



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	生物学的材料の凍結乾燥法 : 第9報 予備凍結条件の検討
Author(s)	根井, 外喜男; NEI, Tokio; 林, 喬義 他
Citation	低温科学. 生物篇, 12, 63-70
Issue Date	1954-12-30
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17570
Type	departmental bulletin paper
File Information	12_p63-70.pdf



Tokio NEI, Takayoshi HAYASHI, Tōru SATŌ, Yoshiteru ŌHARA, Isamu NAKAGAWA and Shizue MAEKAWA 1954 Freeze-Drying of Biological Materials. IX. Investigations on the Pre-freezing Conditions. *Low Temperature Science, Ser. B, 12.* (With English résumé p. 70)

生物學的材料の凍結乾燥法

第9報 豫備凍結條件の検討*

根井外喜男 林 喬義 佐藤 徹
大原吉輝 中川 勇 前川 靜枝

(低溫科學研究所 醫學部門)

(昭和29年12月受理)

種々の生物學的材料を凍結乾燥する場合の操作の過程には、最後の乾燥結果に対して影響を及ぼすような因子が数多く含まれるが、その中でも予備凍結に関与する条件はまず最初に問題になるところの重要な条件の一つである¹⁾。

従来、凍結乾燥の予備凍結に関する報告では、試料の量とか容器のことが多く扱われている²⁾。そのほかには冷却速度についての実験が多少あつて³⁾⁻⁷⁾、特に生体の組織などを材料として比較的詳しく観察された。その結果、凍結乾燥の目的が本質的に違う場合、例えば組織化學的検査のためと、移植用材料製作のためとは、組織の予備凍結の最適条件が必ずしも同一でないことがわかつてきた。つまり組織形態學的な立場からは冷却速度はできるだけ大きい方がよいということは、冷却速度を小さくすると氷晶は大きく成長して結局出来上つた標本に氷晶の脱落した跡の孔隙を残すことになるからである⁸⁾。しかし細胞機能をなるべく保持するためには逆に冷却速度は小さい方がよいらしい⁹⁾。

また種々の物質の溶液の場合などでも、冷却速度と氷晶との因果関係は基本的には同じ傾向にあるが、液体試料では乾燥速度とか乾燥後の性状特に外觀、溶解性、活性度などについて組織の場合とは同一に論ずることのできぬ問題を多く含んでいる。

更に微生物などの乾燥に当つては、生細胞としての機能をできるだけ維持しなければならず、一方には細胞機能は細胞自身の凍結の有無に左右され、しかもその細胞の内外に於ける凍結状態は冷却速度によつて異なることが知られているので¹⁰⁾、微生物の乾燥の場合にも当然予備凍結の条件に対し特別な考慮が必要となる。従来このような点についての吟味が案外に関却されていたが、近年我が国でBCGの乾燥ワクチンの研究が盛になるにつれて漸く関心が深まつ

* 北海道大學低溫科學研究所業績 第272號

本論文の要旨は昭和28年5月日本細菌學會總會(新潟)に於て報告した。

なお本研究の費用の一部は文部省科學研究費によつた。

てきた⁷⁻⁹⁾然し多くの報告では乾燥とは別個に行われた凍結融解の結果から種々推理している程度で、それとても必ずしも一定の成績が得られておらず、結局予備凍結の条件と乾燥成果との関係についてはまだ定説が樹てられていない現状である。

吾々の研究室に於いては、凍結融解によつて細菌がうける影響について種々の角度から検討をすすめ、今日までに機能的、形態的な立場での幾多の所見¹¹⁾⁻¹⁵⁾を得ているが、それらの成績を基礎として今回は更に細菌の凍結乾燥に際しての予備凍結の条件のうちで特に冷却速度並に冷却温度の問題をとりあげ、試料である細菌々液の菌量、メジウムの種類等を変えながら実験を試みた。

なお本実験では常に同一条件での凍結融解を対照実験として比較検討し、また各種条件での細菌の障害度判定の基準としては生菌数並に酸素消費量をもつてした。これはさきに佐藤¹¹⁾及び大原¹²⁾が大腸菌の凍結融解に関する実験を行つた際それぞれ生菌数並に呼吸について検討しているので、本実験もそれと平行して行つたものである。

