

細胞レベルの現象の熱測定：特に微生物細胞に対する薬剤作用の解析を中心に

高橋 克忠*

(平成2年8月17日 受理)

Calorimetry of Cellular Processes : With Special References to Quantitative Evaluation of Drug Action on Microbial Cells.

Katsutada Takahashi

It has been long my view that the biocalorimetry is perhaps most effectively used for the kinetic analysis of microbial cultures. This paper is a review article of the research works conducted mainly in the author's group and deals with our method for the calorimetric characterization of the biological effects of drugs and other chemicals on metabolic activities of living cells. The same principle was also adapted to a quantitative estimation of food putrefaction and of environmental pollution studies. The article also includes a proposal to determine calorimetrically the germination activity of plants seeds with the conclusion that our calorimetric method can be used for the quantitative investigation of the viable activity of various cellular processes.

1. はじめに

細胞の生成を熱化学的な立場で解釈しようという試みは1930年代にわが国の田宮ら¹⁾により世界に先がけて行なわれた有名な実験がある。しかし、今日においてもこの分野の研究は当時と比べてなんら進歩していないに等しい。生体系をこうした解析の対象とするには余りにも複雑すぎる、というのがその大きな理由である。熱化学的立場の測定は勿論現在も一つの流れとして多くの研究者により取り上げられているが²⁻⁴⁾、筆者はそうした方法によって得られる情報の定量性については疑問を抱いており、殆どの場合生化学的意義を持ち合わせていないと観ている。一方、細胞が放出す

る熱はその生理状態をきわめて忠実に反映しているため、これを指標として種々の解析を行なうことが可能である。生物個体とりわけ細胞レベルで熱測定がその有効性を発揮できるのは、熱化学的立場の情報を得るための手段としてではなく、あくまで分析手段としての解析にしか求めることはできないと固く信じている。この小稿はそうした立場から、筆者の研究グループで行なっている研究を中心に、最近のこの分野における方法論の展開を概観したものである。

微生物細胞や生体組織の生物学的活性を代謝熱を観測することによって定量的にみようとする方法は多くの研究者によって行なわれている²⁻⁴⁾。その場合、基礎となるのは細胞や組織の示す熱生成が代謝活性に厳密に対応するということであり、熱量計の出力がそのまま生物活性を表わすとみなしていることが多い。しかしながら、熱量計の経時変化については、それが熱量計の中におかれた細胞の増殖過程を直接表わしているにも拘らず、それを動力学的立場で取り上げようとしている研究者は少ない。

*大阪府立大学 農学部 生物物理化学研究室：堺市 百舌鳥梅町

Laboratory of Biophysical Chemistry, College of Agriculture, University of Osaka Prefecture, Mozu-ume-machi, Sakai, Osaka 591, Japan

筆者はその一人であるが、熱量計を増殖過程の解析、とりわけ増殖速度論的な立場で応用することがもっとも有用であると主張してきた⁵⁻⁷⁾。最近、こうした系への適用を目的とした多試料同時測定が可能なバッチ型熱量計 (multiplex calorimeter) を製作し、これを効果的に使って種々の細胞増殖系での解析をおこなっている。微生物に対する薬剤作用の解析がその例であり、熱量計の出力から適切な数学モデルにもとづいて薬剤作用曲線 (drug potency curve) を描く方法を提案している。また、同じ原理の方法論を食品の腐敗や環境汚染にも適用しており、これらの系での定量的な研究例も併せて紹介したい。

2. 測定の背景

熱量計を用いて微生物の増殖を観る場合、装置の選択がまず第一の課題である。方式からみると、(i)微生物の培養装置を外に置き、ポンプで熱量計に培養液を導きながら測るフロー法と(ii)熱量計セルを培養容器そのものとして用いるバッチ法にわけられる (Fig. 1)。このうち、フロー法で用いる装置としてはスウェーデン・ルンド大の Wadsö が開発した伝導型熱量計 (後に LKB 社より LKB-10700 として販売) が著名であり、一方、バッチ式のものとしてはカルヴェの装置 (Setaram 社) の使用が主流である。最近では LKB 社から分かれてできた ThermoMetric 社が高感度微量熱量計 (商品名 Thermal Activity Monitor) をフローおよびバッチの両方式で使用可能なものとして販売している。日本では電子科学(株)がフロー方式のも

のを製作しているが、ヒトおよび哺乳動物の培養細胞を対象としており、微生物細胞に対する応用例は報告されていない。筆者のところへ寄せられる便り等から判断してこうした分野に関心を持つ研究者の数は結構いるとみられるが、系統的に実験に取り組んでいるのは Wadsö のグループならびに英国 ロンドン 大の Beezer のグループあるいは西ドイツの Lamprecht のグループ等に限定されている。しかし、1991年カリフォルニアで開かれる熱測定会議では、細胞レベルのセッションが組まれていて、この分野の一層の展開が期待される。

