

熱量計を完全に使い切るために



技術解説

長 野 八 久*

Fundamental Knowledge and Techniques for Perfect Utilization
of Your Calorimeters

Key Words : High-precision Calorimetry, Biological Calorimetry, Chemical Thermodynamics

はじめに

自然は冷酷である。誰しも「あの時、あの一言を言っておれば、自分の人生は全く違っていただろうに」と思い当たることがあるだろう。あるいは、あの東日本大震災で東京電力福島第一原子力発電所が取り返しのつかない大事故を起こしてしまったとき、誰もが時計の針を震災前まで巻き戻したいと心の底から思ったに違いない。しかし、自然は決して、私たちの身勝手な願望を叶えてはくれない。なぜなら、時間は不可逆だからである。宇宙が始まって以来、時間は途切れることなく、不可逆に進行している。時間が不可逆なのは、宇宙のあらゆる事象の発展が根源的に熱力学第2法則（エントロピー増大則）に従っているからである。即ち、熱力学こそが宇宙の真の支配者であると言ってよい。

もちろん物質科学、生命科学も例外ではない。与えられた系が安定に存在しうるのは、あるいはどのように発展してゆくのかについて、最終決定権を閻魔大王のごとく握っているのは化学熱力学である。1979年、大阪大学理学部に附属化学熱学実験施設（現在の熱・エントロピー科学研究センター）が創設された。その後10年ごとに改組されながら今日まで化学熱力学の世界センターとして、活動が続いている¹⁾。同センターの最大の特徴であり、世界的な優位を保持しているのは、熱力学において最も基

本的な熱力学量の測定技術を、独自に開発・精密化してきたことである。これを成し得てきたのは、大阪大学が学内施設として育ててきた工作センター（現在の科学機器リノベーション・工作支援センター）の存在によるところが大きいことも指摘しておかねばならない。

熱力学は発展途上の学問である。平衡熱力学はおよそ100年前にほぼ完成されたが、私たちの目の前の現実世界が展開している非平衡非線形領域の熱力学は未完成であり、その基本法則についても、未だ科学研究者の共通理解からはほど遠い。生物はそのような非線形領域非平衡系の代表であり、非平衡熱力学の対象として、最高に魅力的な研究対象である。筆者は最近、所属する同センターで蓄積されてきた熱測定技術をベースに、精密生物熱測定の開発を進め、生物熱力学にとって基本的な、いくつかの興味深い結果を得つつある²⁾。

しかし、筆者は本誌の性格と与えられた「技術解説」という論題に沿うべく、生物熱力学からの論考は別の機会に紹介することにして、本稿ではむしろ、精密生物熱測定を達成する上で鍵となった基本的な技術と工夫のいくつかを解説することにした。それらが多くの研究現場で利用されている熱測定にも応用され、測定精度の向上に役立ってくれば嬉しい。



* Yatsuhisa NAGANO

1957年2月生まれ
大阪大学大学院 理学研究科無機および
物理化学専攻博士後期課程（1985年）
現在、大阪大学大学院 理学研究科附属
熱・エントロピー科学研究センター
講師 理学博士 専門／生物熱力学
TEL : 06-6850-5525
E-mail : nagano@chem.sci.osaka-u.ac.jp

熱測定の基本戦略と熱量計の選択

熱測定は、試料で発生した熱、あるいは試料が周辺から吸収した熱を時間の関数として、エネルギーの尺度で定量しようとする。熱力学は原理的に作業物質によらないので、熱測定も対象を選ばない。試料からの熱の出入りを測定するだけなので、試料系を全く擾乱することなく、完全非破壊分析が可能という利点がある。また、様々な測定技術の中でも、

