後, それぞれ細胞を採取し, 新鮮な培養液
に浮遊し熱量を測定した。上の図はその時
の熱の波形で, 下は発生熱量を図にした。

顕微鏡観察の結果を正しいとして熱の変化を解釈すると, ただ単なる測定の誤差であると結論されてしまう。しかし熱測定結果が正しいとすれば, 細胞の状態に変化があったと結論出来る。すると無理なく実験事実と仮説とが結びつく。このことを一般化すれば, 細胞の培養の経過の中でもし状態変化が起っていれば, 細胞熱変化として結果を得る事が出来る。そしてこの仮説が成り立つとして, 細胞生物学の中で熱量計を考えると, 次の場面で役立つと思う。細胞を集め研究するとき, 今までは細胞の状態を考える場合経験的に処理してきたこと, 例えば元気のいい細胞を得るには頻りに培養液の交換を行う事, 増殖の止まった時期の細胞を利用する事等, に対し, 今後は細胞熱の値を用いて使用する細胞を決定し, 実験することが可能になると考えられる。

この結果からもう一つの仮説をもうけることが出来る。それは細胞培養において任意の時期に細胞を取り出し熱測定を行い, もし常に一定の熱を測定できたとすれば, 回収された細胞は一定の状態の細胞である, というものである。この仮説が正しいことの証明は実験的にはまだ達成されていないが, 少なくとも上記の結果から一般的な培養方法で得られた細胞は一定の状

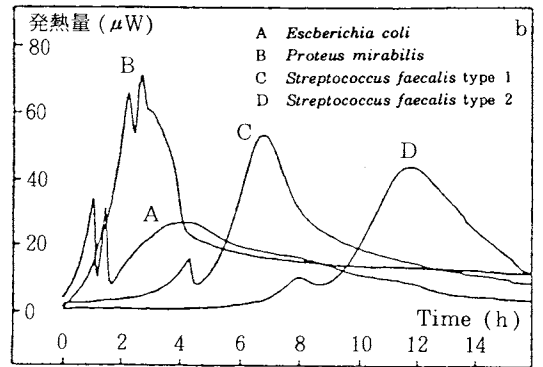
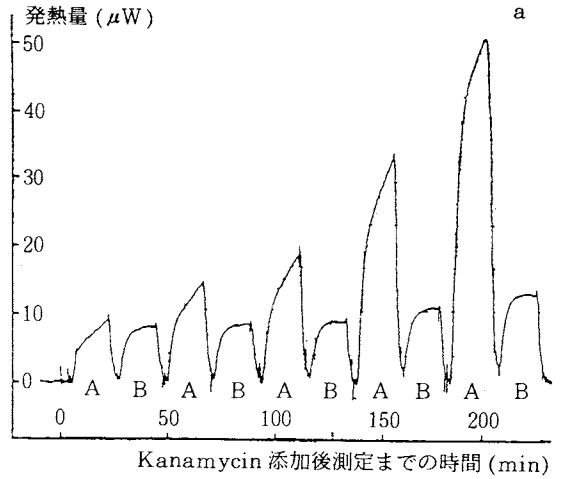


Fig. 2 細菌による発熱

- 細菌の培養を抗生物質 (カナマイシン) 非存在下 (A) 存在下 (B) で行い, 適当な時間毎に培養液を取り出し熱を測定した図である。抗生物質存在下と非存在下には明確な差が観察される。
- 図に示した4種の異なった細菌を熱量計内部で, 培養したときの熱発生パターンでそれぞれ異なっていることが分かる。

態ではないと結論出来る。

最近 LAK 細胞の臨床応用や動物細胞を使った recombinant サイトカイン類を回収するには大量の細胞培養系が必要で, その場合, 一定の機能を持つ細胞集団が常に回収される工夫が必要である。その場合に, 細胞の熱産生を一つの指標とすれば一定の細胞集団が得られると考えられる。