さてフローであるかバッチであるか、これはどちらにもその利点があり、一概にどちらが良いとは言えない。さらに、どのグループの結果も似たようなレベルにあり、しかも1960年のそれと比べて進歩は何もない。これは言い過ぎとみる読者もいるかもしれないが、少なくとも筆者にとってはこれまでのものを越える有益と思われる報文には遭遇していないのは事実である。これは一つには現象として観測される熱量計シグナルの理論的背景ならびにその微生物増殖との定量的関係の把握が十分になされていないためである。筆者らのグループはこの点に着目し、実際の微生物細胞の培養系で測定を行なう一方、熱伝導理論も含め細胞増殖に伴う熱生成の過程を理論的に整理して、増殖サーモグラムのシミュレーションと増殖速度パラメーターの数値解析による決定を行なってきた^{8,9)}。これは増殖サーモグラムを定量的に解析する範囲を飛躍的に拡大するものである。またこれと関連して測定解析をシステム化するために多試料同時測定の可能な熱量計を開発した¹⁰⁾。

3. 装置と方法

筆者らは従来から六点式熱量計を製作し使用しているが¹⁰⁾、最近はさらに同じ伝導型原理で作動する24点式熱量計を開発し使用している。これは基本的には先の六点式と同じで、大きさが350×700×120mmのアルミニウム製のヒートシンク中に一つの比較ユニットと24個の試料ユニットが設置された計25個の熱測定ユニット (calorimetric unit) で構成されている。熱の検出は半導体熱電対素子 (サーモモジュール) によっており、比較ユニットからの出力との差を示差的に取り出して、マルチプレクサー機能を有するインターフェースを通してマイクロコンピューターでフロッピーディスクに貯えるようになっている。

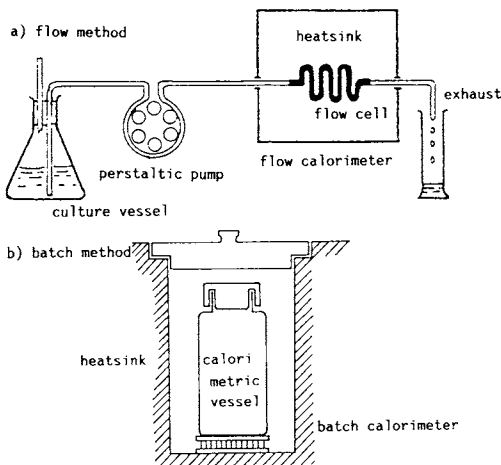


Fig. 1 Calorimeter structures.

いま微生物細胞の培養中に観測される見掛けの熱量計出力を $g(t)$ とする。この出力は実際には試料のヒートシンクに対する温度差であり、その熱伝導に関しては Newton の熱伝導則が成り立つとみなされるので、熱量計ユニットの熱伝導定数 (Newton の冷却定数) を K とすると、熱伝導損失を補正した時の熱量計出力 $f(t)$ は次のように与えられる¹¹⁾。

$$f(t) = g(t) + K \int g(t) dt \quad (1)$$

この $f(t)$ は系を仮想的な断熱状態に置いた時に観測されるであろう試料とヒートシンクとの間の温度差でもある。したがって、試料の熱容量に大きな変化が無い限り、この $f(t)$ は試料系が生成する熱量の経時変化に対応することになる。

この二つの量、 $f(t)$ と $g(t)$ の関係を電気的な加熱曲線について示したのが Fig. 2 である。熱量計セルに設置されたヒーターに一定電位をかける。熱量計出力 $g(t)$ は典型的な飽和曲線を与える。すなわち、初めは直線的に上昇するが、やがて熱伝導による効果のためその傾斜は緩やかになり、ついに飽和値に達する。この飽和値はヒーター出力と伝導による熱の逃げ速度が釣り合ったところであり、その値は測定が理想的な伝導型原理で行なわれている時の較正值を与える。一方、この $g(t)$ をもとに (1) 式を用いてもとめた $f(t)$ 曲線はヒーター電位を on にすると一定の勾配で上昇し、ついで off にすると一定値にとどまる。厳密に言えば、

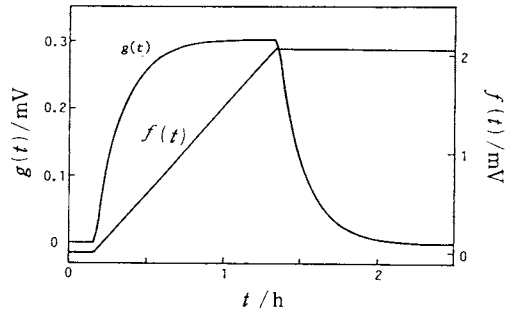


Fig. 2 Electrical calibration mark $g(t)$ and its conversion to $f(t)$ curve.

ヒーターを on あるいは off した直後は熱量計の中の温度分布が一時的に非定常状態になるため、 $f(t)$ のトレースは on および off のところで緩やかな曲線になるが、細胞増殖の時定数 (通常 0.5~5 h) が装置の時定数 (通常 5~10 min) に比べて十分に長く、電気的な較正も定常状態にある期間を十分長く行って行なうため、このことは問題にならない。勿論、装置定数である K の値は正確に求めなければならないが、その方法については既報を参照されたい¹¹⁾。 $f(t)$ の勾配は言うまでもなく熱量計ユニットの較正值であり、ユニットが仮想的な断熱状態に置かれたとき、一定の熱生成がどれだけの熱量計出力に対応するかを与える。なお、装置の時定数に関して Table 1 の関係を理解しておくことはこの方法をいろいろな系に応用する場合に重要である。Fig. 2 においてヒーター

Table 1 Relationship between instrumental constant and its mode of operation.

