HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	凍結乾燥に於ける乾燥の機構 : 試料の含水量測定による乾燥過程の分析　II.
Author(s)	千葉, 重雄
Citation	低温科學. 生物篇, 15, 75-94
Issue Date	1957-11-05
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17601
Type	departmental bulletin paper
File Information	15_p75-94.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

Shigeo CHIBA 1957 Mechanism of Drying during Freeze-Drying. Analysis of Drying Process by Estimating the Water Content of Materials. II. *Low Temperature Science, Ser. B, 15.* (With English résumé p. 94)

凍結乾燥に於ける乾燥の機構

試料の含水量測定による乾燥過程の分析 II*

千葉重雄

(低温科学研究所 医学部門)

(昭和32年7月受理)

I. 緒 言

Altmann (1890) や Shackell (1909) によつて始められた凍結乾燥法が，組織学的な固定法を含めて所謂生物材料の保存方法として価値あるものと認められ，僅か半世紀程の間に小は実験室に於ける種々な研究から大は工業的生産にまで発展し，今日に於ては，自然科学の多くの領域に於いて広く利用されるようになつたが，一方その凍結乾燥なるものの本体に関しては不明の点が多く，凍結状態の生物材料からどのような機構によつて水蒸気が蒸発(昇華)して行くのか，その乾燥過程の分析的研究も我が国に於いて僅かにその業績が見られる程度である。

凍結乾燥過程を追求する方法は種々あるが，試料の重量変化を経時的に測定する方法が最も正確でしかも簡単な方法であろう。試料の温度や蒸気圧を測定する方法は比較的簡単であり，又大量の試料に応用できる利点はあるが，乾燥終了の大体の見当をつけられる程度で，僅かの試料についてその正確な脱水経過を精しく測定するのには適当な方法でない。

この重量変化を経時的に測定する方法にも二通りのやりかたがある。一つは内藤 (1934)[1] や佐原 (1953)[2] が用いた方法であつて，多岐管に取付けた試料をある時間毎に取出してその重量を化学天秤で測定する方法であり，他の一つは根井 (1945[3], 1955[4]) が考案した方法であつて，スプリング秤により同じ1個の試料の重量変化を経時的に読み取る方法である。前の方法は，取り出した試料についての生物学的性質と，乾燥過程との間の関係を調べるのには都合が良いが，経時的重量変化を正確にに追求するのには不適当である。後の方法は，その長所短所が丁度前の方法の場合と逆であるが，著者の目的とする様な乾燥過程の詳しい追求には都合がよい。この方法に依つて求められた乾燥速度特性曲線は，各乾燥過程の限界がはつきりせず，全体としてなだらかな曲線を示している。これはスプリング秤を入れた容器の容量が大きいための緩衝作用によるものかと思われるが，或いは又凍結乾燥過程そのものが本質的にはつきりした限界を持たないものかも知れぬ。

兎に角以上のような方法で測定した結果，内藤は乾燥曲線として $y = W \cdot e^{-at}$ なる式を与

* 北海道大学低温科学研究所業績 第386号

え，a を内藤係数と名付け，乾燥速度を支配する重要な因子とした。

佐原は，内藤の曲線は乾燥能率が極めて悪い場合に近似的に見られるものであつて，原則的には工学乾燥に於ける固体の乾燥[5]の如く，凍結乾燥に於いてもその乾燥過程は，恒率乾燥過程と減率乾燥過程とから成り，種々の条件によつて各過程が伸縮したり，減率乾燥過程が更に2段或いはそれ以上に分れるものであると述べている。

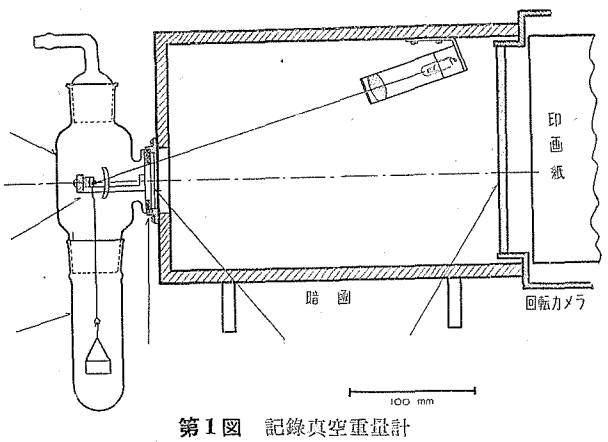
根井等は，前に述べたスプリング秤法によつて，血清，水，ナイロンスポンジに吸水させたもの等について実験を行い，恒率乾燥過程と減率乾燥過程とが比較的はつきり区別できるものもあり，又始めから減率乾燥過程のように見えるものもあると報告している。

欧米に於いても，凍結乾燥に於ける脱水量時間曲線を描いたものは2，3見られる。即ち Taylor (1945)[6] は神経組織の凍結乾燥に於いて，乾燥中の試料をある時間毎に取出して重量測定を行い，Ede (1947)[7] は green peas の凍結乾燥に於いて spring balance を用い，Jansen (1954)[8] は種々な組織の凍結乾燥に於いて simple wire torsion balance を用いて夫々乾燥経過を観察している。しかし，これらのものはすべて実用的な意味で乾燥終了の目安とするために描かれているに過ぎないのであつて，著者の目的としているような乾燥過程の詳細な解析は殆んどなされていない。