1. 2. 細菌

生きている細菌もまた熱を発生する。細菌に対して

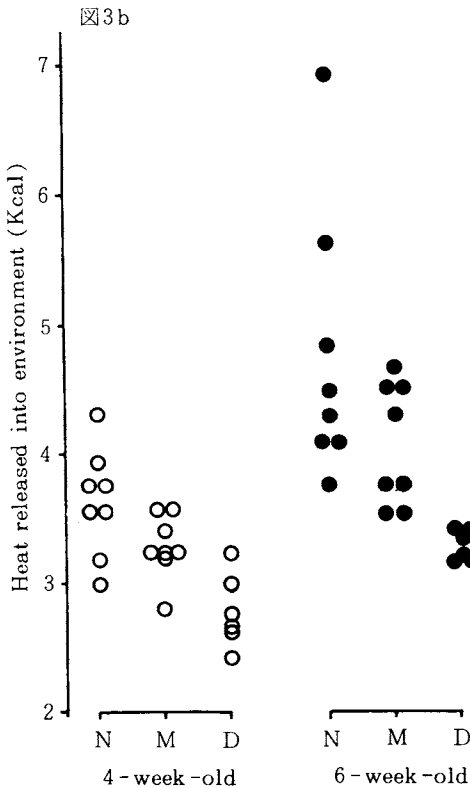
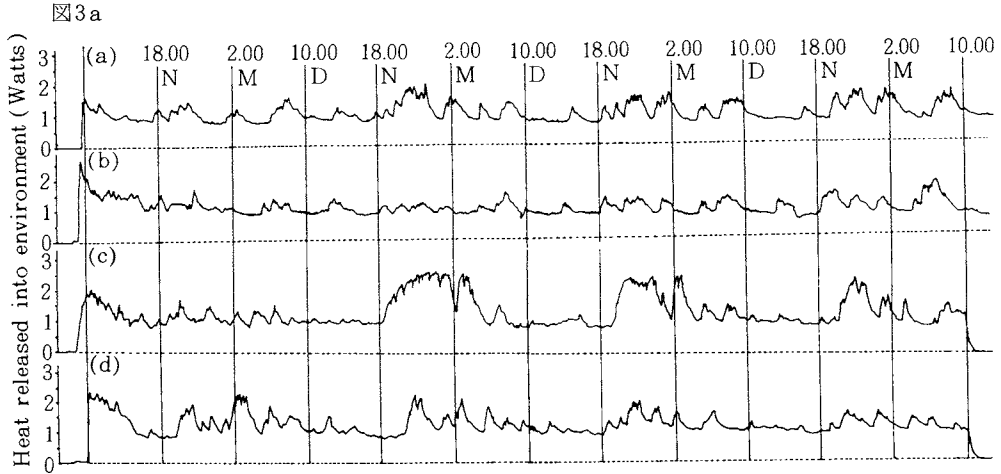


Fig. 3 動物体外に放出される熱量
 a. 4匹のマウスそれぞれが体外に放出する熱量の経時変化を示した図で、(a) (b)は4週齢 (c) (d)は6週齢であった。概して18:00から2:00の間で発熱量が大きく10:00から18:00で少ないことが分かる。
 b. 上記のグラフから8時間毎の熱量をグラフにした図である。

は1975年頃盛んに熱量計が用いられた時代があったが、その後何故か使われなくなってしまった。筆者も測定の容易さからいくつかの実験を行い、いくつか利用可能部分があることを示したが、細菌への応用は深く追求しなかった。しかし細菌食中毒の話題が世間を騒がせることから測定例を Fig. 2 に示し、もう一度熱量計の利用を考えて見たい。

Fig. 2a は抗生物質 (カナマイシン) 存在、非存在下での細菌 (*Proteus mirabilis*) の発生する熱を測定した時のデータである。図から明かな様に細菌の抗生物質存在下では熱の増加が見られないのに対し、非存在下では測定中に熱の増加が観察される。もし抗生物質が効果のないときには非存在の細菌の熱型に準ずるはずである。熱量が充分検出できる細菌数を用いたこの図の様な実験を行えばその判断は60分以内で行われる。