精度・確度が高い特徴がある。

試料容器と周辺の温度制御の仕方、熱量を測定するために試料から周辺への熱流を測るのか、あるいは試料と周辺の温度差を測るのかなどによって、測定装置が分類される³⁾。

1) 等温型熱量計 (isothermal calorimeter) : 試料周辺温度を一定に保ち、試料の温度を周辺温度に従属的に一致させる熱量計である。18世紀末にラボアジェとラプラスが開発した水熱量計は、これに当たる。1気圧で液体の水と平衡にある水の温度は0℃なので、水を詰め込んだ容器の中に試料容器を差し込んでおくだけで、試料の温度は0℃に保たれる。この場合に温度制御のための特別な装置が必要ないことが利点である。全体を外界から十分に断熱にしておけば、氷が融けて液体の水になった量を総体積の変化などで測ることにより、試料から放出された熱量を正確に定量できる。実際、ラボアジェは200年以上も前、熱が熱素という元素であると信じられていた時代に、エレガントで高精度の熱量測定を達成した⁴⁾。4)で紹介する伝導型熱量計も、周辺温度を一定にする場合は、等温型熱量計の1つに分類される。

2) 断熱型熱量計 (adiabatic calorimeter) : 試料周辺温度を試料温度に、あるいは逆に試料温度を周辺温度に積極的に一致させることで、試料と周辺の間を熱平衡に保つ。その結果、試料で発生した熱はすべて試料に留まることになる。この方法はもっぱら、液体ヘリウム温度から室温までの断熱制御が容易な温度領域において、決められた量のジュール熱(電力×時間)を試料に投入し、試料の熱容量を決定するために使われている。断熱型熱測定が熱量測定で最も高精度であると信じている研究者も多いようであるが、実際には、断熱制御は試料と周辺の温度差をせいぜい1 mKに保つのが限界で、試料の速い温度変化に周辺温度を追従させることは困難である。

3) 等温壁型熱量計 (isoperibol calorimeter) : 試料周辺温度を試料温度に完全に追従させることには、技術的に限界があるので、むしろ周辺温度を試料温度に近いある一定温度に保つことにする。断熱に近いけれども、試料と周辺の間には、その温度差に比例した熱流(熱漏れ)が発生する(ニュートン則)。しかし、両者の温度差を常時測っておれば、その熱漏れの大きさは十分正確に評価できる。ただし、そ

の時試料容器の表面温度は均一でなければならない。この方法により、断熱法より遙かに高精度な熱量測定が可能になる。試料の温度は100万分の1℃の桁まで読み取ることができるので、1℃の温度ジャンプで、6桁のダイナミックレンジを達成できる。燃焼熱のように熱量が大きい場合に有効である。筆者が開発した高精度燃焼熱測定装置はこの原理によっている⁵⁾。

4) 伝導型熱量計 (heat conduction calorimeter) : そもそも発生する熱量が微弱で、試料自身の温度変化によって熱量を測定できない場合には、試料周辺温度を制御し、ペルチェ素子などを使って試料から周辺に流れる熱流そのものを検出し測定する。試料容器は、恒温槽内に設置されるが、高性能の恒温槽であっても温度制御はせいぜい±1 mK程度であり、恒温槽の温度は常に揺らいでいるので、試料容器と恒温槽の間にはこの温度揺らぎによる熱の出入りが発生してしまう。試料から発生する微弱な熱量を測定しようするときには、これが大きな妨げになる。そこで熱容量と形状の完全に一致した一対の容器を用意し、一方を試料容器、もう一方を参照容器とする。この2つの容器を同じ恒温槽に収め、両者の熱流の差を測定することにより、恒温槽の温度揺らぎに起因する熱流を完全に相殺できるようになる。このような熱量計を双子型熱量計と呼ぶ。多くの市販の熱量計にも採用されている。この方法によって、nWレベルの熱流検出も可能になる⁶⁾。

生物試料の測定では、生きた試料に呼吸のための新鮮な空気を供給する必要がある。しかし、熱量計に外部から空気を送り込もうとすると熱量計と外気の温度差によって熱も流入することになる。また、空気流速の揺らぎが熱流の揺らぎをもたらし、熱測定の精度を保つことを困難にする。仮に空気の供給源を同じ恒温槽内に設置して、空気の温度を試料容器と完全に一致させたとしても、空気を流動させるときの圧力によって、大きな圧縮熱が発生する。このようなフロー型の熱量計よりは、試料と空気を完全に容器に閉じ込んだバッチ型の測定の方が高精度熱測定に適合している。このため、熱量計の感度を上げ、できるだけ試料量を減らし、呼吸に十分量の酸素を試料容器に封入できるのであれば、その方がよい。