著者は最近我々が考案製作した記録真空重量計を使用し，凍結乾燥過程を比較的系統的に，しかも或程度定量的に解析することが出来たのでここに報告する。

II. 実験装置，材料及び方法

1) 実験装置　これの精しい構造とその性能についてはすでに発表[9),10)]したので，ここでは簡単に説明する。即ち試料の乾燥による重量変化を燐青銅のストリップの捻れの変化としこの捻れがこのストリップにはり合わせた小さい鏡の角度の変化となり，この鏡によつて反射させた光点の位置のずれを回転カメラにより自動的に印画紙に記録するようになつている。第1図及び第2図に於いて，試料を入れた容器1を取付けると，その重量によつてストリップ2に捻れを生ずる。その捻れがストリップの反対側にはりつけた小さな鏡3の方向を変化させ，光源4からの光がこの鏡に反射して，回転カメラの印画紙5に結ぶ光点の位置が変化する。このようにして描かれた曲線は第3図のようになり，乾燥終了と共に水平の直線を描く。

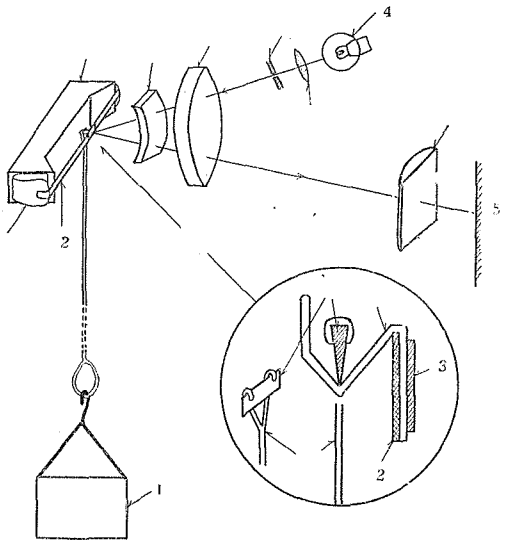


第1図　記録真空重量計

真空ポンプは，油回転真空ポンプ 250 ℓ/min. を単独に使用し，

特に必要のある場合のみ油拡散ポンプを併用した。単独に用いたときの到達真空度は 3×10^{-3} mmHg, 油拡散ポンプ併用時は 6×10^{-5} mmHg であつた。

コールドトラップには液体窒素を使用した。試料を入れる容器は，初めポリスチロールの薄板を用いて自製したが，これは厚さが不均等であり，又液体窒素の中に直接浸して予備凍結を行なう際にしばしば破壊するので，後には写真フィルムを用いて自製した。形状は円形平底で，半径は実験目的により種々に変えて製作した。この容器の形は，普通のアンプレのような底が不定形のものよりも乾燥過程の解析には結果的に極めて好都合であつたが，このことについては又後で触れることになろう。



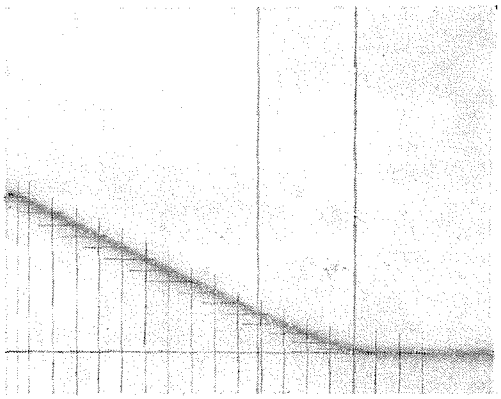
第2図　記録真空重量計の作動説明

2)　実験材料　　ほぼ凍結時の原形を保つたまま，スポンジ状に乾燥して行く処の，即ち凍結乾燥に対して典型的態度を示す血清（兎）を主として用いた。尚これと比較対照するために，50 mg/cc 及び 100 mg/cc の大腸菌液や蒸溜水も使用した。

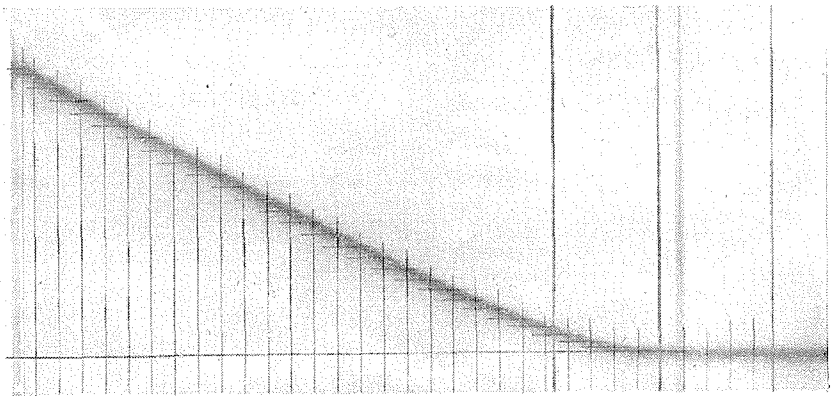
3)　実験方法　　予備凍結は，試料を入れた容器を −35℃ の低温室に約 15～16 時間放置して凍結させるか，又は直接液体窒素中に浸けて凍結した。この場合には容器をできるだけ水平に保つように注意した。又余り急速につけると容器が壊れるので，数回浸けたり出したりを繰返し，凍結が完了してからなお約 30 秒は液体窒素中に置いて，試料温度がほぼ液体窒素と同温度になつたと思われる時期に取出した。この間約 1 分間である。低温室又は液体窒素中から取出した試料は，空中の水蒸気が霜となつて附着することを防ぐために，できるだけ手早く装置に取付けて減圧を開始した。