実験方法

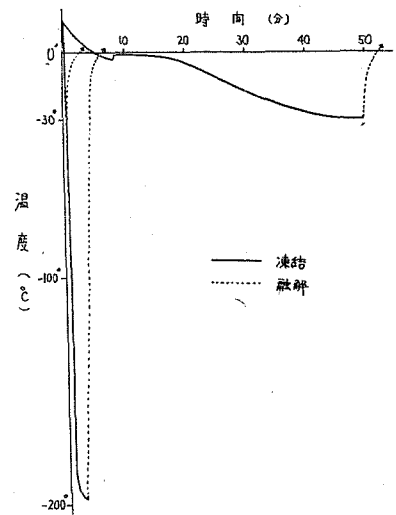
Escherichia coli をブイヨンで一夜培養後、大量の寒天培地に移植し18時間培養で發育した菌苔を掻きとつて蒸留水で3回洗い一定濃度(後述)の菌液を作つた。メジウムには特に指定したもの以外は蒸留水を用いた。これは凍結に関与する因子をなるべく簡単にして機序の解明に便ならしめるためである。このようにして作つた菌液を内径19mmの平底試験管に1ccずつ分注し、次のような条件で凍結させた。

1) -30°C までの緩慢冷却: 前記試験管を更に径25mmの太い試験管に入れて二重管とし、中間に空気層を作つて冷却速度を小さくする。この二重管に入れた試料を $-32\sim-33^{\circ}\text{C}$ のブライン中に浸すと、凡そ40~50分で試料温度は -30°C に達する。

2) -30°C までの急速冷却: 試験管を二重にせず、そのまま液体空気(凡そ -180°C)中に挿入し、試料温度が -30°C に達した瞬間に(凡そ15~20秒後)急いで次の融解又は乾燥の操作に移る。

3) -180°C までの急速冷却: 試験管を直接液体空気に浸すと凡そ30~40秒でほぼ最低温度に達する。そのまま2分間放置して次の操作を行う。

以上3種の冷却条件の実験群を作り、各群とも同一試料を同時に3本ずつ用い、その中の1本には熱電対を挿入して凍結融解の全過程の温度変化を記録し、他の2本は処置後の機能測定に用いた。凍結乾燥に対



第1圖 凍結融解過程の温度曲線

する比較実験の凍結融解での融解はすべて10°Cの水槽で行った。その凍結融解過程の温度変化は第1図に示した通りである。

次に凍結乾燥では、以上の凍結融解の場合とほぼ等しい条件で凍結した試料を予め-30°Cに冷しておいたデシケーターに納め、直ちに凍結乾燥機に装着して乾燥を行った。即ち3群とも同一デシケーターに入れ同時に乾燥した。なお凝結器には液体空気を用い、到達真空度は凡そ10⁻² mm Hgで乾燥時間は6~8時間であつた。

このようにして凍結融解或いは凍結乾燥を行った試料を平板培養して発生集落数から生菌数をもとめ、またワールブルグ検圧計を用いて酸素消費量を測定した。なお以上の実験は同一条件について各3回ずつ行い、各回での平均値をそれぞれ無処置対照値を100とした百分率で表示した。

実験成績

I. 菌濃度を変えた場合 (80 mg/cc と 25 mg/cc)

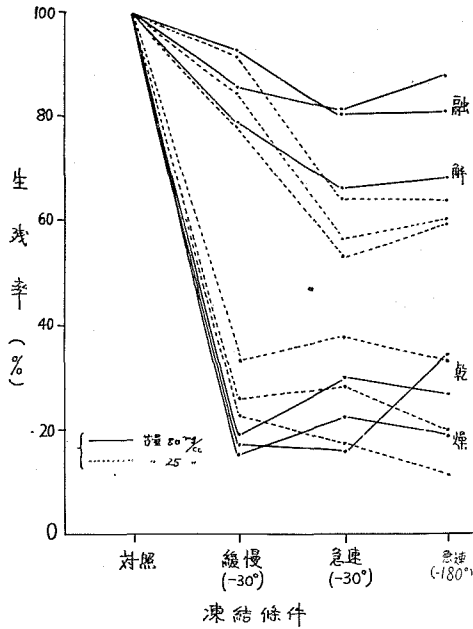
1) 生残率: 菌量が80 mg/ccと25 mg/ccになるように作った蒸溜水菌浮游液を用いて凍結融解及び凍結乾燥を行った場合の生残率は第1表と第2図に示す通りである。