電子回路の温度制御

精密熱測定は、温度（差）測定、ペルチエ素子などによる熱流測定、放射光強度測定などによってなされる。いずれも微小な電位差を増幅回路によって増幅することになる。分光光学測定と違って、試料からの熱信号（熱の出入り）を分光し、試料の周辺からの熱雑音から分離することはできない。刺激に対する応答を測定するのでない限り、原理的に熱信号と熱雑音は区別できない。さらに、一般に熱信号の時間スケールは、秒から日に及ぶたいへん長いものなので、微弱な信号の場合、ベースラインの長時間変動に埋もれて検出不能になってしまう可能性もある。

熱量計本体の温度制御が重要であることは言うまでもないが、見落とされがちなのが周辺の、とりわけ増幅回路の温度制御である。市販の熱量計は、装置をコンパクトにするため、熱量計本体と電子回路を一体化したものが多い。DSCなどは、数100度の温度を掃引するので、近くに置かれた増幅回路も少なからずその温度変化に曝されることになる。できれば、市販の装置であっても、増幅回路と電源は、熱量計本体から切り離し、それぞれ別の箱に移す。パワートランジスターや増幅回路自身も発熱するので、ファンをつけて強力に送風し、温度を一定に保つようにする。これだけで、市販の熱量計のベースラインは格段に安定する。

異なる金属の間に温度差があると、熱起電力が発生することは、よく知られていることである（ゼーベック効果）。室温と異なる温度にある熱量計本体と増幅回路を結ぶリード線が、まさにその状況にあることは理解しておくべきである。多くは熱伝導のよい銅線なので、電圧を伝えるリード線そのものが温度差に比例して熱も移送する。増幅器に接続する前段で、温度制御された金属ブロックと十分に熱接触させ熱交換する工夫は有効である。その際、通常の塩化ビニル等の絶縁被覆材料は熱伝導が悪く、熱交換の妨げになるばかりか、長時間に亘って温度が変化し続ける原因になるので、熱交換部分への使用は不可である。

水の蒸発熱・吸着熱は巨大

生物熱測定では、完全に乾燥した試料を扱うことは稀で、多くは一定の水蒸気圧下に試料を置くこと

になる。例えば、試料容器の中に試料を湿らせたろ紙片と共に封入し、飽和水蒸気圧下で、伝導型熱量計を使って高感度熱測定を行うとする。先に述べたように、熱量計の収められた恒温槽の温度は必ず揺らいでいるので、試料容器内の水の水蒸気圧もそれに追従してわずかに変動することになる。しかし、水の蒸発熱は非常に大きい（25℃で44 kJ/mol）ので、この時の水の水蒸発・液化が生物試料の微弱な熱信号よりも大きな熱の出入りをもたらしてしまう。このため、生物試料の場合、双子型熱量計を採用し、参照容器にも必ず、試料容器と同じ湿らせたろ紙を入れて、水の水蒸発による熱信号を相殺させる。

もともと乾燥させていた試料容器に湿らせたろ紙を封入することを想像してみよう。ろ紙から蒸発した水は、水蒸気となって容器を満たすだけでなく、ガラスや金属でできた容器内表面にも吸着し、やがて吸着平衡に達する。実際にnWレベルの高感度熱測定を実行しようとするならば、水の吸着熱もまた大きいので、濡れたろ紙を投入してから数時間待たないと、吸着による発熱がおさまり容器内壁表面の水が吸着平衡に達したと見なすことができない。試料容器内の空気を入れ替えるときにも、同じことが起こるので、洗気瓶で水をくぐらせた空気を供給する様にする。

また、ろ紙を水で湿らせる時に、純水は避けた方がよい。純水の飽和蒸気圧下では、容器内壁の小さな傷に吸着した水は成長し、液滴を形成する。実際私たちは、実験室の純水のボトルの内壁にはたくさん水滴がついていることを日常観察している。試料容器は温度揺らぎの小さい熱量計の中にあるのだが、容器内に複数の液滴が出現すると、熱量計の温度揺らぎが液滴の間での水蒸気の移動をもたらす。その結果、試料容器の表面温度が不均一となり、試料容器と参照容器の熱の出入りが一致なくなり、熱測定ベースラインの大きな変動をもたらす。しかし、純水でなく例えば、生理食塩水を使うと、水蒸気圧は飽和蒸気圧以下となり、容器内壁に液滴が成長することはなくなる。液相の水はろ紙に閉じ込められたままとなる。