装置定数 K	数学的表現	測定原理	特徴
∞	$\frac{dg(t)}{dt} \Rightarrow 0$	理想的伝導型	熱量計シグナルは真の熱生成速度 (thermogenesis) を与える。
大	$\frac{dg(t)}{dt} \ll Kg(t)$	伝導型	伝導による熱の逃げ速度が熱量計セルの中の熱生成速度に比べ十分速い。
中	$\frac{dg(t)}{dt} \approx Kg(t)$	恒温壁型	伝導による熱の逃げ速度が熱量計セルの中の熱生成速度と同程度の速さ。 Dewar びんを熱量計セルとする熱量計で数分で起こる熱変化を計測する時などがこれに当たる。
小	$\frac{dg(t)}{dt} \gg Kg(t) \Rightarrow 0$	断熱型	熱量計セルが断熱制御されていて、熱の逃げが無視できる。

但し、 $\frac{dg(t)}{dt}$ は熱量計セルの中のみかけの熱変化速度、 $Kg(t)$ は熱の逃げの速度に対応する

の加熱曲線の変換値 $f(t)$ が直線を与えることは、適切な条件のもとでは熱生成の経時変化が(1)式という簡単な熱伝導の式で処理されてよいことを示している。

次に微生物の実際の培養における測定例を挙げる。Fig. 3の $g(t)$ はコウジカビ (*Aspergillus oryzae*) を固体培地であるフスマ上で培養した時に観測される熱量計出力である。微生物培養系でこのような記録を増殖サーモグラム (growth thermogram)* と呼ぶ。この場合には培養セルは気密性のキャップでシールしてあるので、気相中の酸素を消費しつくすとシグナルはベースラインに戻っていく。これを(1)式により仮想的な断熱状態における熱変化曲線に変換したものが Fig. 3の $f(t)$ である。特に増殖の初期段階で対数増殖期にあるようすが伺える。サーモグラムがほぼベースラインに戻った後も緩やかな熱生成がみられるのは酸素が殆ど無い条件でも代謝活動によるわずかな発熱が続いていることを示している。

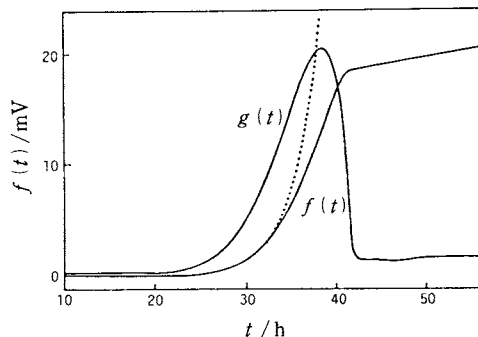


Fig. 3 Growth thermogram $g(t)$ observed for the growth of *Asp. oryzae* grown at 30°C on bran and its conversion to $f(t)$ curve. The dotted curve is the one fitted on eq. (2)

4. 増殖速度定数の決定

筆者らは対数増殖期にある微生物増殖の熱生成は次のような簡単な指数関数で表わされることを示した¹²⁾。

$$f(t) = AN_0 \exp(\mu t) + BN_0 \quad (2)$$

ここで、 N_0 は培養時間 $t = 0$ における微生物数 N 即ち培養の初菌数であり、 A, B は定数である。また μ は

$$\mu = \frac{1}{N} \frac{dN}{dt} \quad (3)$$

で定義される増殖速度定数すなわち単位細胞当りの平均増殖速度である。この場合、 N というのは概念的には細胞の数であるが、より一般化するためにこれを増殖の単位となる細胞の量たとえば細胞重量のようなものと考えればよい。

(1)式により実験的に導かれた $f(t)$ 曲線に対し、(2)式をあてはめ、パラメータ最適化法で μ を決定する。Fig. 3の点線は最適化により得られた回帰曲線であり、この場合には $\mu = 5.32 \times 10^{-3} \text{min}^{-1}$ と決定された。ここで培養32時間目位から回帰曲線と $f(t)$ 曲線との間に背離がみられるのは(2)式の指数関数で近似できる範囲が限られていることを示している。サーモグラムがピークを迎えるまでもなく、このように理論曲線からのずれが見られるのは増殖を律速している栄養源の濃度が徐々に下がり、増殖速度が低下していることを反映しているにほかならない。

なお、このようにして微生物培養系で得られた $f(t)$ 曲線は一般に増殖曲線のある範囲で忠実にあらわしている。上のコウジカビの実験の例では、菌糸体の伸長とサーモグラムの変化が良く対応していることが顕微

*増殖サーモグラム：この用語についてはIUPAC-IUPAB-IUBの生物熱力学合同委員会の勧告 (*Pure & Applied Chemistry*, 54, 671-679 (1982)) に含まれるものとして、“power-time-curve”なる用語が一般に使われている。たしかに時定数の非常に短い熱量計で熱生成の過程を観測した場合、熱量計の出力はpower (=watt) で表わされる熱生成速度(thermogenesis)に近いものとなる。けれども、どんな熱量計であっても観測するのは試料の温度と熱量計の基準温度との間の温度差であって、決してpower dq/dt ではない。熱量計シグナルがpowerと等しくなるのは熱量計の時定数が実際上0であるような特殊な場合に限られるのである。たとえば、等温壁熱量計(isoperibol calorimeter)や断熱型熱量計(adiabatic calorimeter)を使用する場合のことを考えると明らかであろう。もう少し厳密に言うと、熱量計のシグナルは熱伝導損失を補正して後、試料系の熱容量をかけることにより初めて熱量の単位(J=Joule)となり、さらにそれを時間(s)に関して微分することによりpowerの単位(watt=J/s)となるのである。言い換えれば、熱量計シグナルを単純に積分しても真の熱生成の経時変化を与えない。このことから、筆者らは“power-time-curve”という用語は誤解を招きやすいとして、その使用に反対しており^{7,19)}、微生物増殖系で観測されるものについては増殖サーモグラムと呼ぶことにしている。