Fig. 2b は4種の異なる細菌の熱型が異なることから細菌を同定する証拠の一つになり得ることを示唆している。細菌学では同定の証拠の一つに糖代謝の違いを用いているが、このことは直ちに熱型の違いを引き起こす根拠になると考えられる。

その他熱発生が認められるにはある細菌数以上でなければならぬことを利用すれば、熱発生が認められるようになる時間を測定することによって、もともと存在した細菌数を予測出来る。したがって、食品等に含まれる細菌数が基準以下であるかどうかを決定することが出来る。

2. 動物

私達の身体は常に熱を作り、一部は体温として、余つ

文 献

た熱は体外へ放出して生命活動をいとなんでいる。変温動物では体内で発生された熱の大部分は体外へ放出され、環境の温度が高いと活動できる体温を維持出来る。一方哺乳動物等の恒温動物では一定の体温を維持できる様に体外への熱の放出がコントロールされている。基礎代謝量が一定であることから、熱産生量は基本的には一定で、その部分のみで体温の維持ができる。通常的生活活動には基礎代謝を越えるエネルギーを必要とし、基礎代謝を越えて熱に変化するエネルギー部分は体外に放出される。したがって体外に放出される熱は、動物の活動状態を反映すると考えられる。動物の全身熱量計は動物から放出する熱量を測定する目的でつくられ、動物の活動状態を測定することが出来る。

Fig. 3a はマウスに対する実際の測定で、4週齢2匹、6週齢2匹の熱発生パターンを示した。Fig. 3b は Fig. 3a で区切られた時間内、即ち夜 (N)、朝 (M) および昼 (D)、での発生熱量を積分した値である。この結果から、マウスの24時間の活動変化が熱量の変化として測定されていることが分かる。

この様に活動状態の変化を熱変化としてとらえられるのであれば、例えば“痛み”が活動状態に影響すると考えられることから、間接的にはあるが“痛み”を測定出来るであろう。また、これからの時代の薬物は、通常な状態には影響をあたえないものであることの証明も必要となるが、その時この熱測定がその証拠を提出出来る。

近年動物実験での危害が問題になりつつあり、そのために生体の非破壊的測定方法が色々開発されつつある。いくつかは非破壊的であっても、対象を固定しなくてはならなかったり、あるいは磁場や放射線を用いて測定しなければならぬ場合がある。しかし、熱測定は放出されてくる熱の測定であるため、動物には処置を加えないし、また測定する為に外からの方法は加えないという利点がある。

熱量計

- 1) C. Spink, I. Wadso, Microcalorimetry. *Method of Biochem. Anal.* **23**, 1-159 (1976).

細胞関係

- 1) M. Yamamura, H. Hayatsu, T. Miyamae, Heat production as a cell cycle monitoring parameter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **140**, 414-418 (1986).
- 2) H. Hayatsu, T. Miyamae, M. Yamamura, Heat production as a quantitative parameter of phagocytosis. *J. Immunol. Methods* **109**, 157-160 (1988).
- 3) Y. Shimoyama, T. Ohkubo, M. Tamura, H. Hayatsu, M. Yamamura, Heat production is a quantitative parameter for intracellular cell function. *Thermochimica acta*, in press.
- 4) 山村雅一, 細胞が発生する熱量による細胞機能の定量. *生体防御* **4**, 102-104 (1987).
- 5) 山村雅一, 細胞の熱発生と細胞機能分析 蛋白質核酸 酵素 **33**, 356-362 (1988).

全身熱量関係

- 1) A. M. Prentice, A. E. Blank, W. A. Coward, H. L. Davies, G. R. Goldberg, P. R. Murgatroyd, J. Ashford, M. Sawyer, R. G. Whitehead, High levels of energy expenditure in obese women. *Brit. Med. J.* **292**, 983-987 (1986).
- 2) A. M. Prentice, W. A. Coward, H. L. Davies, P. R. Murgatroyd, A. E. Black, G. R. Goldberg, J. Ashford, M. Sawyer, Unexpectedly low levels of energy expenditure in healthy women. *Lancet* **i**, 1419-1422 (1985).