湿度の制御

伝導型熱量計では、試料容器と恒温槽が熱的に接触している。その熱の経路の1か所（集約点）で

熱流測定を行っている。経路全体を見れば、熱量計内の空気もいたるところで熱媒体として関与しているのであるが、空気の存在はあまり意識されない。海の無い大陸奥地と違って、日本では季節や気象条件によって湿度が大きく変動する。湿度が変わるということは大気の組成が変わるということである。気体はそれを構成する分子の種類によって熱伝導率が異なる。さらに、水蒸気は熱量計内部のあらゆる部位と吸着平衡にある。したがって、湿度の変動は熱量計本体と恒温槽の熱交換速度と温度の変動をもたらす。

双子型熱量計は、試料側と参照側でこのような変動も相殺する様に設計されているのであるが、細部に亘り完全に同じに作られていることは期待できない。そのため、乾燥した地域で安定に働いていた熱量計を日本に持ってくると、ベースラインが大きく変動するようになることも起こりうる。

日本の実験室で一年を通じて湿度を完全に管理することは容易ではない。それはとても大掛かりなことになる。熱量計を乾燥空気ですべて完全に密閉することも1つの方法であるが、試料容器の出し入れ操作や熱量計の構造から、それが難しい場合もある。また、密閉操作は、封入時に気体圧力の変動をもたらす。気体の圧縮膨張は大きな熱の出入りをともなうので、わずかな圧力変化でもベースライン変動の原因となる。

これらの問題を解決するため、筆者は熱量計を大気に開放したまま、湿度を管理する方法を採用した。即ち、恒温槽内に設置された熱量計の上から、毎秒 1cm^3 の速度で、アルゴンガスを静かに滴下する。アルゴンガスは空気より重いので、熱量計内部は空気が排除され、アルゴンガスで満たされる。これにより熱量計は大気圧に開放されたまま、大気の湿度変動、組成変動から解放される。しかも、熱量計にガスを封じ込めることはしていないので、試料容器の出し入れにも一切支障がない。アルゴンガスは毎秒 1cm^3 の流量なので、通常の47 L (7立米) ボンベでも、3ヶ月間連続して供給でき、コスト的にも問題はない。

試料の封じ込め

バッチ型であれフロー型であれ、試料容器内の気体が容器の外に漏れだすと、それは試料容器内の水

の蒸発を伴うので、大きな吸熱をもたらす。そのため、試料を投入した後は完全に蓋をして試料容器を密封する必要がある。市販の熱量計では、繰り返し使用できる容器ではOリングシール、使い捨て容器ではシリコンゴムなどの付いたキャップをかしめて封じるようになっている。しかし、いずれの方法もnWレベルの熱測定を行う時には使えない。なぜならば、ゴムなどのエントロピー弾性を示す高分子材料は圧力をかけると何日にも亘って発熱しつづけ、測定の妨げになるからである。

ステンレス等の耐食性の材料でネジ蓋を作成しする。ただし、ステンレスは熱伝導が悪いので、肉厚にしない。容器本体と蓋の接触面を鏡面にしておき、金属の面接触だけで完全に封じられるようにする。試料容器を交換するごとに、ベースラインが変動するので、nWレベルの測定では、使い捨て容器は使用不可である。

また、試料容器には熱伝導の悪い材料、腐食されやすい材料の使用を避ける。肉の薄い透明ガラスであれば、化学的にも安定で、試料容器内の様子も観察できるので、使用可である。アルミホイルのような材料を試料容器に封じると水蒸気と反応し、延々と大きな発熱が観測されることになる。試料容器内の構造物として、金属を使用したい場合には腐食されない白金を使う。

細菌繁殖の制御

生物試料を扱うときには、大腸菌などの雑菌が試料容器内で繁殖しないように注意する。細菌は指数関数的に増殖し、数時間で熱出力の大部分を占めるようになる。完全無菌状態での測定が望ましいが、試料によってそれが困難な場合には、培地に抗生物質を加えるなどして、繁殖を抑える。細菌が存在しても活動停止状態であるなら、熱測定に影響はない。栄養培地を使うときには特に注意する。動物の表皮にはたくさんの細菌が不着しているので、試料容器に投入する前に抗生物質で洗浄する。素手で試料容器に触れるなどはもっての外である。