鏡観察によりわかる。

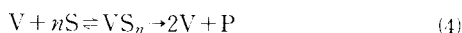
5. 薬剤作用の測定

Fig. 4の(a)は大腸菌 (*Escherichia coli*) をブイオン培地 (液体) で静置培養したときの増殖サーモグラムである。培地には薬剤ノビオシン (抗生物質の一種) が濃度を変えて添加してある。薬剤の濃度が増加するに従い、増殖サーモグラムのピークが培養の長時間側にずれ、また立ち上がりの勾配も小さくなっている様子が見られる。これは薬剤による増殖の抑制作用によることは言うまでもない。このことは(1)式を用いて $f(t)$ 曲線に変換することによりより明確になる (Fig. 4の(b))。

同様な例を薬剤 p -ヒドロキシ安息香酸存在下でのコウジカビのフスマ培養において観測したのが Fig. 5である¹³⁾。この場合、簡略にするため、 p -ヒドロキシ安息香酸 (PHBA) の濃度が六種類 (0 ~ 0.3M) のものを抜き出して描いてある。増殖サーモグラム $g(t)$ ならびに $f(t)$ 曲線共に、薬剤の増殖抑制をよくあらわしている。なお、フスマのような不均一な固体状態の培地で微生物の増殖を連続的に計測する方法はここに述べる熱生成を指標とする方法以外にはありえない。

6. 薬剤の増殖抑制効果の解析

微生物細胞と薬剤の結合過程を含む次のような増殖スキームを想定する¹⁴⁾。



ここで微生物の単位生体 V (酵母のように数えることのできる細胞とは限らないので、ここでは(3)式の N の代わりに V を用いている) が増殖を制限する栄養源 (基質) S を n モル取り込んで複合体 VS_n になるとともに、新しい生体 V をある種の副生成物 P とともに生成する。さらに、生体 V もしくは VS_n は薬剤 I を m モル可逆的に取り込んで、新しい細胞を複製し得ない状態 VI_m もしくは VS_nI_m に変化するとする。この時、基質 S と生体との親和性を表わす指標として次式に示す基質定数を定義する。

$$K_s = \frac{[V][S]^n}{[VS_n]} \quad (7)$$

一方、薬剤についてもそれと生体との複合体の解離定数を次のとおり定義する。

$$\begin{aligned} K_d &= \frac{[V][I]^m}{[VI_m]} \\ &= \frac{[VS_n][I]^m}{[VS_nI_m]} \end{aligned} \quad (8)$$

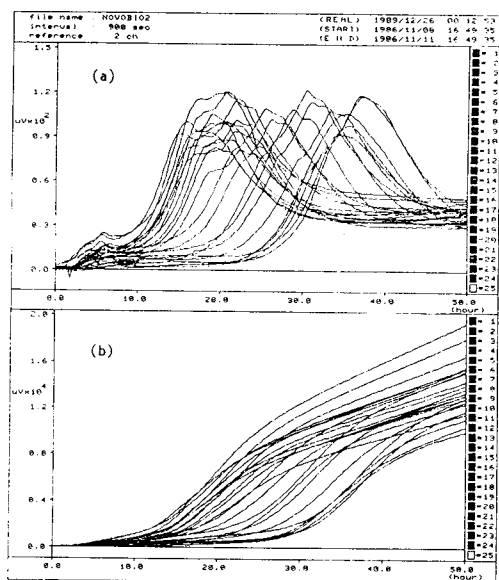


Fig. 4 (a) Growth thermograms of *E. coli* grown at 30°C on bouillon medium containing novobiocin at various concentrations and (b) the corresponding $f(t)$ curves computed according to the method described in the text.

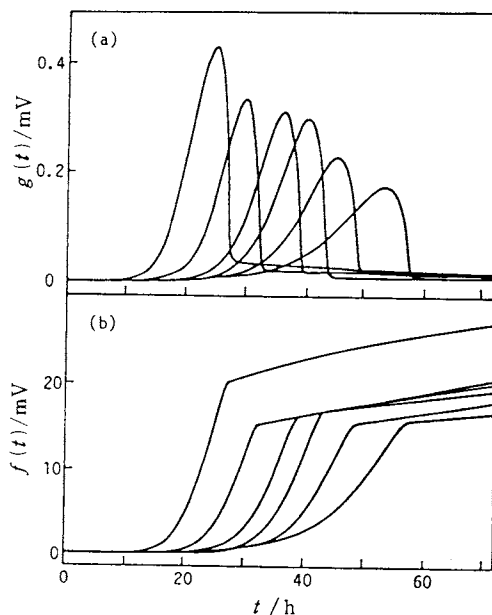


Fig. 5 (a) Growth thermograms of *Asp. oryzae* grown at 30°C on bran containing p -hydroxybenzoic acid at various concentrations and (b) the corresponding $f(t)$ curves.