その結果は、凍結融解だけでは90~50%の範囲の低下にすぎないが、凍結乾燥を行ったものではそれよりもはるかに低く40~10%まで生残率の低下するのがみられた。

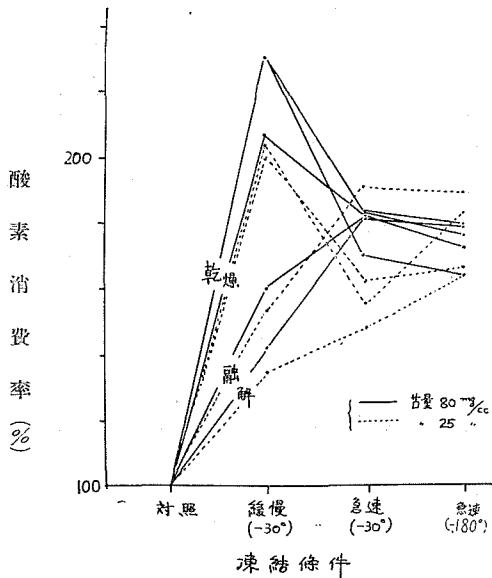
冷却条件による差について考えてみると、凍結融解の場合の緩慢冷却は急速冷却よりも菌

第1表 菌量80 mg/cc並びに25 mg/ccの蒸溜水浮游液を凍結融解又は凍結乾燥した場合の生残率と酸素消費率

菌量	実験例	凍 結 融 解							
		生 残 率 (%)				酸 素 消 費 率 (%)			
		対 照	緩慢冷却	急速冷却 (-30°C)	急速冷却 (-180°C)	対 照	緩慢冷却	急速冷却 (-30°C)	急速冷却 (-180°C)
80 mg/cc	I	100	75	66	68	100	142	182	175
	II	100	86	81	87	100	160	180	178
	III	100	92	80	80	—	—	—	—
25 mg/cc	I	100	78	52	59	100	134	142	164
	II	100	75	58	60	100	151	190	189
	III	100	91	63	63	—	—	—	—
菌量	実験例	凍 結 乾 燥							
		生 残 率 (%)				酸 素 消 費 率 (%)			
		対 照	緩慢冷却	急速冷却 (-30°C)	急速冷却 (-180°C)	対 照	緩慢冷却	急速冷却 (-30°C)	急速冷却 (-180°C)
80 mg/cc	I	100	19	30	26	100	208	181	173
	II	100	14	22	29	100	231	182	178
	III	100	17	15	34	100	231	170	162
25 mg/cc	I	100	33	37	32	100	205	154	183
	II	100	26	28	19	100	200	162	168
	III	100	22	18	11	—	—	—	—



第2圖 蒸溜水菌液の凍結融解と凍結乾燥の生存率 (菌量: 80 mg/cc, 25 mg/cc)



第3圖 蒸溜水菌液の凍結融解と凍結乾燥の酸素消費率 (菌量: 80 mg/cc, 25 mg/cc)

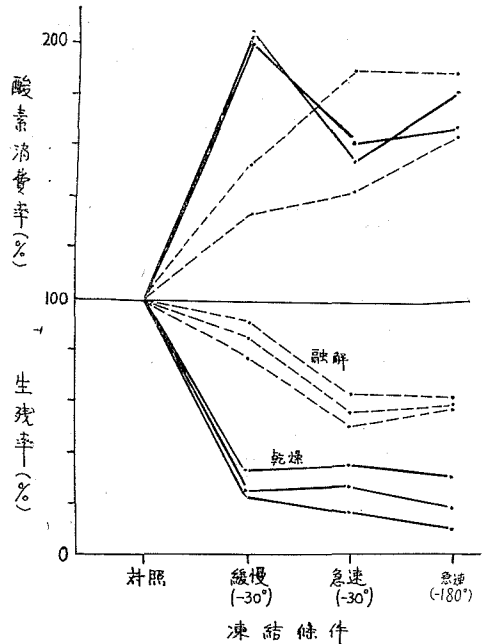
の障害の受けかたは非常に少なくて生残率は高いが、凍結乾燥の場合は冷却速度による差は比較的僅かである。

また 80 mg/cc と 25 mg/cc との菌濃度の差についてはあまり明らかでないが、凍結融解の際の急速冷却条件の場合に菌量の少ない方がやや生残率が低いという傾向を示す。

要するに凍結融解に於いては冷却条件による障害度の差は比較的明らかに(菌量による差も多少)みとめられるが、凍結乾燥ではこれらの条件による差は殆んどみられないことがわかった。

2) 酸素消費率: 生残率を測定したものと同一の試料について同時に酸素消費率を測つた結果は第1表並に第3図に示す通りである。

それによれば、まず凍結融解を行つたものでは生残率に相対応したような傾向の結果を示



第4圖 蒸溜水浮游液の凍結融解と凍結乾燥 (菌量: 25 mg/cc)