また、動物の腸管には細菌が生息しており、動物の発熱はそれら細菌の発熱も込みで測定していることに注意する。腸内細菌は宿主によって活動が抑制されているが、糞として放出された後はその制御を失うので、指数関数的発熱増加をもたらす。

筆者の開発した生物熱測定システム

伝導型熱量計は、ペルチエ素子、恒温槽、直流増幅器があれば自作できる。ペルチエ素子は冷却装置にも使われており、安価に入手できる。恒温槽と増幅器の性能に加えて、上に解説したことがらに注意するならば、市販の熱量計と比較しても遜色ない高精度の熱量計をつくることもできる。

筆者は当センターが30年前に購入した双子型熱量計 LKB2277 を利用して、高感度生物熱測定システムを構築した。同装置はもともと、スウェーデンの Lund 大学の I. Wadsö 教授らによって開発されたもので、現在はその後継機種 TAM4 が等温型熱量計として、TA Instruments 社から販売されている。筆者の利用したこの初期の熱量計のスペックは、ベースラインの雑音、安定性はそれぞれ $\pm 0.2 \mu\text{W}$ で、 μW 以上のスケールでの熱測定が想定されているが、工夫すれば 10 nW 程度の熱信号を十分に定量的に検出できることを示そう。

$\pm 0.2 \text{ mK}$ の安定性を持つ恒温槽と、1 対の試料容器ホルダーと 2 対のペルチエ素子からなる熱量計本体 2277-201 はそのまま利用した。熱量計の出力 (ペルチエ素子両端の電位差) は、ナノボルトメータに入力して増幅し、PC に取り込んだ。微小試料による高感度測定を目指すことにし、パッチ型の測定法を選択した。試料容器には、装置の消耗品として供給されている使い捨てのガラスアンプル (3.5 mL) から重さの揃った対を選びだし利用した。ただし、上述の理由により、ゴム製のキャップは利用できないので、ステンレス製のネジ蓋を作成し取り付け (図 1)。

熱量計の上部は、雑貨店で購入したプラスチック



図 1. 生物熱測定システムおよび試料容器 (3.5 mL)

(PP) 製の食品円筒容器で覆い、毎秒 1 cm^3 で緩やかにアルゴンガスを供給する。熱量計全体は塩ビシートで覆われた空気恒温槽に収める。もちろん、ナノボルトメータもこの中に置き、温度管理される。

好気性の生物の発熱は、その呼吸量からおおよそ見積もることができる。発熱の大部分は呼吸によるエネルギー代謝によっている。酸素 1 モルあたり 450 kJ の発熱がもたらされるとすれば、 $1 \mu\text{W}$ の熱を出力する動物は、1 時間に $0.2 \mu\text{L}$ の酸素を消費する。100 時間 3.5 mL の試料容器に閉じ込めていても、酸欠になることはない。ただし、呼吸によって放出される同量の二酸化炭素も容器内に留まり、高濃度に蓄積されると、試料に中毒症状が現れる場合があるので注意する。

生物熱測定は、対象とする生物試料の時間に依存する。例えば卵からの発生の場合、卵成熟あるいは受精直後から発熱を測定したい。したがって、試料を容器に封じ、熱量計に投じてから可能な限り早く測定が開始できることが望ましい。筆者の開発したシステムでは、熱量計の上端が大気圧に開放されており、かつ熱量計内の大気環境を乱すことなく、試料容器を出し入れできるので、試料調整後、最短 1 時間程度で、 10 nW 程度の信号も観測できる。

生物熱測定の事例

アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) は動物発生のモデル生物で、世界中で研究に使われている。卵の直径は約 1 mm である。未受精卵にカルシウムイオンを注入すると、卵が活性化し、細胞質が周期的な収縮運動をすることが知られている⁷⁾。これを熱量計で観測したのが、図 2 である。