細胞の増殖速度定数は(3)式と同様、次のように細胞当りの平均増殖速度

$$\mu = \frac{1}{V} \frac{dV}{dt} \quad (9)$$

として定義されるものであり、この関係ならびに(7)、(8)式を用いて、薬剤濃度 i ($= [I]$) における増殖速度定数 μ_i を導くと次のようになる。

$$\mu_i = \mu_m / (1 + i^m / K_d) (1 + K_s / S^n) \quad (10)$$

ここで μ_m は薬剤が存在せず、基質が十分過剰に存在する時の増殖速度定数すなわち“最大増殖速度定数、maximum growth rate constant”である。(S = [S])

実際の測定では基質濃度が基質定数に比べ十分に高い条件でおこなうことになるので、次の近似が成り立つ。

$$K_s \ll S^n \quad (11)$$

したがって、(10)式は次式のようになる。

$$\mu_i = \mu_m / (1 + i^m / K_d) \quad (12)$$

すなわち、実測値を(12)式にあてはめ、パラメータ最適化法 (parameter fitting) または回帰分析 (regression analysis) により、 K_d および m 値を決定することができる。

また、このようにして得られた K_d および m 値を用い、 μ_i / μ_m を i に対してプロットすることにより薬剤作用曲線 (drug potency curve) を描くことができる。

Fig. 6 はこのような原理に従い、Fig. 5 に示す実験データをもとに描いた PHBA の *Asp. oryzae* の増殖に対する薬剤作用曲線である。○印は実験値であり、実線は回帰曲線を表わしている¹³⁾。

同様な実験を種々な薬剤を用いて行なった実験結果をもとに描いた薬剤作用曲線を Fig. 7 に示してある。この場合、各薬剤の作用濃度範囲が明確に比較できるよう横軸の薬剤の濃度は対数目盛りで表示してある。

(12)式から明らかなように $K_i = m \sqrt[m]{K_d}$ で表わされる定数 K_i は微生物細胞の増殖活性を50%に抑制するに要する薬剤濃度を表わしており、一方、 m 値はその薬剤の作用の協同効果を反映している。したがって、スキーム(4)~(6)で薬剤作用が説明できる限り、ここで定義されたパラメータ K_i および m は薬剤作用を定量的に表わす指標として有用である。

大腸菌の増殖に対する三種の抗生物質 (a) ストレプトマイシン、(b) テトラサイクリンおよび (c) クロラムフェニコールの作用曲線を熱測定法で描いたものを Fig. 8 に示す¹⁴⁾。また、これらの薬剤作用曲線を特徴付ける K_i および m の値を先のコウジカビに対する

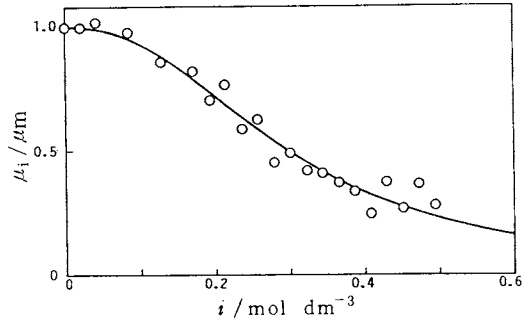


Fig. 6 Drug potency curve drawn for the actions of *p*-hydroxybenzoic acid on *Asp. oryzae* growth. The open circles denote the experimental data. The curve was drawn by regression analysis on the basis of eq. (12).

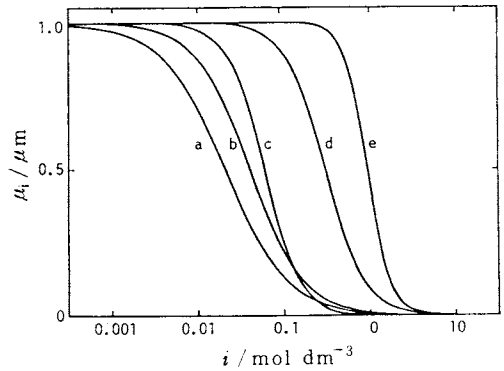


Fig. 7 Drug potency curves for the action of various food preservatives on *Asp. oryzae* drawn calorimetrically. Drugs are ; (a) potassium sorbate, (b) calcium propionate, (c) sodium benzoate, (d) *p*-hydroxybenzoic acid and (e) ethyl alcohol.

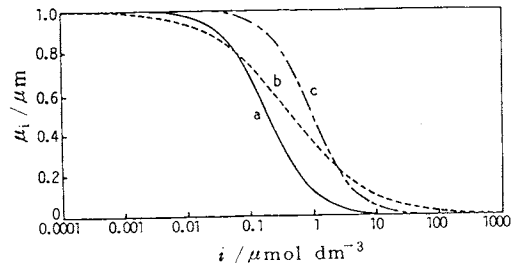


Fig. 8 Drug potency curves for the action of (a) streptomycin, (b) tetracycline and (c) chloramphenicol on *E. coli* growth drawn calorimetrically.

Table 2 Inhibitory parameters of some drugs on the growth activity of microbes as measured by the calorimetric method.