すが凍結乾燥では冷却条件によつて異り、緩慢冷却では極めて高い値を示すのに、急速冷却の2条件ではかえつてそれよりも低く凍結融解と同程度の率となつている。

菌量による差はあまり明らかでない。

なお次項以下の実験結果との比較に便なように25 mg/ccの場合の生残率と酸素消費率を同一図上に表わしたものが第4図である。

II. メジウムの種類を変えた場合

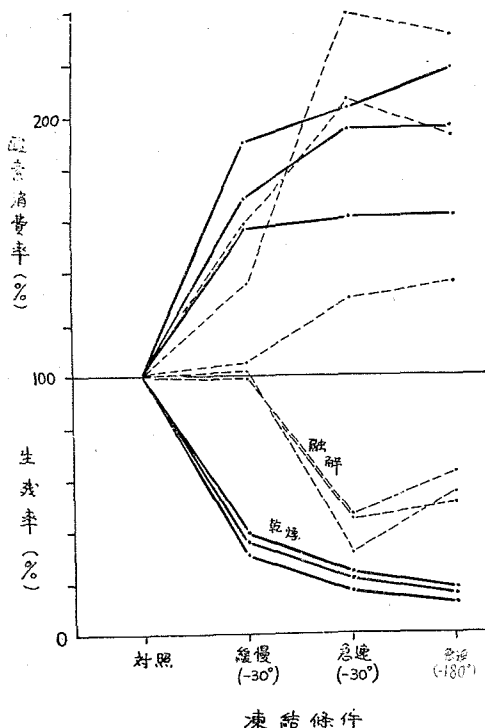
(菌量はすべて25 mg/cc)

1) 0.5%ゼラチン液を用いた時：まず生残率についてみると、凍結融解時の緩慢冷却では殆んど生残率は減少しないが、急速冷却では60~40%まで低下する。凍結乾燥ではすべて融解時の値より低く、しかも緩慢、急速(-30°C)、急速(-180°C)の順に低下する傾向がみられた。

しかしその差は僅かである。

一方酸素消費率では、凍結融解の場合はほぼ生残率に相対し、緩慢冷却が最も低い、急速冷却の2条件は殆んど同じ値を示していずれも緩慢冷却よりかなり高い。凍結乾燥でも大体同じような傾向で凍結融解と大差のない値を示した(第2表、第5図)。

2) 1.0%蔗糖液を用いた時：生残率については凍結融解、凍結乾燥ともに前項実験のゼ



第5図 ゼラチン菌液の凍結融解と凍結乾燥 (ゼラチン: 0.5% 菌量: 25 mg/cc)

第2表 0.5%ゼラチン液をメジウムとして凍結融解又は凍結乾燥した菌液の生残率と酸素消費率

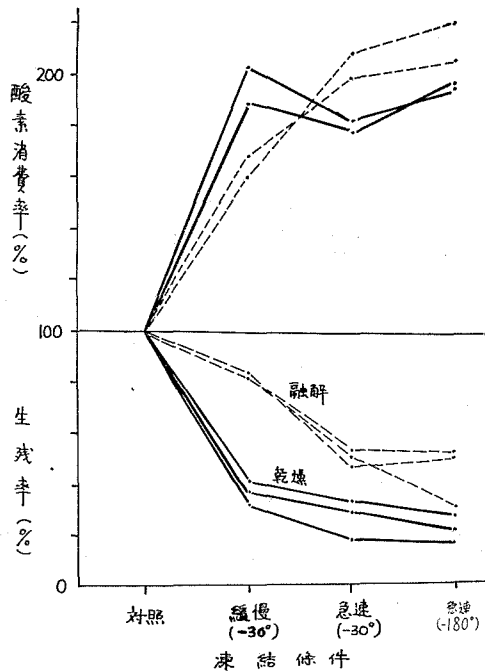
実験例	凍結融解							
	生残率 (%)				酸素消費率 (%)			
	対照	緩慢冷却	急速冷却 (-30°C)	急速冷却 (-180°C)	対照	緩慢冷却	急速冷却 (-30°C)	急速冷却 (-180°C)
I	100	97	46	63	100	105	149	155
II	100	99	46	51	100	143	250	233
III	100	103	32	55	100	154	206	192