予め抗生物質の投与された培地 (MMR) $200 \mu\text{L}$ が試料容器に封入されている。試料容器を熱量計から取り出し、未受精卵 1 個を封入して、熱量計に戻す。熱量計が安定するのを待って、未受精卵の発熱量 (約 $0.2 \mu\text{W}$) が決定される。試料容器を熱量計から取り出し、卵を回収、A23187 溶液に晒しカルシウムイオンを注入する。それを直ちに試料容器に戻し、熱量計に再投入する。熱量計が安定するのを待って、活性化された卵の発熱を測定する。カルシウムイオン注入から約 2 時間で測定可能になる。卵の発熱は約 1.5 倍になり、しばらくすると卵の発熱に周期的な振動が現れる。驚くべきことに、卵の恒常性が

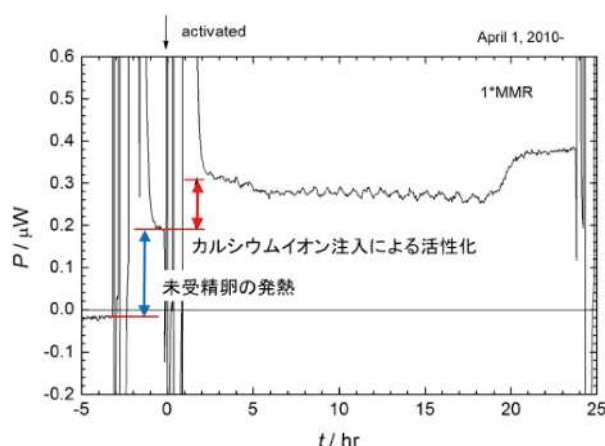


図2. カルシウムイオン注入によるツメガエル未受精卵の活性化 ($T = 291\text{ K}$)

失われるまでその振動はカルシウムイオン注入後、20時間も継続することが分かった⁸⁾。この振動は温度が高いほど速くなる。

おわりに

DSCなどの熱分析装置、あるいはITCなどの熱量計は、今や材料開発や食品・医薬品開発の現場に広く普及し使われている。しかし、果たしてそれらの装置はその性能を十分に引き出して、利用されているであろうか。「もったいない」使われ方をされていることはないだろうか。正しい想像力を働かせ、ちょっとした工夫を施すことによって、それらの装置の性能は格段に向上する。

測定精度を1桁向上させれば、測定試料を節約できるだけでなく、今まで気づかなかった現象がたくさん発見されるようになる。熱量計がルーチン測定の道具から、新しい発見の玉手箱に変身するのである。熱量計を使いこなす研究・開発現場が増えていけば、それが日本の産業の発展を支える大きな力となって行くに違いない。

注および参考文献

- 1) 大阪大学理学研究科附属熱・エントロピー科学研究センター：
<https://www.sci.osaka-u.ac.jp/ja/institute/structureheatscience/>
- 2) 熱・エントロピー科学研究センターの年報『阪大化学熱学レポート』Vol. 25 (2004年)以降を参照：
<http://www.chem.sci.osaka-u.ac.jp/lab/micro/report/rctes/2019/index.html>
- 3) 日本熱測定学会編『熱量測定・熱分析ハンドブック』(第3版、丸善出版、2020年)；日本化学会編『温度・熱、圧力』(実験化学講座第5版(6)、丸善出版、2005年)
- 4) ラボアジェ『化学のはじめ』(田中豊助・原田紀子訳、古典化学シリーズ4、内田老鶴圃新社、1973年)
- 5) Y. Nagano, High-precision micro-combustion calorimetry of anthracene, *J. Chem. Thermodynamics*, **33**, 377-387 (2001)
- 6) 例えば、1時間くらいのタイムスケールを持つ10 nW程度の熱イベントを有意に検出するには、少なくとも10時間以上に亘り、 $\pm 1\text{ nW}$ 程度のベースラインの安定性が必要となる。
- 7) K. Hara, P. Tydeman and M. Kirschner, A cytoplasmic clock with the same period as the division cycle in *Xenopus* eggs, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 462-466 (1980)
- 8) Y. Nagano and K. L. Ode, Temperature-independent energy expenditure in early development of the African clawed frog *Xenopus laevis*, *Phys. Biol.* **11**, 046008 (12pp) (2014)