Drugs	Microbes	m molecule cell ⁻¹	K_d (mol dm ⁻³) ^m	K_i mol dm ⁻³
Ethylalcohol	<i>Asp. oryzae</i>	3.3	0.815	0.94
<i>p</i> -Hydroxy benzoicacid	<i>Asp. oryzae</i>	1.9	0.102	0.300
sodium benzoicacid	<i>Asp. oryzae</i>	2.1	0.00278	0.0607
calcium pncpiomate	<i>Asp. oryzae</i>	1.4	0.0113	0.0408
Potassium sorbate	<i>Asp. oryzae</i>	1.2	0.00964	0.0209
streptomycin	<i>E. cole</i>	1.2	8.69×10^{-9}	0.19×10^{-6}
tetracycline	<i>E. cole</i>	0.7	3.49×10^{-5}	0.43×10^{-6}
chloramphenicol	<i>E. cole</i>	1.3	1.46×10^{-8}	0.94×10^{-6}

薬剤の作用のものと併せて Table 2 に示す⁷⁾。

抗生物質やその他の薬剤の微生物細胞に対する作用は最低生育阻止濃度 (MIC ; minimum inhibitory concentration) のような静的な量で表わされるのが一般的である。ここに示した方法は作用濃度範囲を明確に示すより定量的な立場の方法であり、従来の方法に比べてその有用性は高いというのが筆者らの主張である。

なお、ここに示した解析はスキーム(4)~(6)にもとづくものである。実際の現象はこのような単純な様式で表わされるものでないことは当然予想され、したがって、パラメータとしての K_i , m などの生物学的意味も明確なものでない。しかし、これらをもとに描いた薬剤作用曲線はモデルスキームの当否はともかくとして、実験値に best-fit するように決められたものであり、その意味でこうした方法で描いた drug potency curve は十分な意義があることを強調しておきたい。

ところで、抗生物質のうちで、ペニシリン、アンピシリン、ポリミキシンなどのように細胞の膜系に作用する薬剤の場合はスキーム(4)~(6)で示すような薬剤の可逆的結合を特徴とするモデルでは現象を説明できない。その場合の解析結果については文献(5)を参照されたい。

7. 食品の腐敗と微生物汚染

さて、熱測定法の大きな特徴の一つは試料の形状を問わないことである。すなわち、液体や固体が混在する不均一な試料であっても区別なく測定の対象とすることが可能である。

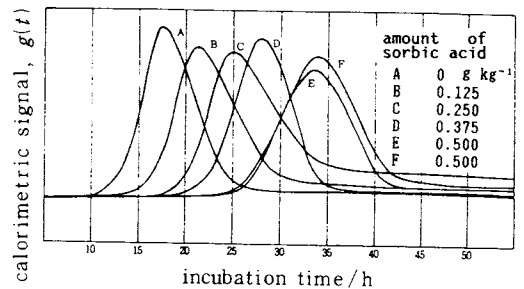


Fig. 9 Putrefaction thermograms of sausage. The each samples contain different amounts of sorbic acid as a preservative.

次にこの方法を食品そのものを対象に應用した例を紹介する。Fig. 9 はソーセージを熱量計セルの中におき、その腐敗過程を観測したものである。腐敗とは食品素材中における微生物の増殖とそれに伴う品質の変化にはかならない。図中のソーセージには防腐剤ソルビン酸が量を変えて添加してある。ソルビン酸の濃度が高くなるに従い、腐敗サーモグラムの遅れが大きくなり、腐敗が抑制されている様子を見ることができ。こうした事例は前述と同じ立場の方法論を採用することにより、特定の薬剤の特定の食品に対する作用を定量的に把握する手段として熱測定を有効に利用することが可能であることを示している。

食品の腐敗は公衆衛生上もっとも身近で重要な問題である。食品衛生の立場からすると市場にでている食品の微生物汚染度を精度よく知る必要がある。読者は腐敗菌が多く付着しているもの程腐敗しやすく、したがって、腐敗サーモグラムが早く現われることを直観

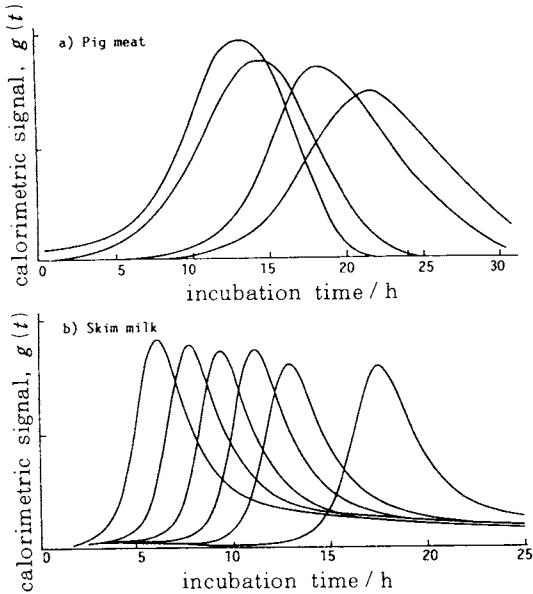


Fig. 10 Putrefaction thermograms of (a) pig meat and (b) skim milk. The thermograms shift toward shorter incubation periods as the extent of microbial contamination becomes large.