実験例	凍結乾燥							
	生残率 (%)				酸素消費率 (%)			
	対照	緩慢冷却	急速冷却 (-30°C)	急速冷却 (-180°C)	対照	緩慢冷却	急速冷却 (-30°C)	急速冷却 (-180°C)
I	100	31	17	14	100	156	161	162
II	100	38	24	18	100	190	204	218
III	100	37	23	18	100	169	195	196

第3表 1%蔗糖液をメジウムとして凍結融解又は凍結乾燥した菌液生残率と酸素消費率

実験例	凍 結				融 解			
	生 残 率 (%)				酸 素 消 費 率 (%)			
	対 照	緩慢冷却	急速冷却 (-30°C)	急速冷却 (-180°C)	対 照	緩慢冷却	急速冷却 (-30°C)	急速冷却 (-180°C)
I	100	81	52	34	100	168	199	206
II	100	84	48	50	100	160	209	220
III	100	81	53	52	—	—	—	—

実験例	凍 結 乾 燥				融 解			
	生 残 率 (%)				酸 素 消 費 率 (%)			
	対 照	緩慢冷却	急速冷却 (-30°C)	急速冷却 (-180°C)	対 照	緩慢冷却	急速冷却 (-30°C)	急速冷却 (-180°C)
I	100	41	34	29	100	189	178	196
II	100	32	19	18	100	204	181	195
III	100	38	30	23	—	—	—	—



第6圖 蔗糖菌液の凍結融解と凍結乾燥 (蔗糖: 1% 菌量: 2.5mg/cc)

ラチン溶液の場合と同様の傾向を示した。

酸素消費率は蒸留水の場合に似て、凍結乾燥の際の緩慢冷却は値は高いが急速冷却ではかえってそれより値が低い(第3表, 第6図)。

考 察

以上の成績を要約して、それに考察を加えてみる。まず各種条件で凍結乾燥を行つたものを対照実験である凍結融解の場合と比較してみると、いずれの条件でも常に生残率のはるかに低くなつていたので、凍結乾燥の方が菌の障害度は大きいということがよくわかれる。しかし酸素消費量からみると必ずしもそうともいえずやや複雑な関係にあるように思われる。

そこで更に各種の条件で処理した場合の菌の生残率と酸素消費率とを比較検討してみ

ると、2, 3の場合を除いて各条件での値が概ね相対応し、菌の障害度が大きくて生菌数が減少する時には逆に酸素消費量は増大するという関係にある。その理由並に考察については大原の論文¹²⁾に譲るが、要するに凍結融解では生残率と酸素消費率とがほぼ相対応しているのである。ところが凍結乾燥ではこの両者の関係が必ずしも一致しない場合がある。

次にもう少し詳しく冷却速度の点をながめてみると、凍結融解では生残率でも酸素消費率

でもわりあいはつきりした冷却速度の差がみとめられる。例えば既に秋元¹³⁾や佐藤¹⁴⁾が大腸菌で、また根井等^{10), 17)}が酵母でみとめたところの、緩慢冷却よりも急速冷却の方が菌に対する障害の程度は大きい、急速冷却では到達温度によつてあまり差はないという所見とほぼ一致した成績を得た。従つて本文の始めにも述べたように、冷却の条件に関してこれまでに行われた他の報告者の成績とは相反する場合があるし、またそれらの論拠に同意しがたい点も多い。吾々は吾々の研究室で行われた一連の研究の結果からその機序の説明を試みているものであるが細部に亘つては佐藤の論文¹⁴⁾に譲る。

また凍結乾燥の場合にも、生残率からみれば冷却速度による差は凍結融解の場合とほぼ同一傾向にあることがわかる。但しその差は甚だ少く、殊に緩慢冷却による障害は凍結融解の場合に比較してわりあい大きい。これは凍結乾燥の場合は、凍結による障害のほか乾燥に伴う障害が強くなるために、凍結条件による差が覆いかくされたようになるためか、或いは他の理由によるものか更に検索する必要がある。

次に凍結乾燥での酸素消費率についてみると、冷却速度による影響は必ずしも一定ではない。例えば蒸留水浮游液や蔗糖液では緩慢冷却が最も値が大きく急速冷却の方がかえつて低くなつている。生残率との関係から考えても、急速凍結による値は凍結融解にくらべて凍結乾燥の方が小さすぎるのではなからうか。これらの事実について、その理由を説明するだけの実験的根拠はまだ得られていない。

そのほか菌濃度による影響については、概して菌量の多い方が菌体に対する障害度は少ないという結果になつた。これは一般に細菌の外界の諸条件に対する抵抗性の一つとして知られている性質であつて、凍結の場合にも同様の傾向がみられたわけである。特に凍結では菌濃度によつて氷晶の進行速度或いは生成状態さらに過冷却度などが多少左右されるのではないかと考えられ、そのための影響なども想像される。