的に理解されるであろう。筆者らはすでに微生物培養系において初菌量と増殖サーモグラムの遅れの間を定量的に示した¹²⁾。佐藤らはこうした関係を実際の食品に適用して、微生物の汚染度を定量化することを試みている。Fig. 10は微生物汚染度の異なる市販ブタ肉の腐敗サーモグラムおよびスキムミルク溶液中における乳酸菌の増殖サーモグラムを示している。食品衛生学における一般的方法である寒天培地平板培養法を用い、各試料の汚染菌数を実測するとともに、各試料が示す腐敗サーモグラムの時間的なずれを比較した結果、それらの間に良好な相関があることを見出した¹⁶⁾。このことから熱測定法が食品の微生物汚染度を計測する手段として有効に利用できることを報告している。

8. その他の生物学的研究法

細胞レベルでの熱測定法の利用として今後の可能性を示す他の実験例を以下に示す。Fig. 11は担子菌レイシ(サルノコシカケ属)の菌糸体生育の増殖サーモグラムである¹⁷⁾。これは本来、種菌培養の最適条件を探索する目的でおこなわれた実験であるが、周期的な振動現象が現われていることに注目して頂きたい。生物のような複合反応系で、なおかつ熱力学的に非平衡な状

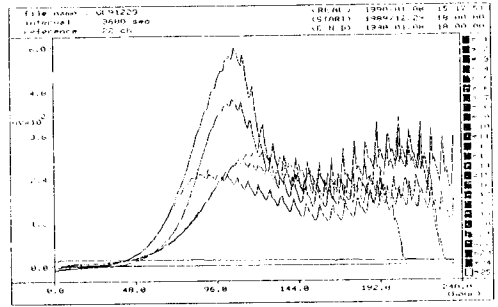


Fig. 11 Growth thermograms observed for the growth of Reishi (*Ganoderma lucidum* Karst.) grown on wood powder at 30°C.

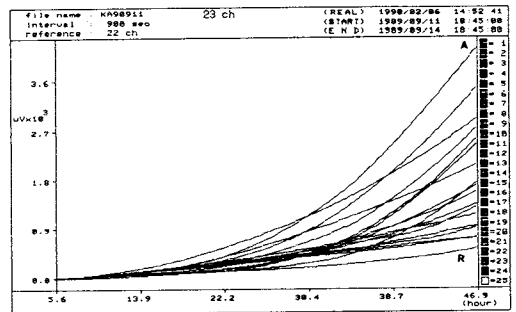


Fig. 12 Heat evolution process during germination of radish seeds, *Raphanus sativus*, cultured on agar at 30°C. The curves were obtained from germination thermograms according to the method described in the test on the basis of eq. (1).

態にある系では周期的な振動現象が現われることがしばしばある。Fig. 11はレイシの菌糸体生育に伴う振動現象が熱生成の立場で観測されたものであり、このような方法が基礎生物学的立場の興味から採り上げられてもよいのではと考えている。

また、Fig. 12は植物種子の発芽に伴う熱生成を観測したものである¹⁸⁾。ダイコン種子(*Paphanus sativus*)1粒を熱量計セルの中の寒天上に置き、発芽サーモグラムを記録して、これを $f(t)$ 変換して発芽過程の熱生成を追っている。植物個体としての種子の活性にはかなりの個体差があるが、発芽に伴う重量の増加や芽や根の長さの計測値と $f(t)$ の間には良い相関が成り立つので、発芽活性を熱測定で観るのは今後植物生理学の立場でも有効な手段となることが期待されるであろう。

9. 環境問題への応用

最後に環境問題と関連した応用例として土壌における有機物の微生物による被分解活性を熱測定を通してみる方法について紹介する。土壌は不均一系であるが、それと同時に生態系として地球上における物質循環の重要な一部を担っている。グルコースを窒素源としての硫酸とともに土壌中に添加すると微生物による分解を受けてその時に熱を生成する。適切な条件のもとではグルコースの分解サーモグラムが土壌中の微生物活性の変化とよく対応することがすでに明らかであり¹⁹⁾、このことを利用して染汚物質として6価クロムを種々の濃度で含むモデル汚染土壌を調製し、その中にグルコースを添加したときにみられる分解サーモグラムを示したのが Fig. 13 である。6価クロムは3価クロムに比べて生体に対する毒性が強いことが知られているが、その濃度によっても著しく分解サーモグラムの形状に変化がみられることも明らかである。この結果を先の方法と同様の取り扱いをして、6価クロム濃度とグルコースの微生物分解活性の関係をプロットしたものが Fig. 14 である。比較のため生体に対する毒性がより低い3価クロムについての結果も併せて示してある。実線は(12)式にもとづいて描いた最適化曲線である。分析化学的な立場の定量法は最近非常に進歩しており、たとえばピコモル、フェムトモルなどという微量まで精度良く検出することが可能になっている。しかし、汚染物質の濃度がいくら感度良く検出できたとしても、その生態系への影響の定量的評価が欠けているのでは片手落ちと言わざるを得ない。実際、適切な評価法がないのが現状であり、そうした立場から筆者らはこの熱測定法が環境汚染の生態学的評価の一手段として位置付けられることを期待している^{19,20)}。

10. おわりに

細胞レベルでの現象で熱測定を行なう場合、いろいろな応用が考えられることを述べてきた。熱測定が厳密な物性値としての熱力学量の測定手段であることを考えると、このような応用ばかりを採り上げることは、科学的な位置付けから離れているようにみられるかもしれない。しかし、始めにも述べたように細胞や生物個体に含まれる現象は余りにも複雑過ぎて熱化学的立場、熱力学的立場で熱測定を行なおうとすると、却って遠回りしてしまう恐れがある。むしろ、現在は応用

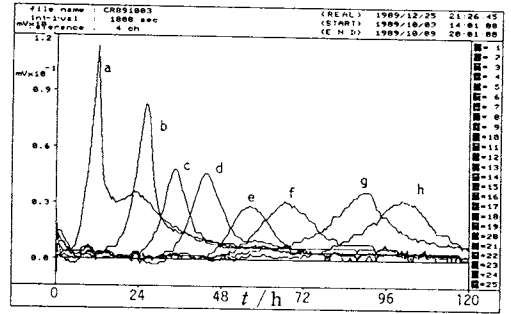


Fig. 13 Microbial degradation thermograms of glucose in soil containing various amounts of chromium at 30°C. Chromium concentrations/ppm are; (a) 0, (b) 25, (c) 50, (d) 75, (e) 100, (f) 125, (g) 150 and (h) 200.

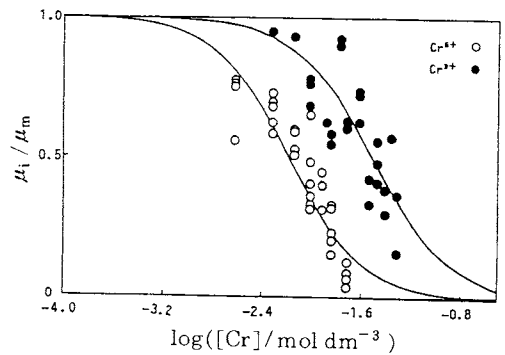


Fig. 14 The effect of chromium concentration on microbial degradation of glucose in soil at 30°C.

の展開を図ることで、その結果が正のフィードバックを生み、将来基礎的な面での発展につながることを期待したい、というのが筆者の立場である。

文 献

- 1) H. Tamiya, A. Yamamoto, *Acta Phytochimica* 7, 245 (1933); A. Yamamoto and S. Yamagata, *Acta Phytochimica* 8, 245 (1935).
- 2) A. E. Beezer, T. Fujita, K. Nunomura, R. Brettel, B. Schaarschmidt, A. I. Zotin, I. Lamprecht, P. Monk, W. Forrest, I. Wadsö, *Microbiological calorimetry*, in: I. Lamprecht and B. Schaarschmidt (Eds.), *Application of Calorimetry in Life Sciences*, Walter de Gruyter, Berlin, 1977, p. 107.
- 3) J. P. Belaich, *Growth, metabolism in bacteria*,

- in : A. E. Beezer (Ed.), *Biological Microcalorimetry*, Academic Press, New York, 1980, p. 1.
- 4) I. Lamprecht, Growth, metabolism in yeast, in : A. E. Beezer (Ed.), *Biological Microcalorimetry*, Academic Press, New York, 1980, p. 43.
 - 5) K. Takahashi, Abstracts of Papers, International Meeting of Microcalorimetry in Biology and Clinical Medicine, Tokai Conference, Tokyo, Japan, p. 6 (1989).
 - 6) 高橋克忠, 第25回熱測定討論会ミニシンポジウム「生物系のカロリメトリー」要旨集, p. 12 (1989).
 - 7) K. Takahashi, *Thermochim. Acta* **163**, 71 (1990).
 - 8) H. Yamano, K. Takahashi, *Agric. Biol. Chem.* **50**, 3145 (1986).
 - 9) H. Yamano, K. Takahashi, *Agric. Biol. Chem.* **50**, 3157 (1986).
 - 10) T. Kawabata, H. Yamano, K. Takahashi, *Agric. Biol. Chem.* **47**, 1281 (1983).
 - 11) 高橋克忠, 微量熱測定法, 生化学実験講座 第12巻 p. 19 (日本生化学会編) (1976).
 - 12) M. Hashimoto, K. Takahashi, *Agric. Biol. Chem.* **46**, 1559 (1982).
 - 13) M. Mitani, K. Takahashi, in preparation.
 - 14) A. Katarao, T. Mune, K. Takahashi, *Agric. Biol. Chem.* **51**, 2443 (1987).
 - 15) A. Katarao, H. Okuno, K. Takahashi, *Agric. Biol. Chem.* **52**, 2279 (1988).
 - 16) 佐藤善博, 金子精一, 森 實, 獣医畜産新報 **43**, 768 (1990).
 - 17) S. Kosugi, K. Takahashi, in preparation.
 - 18) K. Takahashi, *Tokai J. Exp. & Clin. Med.* **15**, No. 5, (1990) in press.
 - 19) T. Kimura, K. Takahashi, *J. Gen. Microbiol. (London)* **131**, 3083 (1985).
 - 20) T. Kimura, R. Kaneda, K. Takahashi, Abstracts of papers presented at the 6th International Congress on Soil Science, Kyoto 1990.

第10回熱測定ワークショップ資料

第10回熱測定ワークショップ「ITS-90と熱測定」は、1990年11月30日東京工業大学100年記念館において会員・非会員あわせて50名の参加を得て開催されました。当日参加者に配布された資料の残部がありますので、ご希望の方は学会事務局までお問い合わせ下さい。なおこのワークショップの報告につきましては、本誌「熱測定」Vol.18, No.2に掲載される予定です。