最後にメジウムの種類として蒸留水とゼラチン(蛋白性物質の1例として)、蔗糖(糖類として)を用いて検討したが、前回の成績¹⁰⁾に比較して、蛋白や糖による膠質保護作用ともいふべき成績はあまりみとめられなかつた。但し緩慢冷却だけについていえば多少の効果があるような結果であつた。

結 論

凍結乾燥を行うに当り、予備凍結の条件によつて細菌は如何なる影響を蒙るかという点を吟味する目的で、大腸菌を用い主として生菌数と酸素消費量の測定を基準として菌の機能を検討した結果、次のような成績を得た。

- 1) 凍結乾燥では凍結融解のみのものよりはるかに細菌に対する障害度は大きい。
- 2) 種々の条件に於ける死滅率と酸素消費率との関係は特殊な場合を除いてはほぼ相対応する。

- 3) 冷却速度によつて細菌への障害度が異り、一般に急速冷却では障害が大きい。
- 4) 凍結乾燥後の酸素消費率はメジウムの種類によつて必ずしも同一傾向を示さない。

文 献

- 1) 根井外喜男 1952 凍結乾燥法とその應用. 日新醫學, 39, 6.
- 2) ————— 1951 凍結乾燥法の發展と現況. 低温科學, 7, 149.
- 3) Taylor, A. C. 1945 The rate of freezing, drying and rehydration of nerves. J. Cell. Comp. Physiol., 25, 161.
- 4) Koonz, C. H. and Ramsbottom, J. M. 1939 A method for studying the histological structure of frozen products. Food Res., 4, 117.
- 5) 兼平信一 1953 生物學的材料の凍結乾燥法 (7), 組織標本作製法としての凍結乾燥法について. 低温科學, 10, 137.
- 6) 根井外喜男・兼平信一 1953 生物學的材料の凍結乾燥法 (8), 凍結乾燥組織の酸素消費について. 低温科學, 10, 163.
- 7) Studies on BCG vaccine. 1952 Jap. BCG Res. Council., p. 25.
- 8) 藤本英二雄 1951 BCG ワクチンの凍結乾燥の研究 福岡醫學雜誌, 42, 416.
- 9) Arima, J. et al 1953 Influence of the intensity of the freezing temperature and the freezing rate on the viability of BCG. Jap. J. Tuberc., 1, 26.
- 10) 根井外喜男 1951 酵母の凍結過程. 科學, 21, 94.
- 1954 酵母の凍結過程. 日本農藝化學會誌, 28, 91.
- 11) 佐藤 徹 1954 低温處理による細菌死滅の機序について. 低温科學, Ser. B, 12, 39.
- 12) 大原吉輝 1954 凍結融解の細菌呼吸に及ぼす影響の機序について. 低温科學, Ser. B, 12, 1.
- 13) 秋元 博 1954 凍結融解による細菌の酸凝集性の變化について. 低温科學, Ser. B, 11, 23.
- 14) 根井外喜男・佐々木芳郎 1955 凍結融解による細菌体の破壊. 科學, 25, 36.
- 15) ————— 1955 凍結乾燥菌体の電子顯微鏡像. 科學, 25, 86.
- 16) 根井外喜男・佐藤徹・有馬純 1951 生物學的材料の凍結乾燥法 (6), 種々なメジウムを用いた細菌浮游液の乾燥. 低温科學, 8, 179.
- 17) 根井外喜男 外 3 名 1954 酵母の機能に及ぼす低温の影響. 日農化, 28, 94.

Résumé

In order to investigate the effect of freezing conditions, prior to freeze-drying process, upon bacteria in materials, some experiments were carried out with aqueous suspensions of *Escherichia coli*.

Plate count method and Warburg's manometer were employed for determining respectively the viability and respiratory activity of frozen-dried bacteria.

The following experimental facts were observed.

1) Destructive effect on bacteria is greater when the suspensions are frozen-dried than when only frozen and thawed.

2) Under various prefreezing conditions death rates approximately correspond to oxygen consumption rates with few exceptions.

3) Bacterial injuries due to freeze-drying are affected by the rate of cooling in such a manner that the rapid cooling causes, in general, serious damage to the organisms.

4) The respiratory activity of bacteria frozen-dried under the same condition varies more or less according to the kind of media employed for the materials.