実験が終了して得られた第 3 図の如き曲線は即ち脱水量時間曲線である。これに予めこの回転カメラについて測定して製作して置いた尺度によつて 5 分毎（時に 10 分毎）の目盛を書き入れて，5 分毎の発蒸量と残水量を求め，計算により単位時間蒸発量の全蒸発量に対する割合（%/min.）を求めてこれを乾燥速度とし，残水量の全蒸発量に対する割合即ち残水率（%）を求めて，乾燥速度時間曲線並びに乾燥速度残水率曲線（乾燥速度特性曲線）を得ることができる。乾燥過程について論ずるには，大低の場合乾燥速度残水率曲線のみで充分であるが，時に乾燥速度時間曲線が問題になることもある。

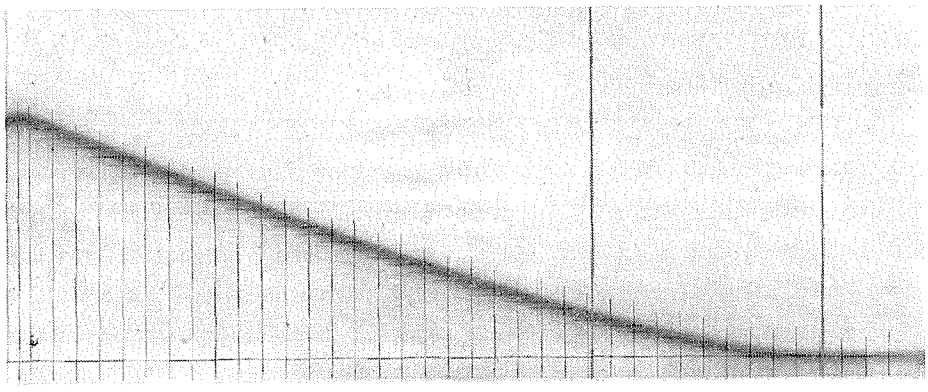
この実験に於いて，唯一の問題とするに足るしかもかなり大きな誤差は製図によるものであつた。これは細心の注意を以て製図するより他にその防止手段はないが，更に実験はすべて



(1) 兎血清 0.2 cc, 試料容器半径 7.75 mm



(2) 兎血清 0.4 cc, 試料容器半径 7.75 mm, 水槽温度 0℃, 回転カメラ 1/2 減速



(3) 兎血清 0.3 cc, 試料容器半径 6.25 mm

第3図 記錄真空重量計による乾燥過程の記錄 (脱水量一時間曲線)

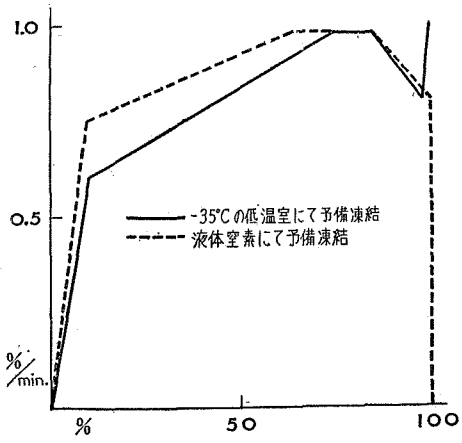
同一条件のものを3回行ない，夫々の乾燥速度時間曲線及び乾燥速度残水率曲線を求めてから，その3回の平均をとることによりできるだけ誤差を少くした。

III. 実験成績

A. 兎血清

1) 予備凍結の方法及び温度の乾燥過程に及ぼす影響　　試料0.4 ccを半径8.75 mmのポリスチロール製容器に入れ，−35°Cの低温室中にて比較的徐々に凍結した場合と，直接液体窒素に浸けて比較的急速に凍結した場合，及びこのようにして急速凍結を行なつた試料を約1時間−35°Cの低温室に放置した場合の3通りの実験を行なつた。何れも凍結状態のままひきつづき燥乾過程に移つたことは前述の通りである。

結果は第4図に示されているように，−35°C低温室で予備凍結を行なつたもの及び液体窒素で予備凍結を行なつた後に−35°Cの低温室に約1時間放置したものでは，急速な乾燥速度の低下を以て乾燥が始まり，液体窒素で予備凍結を行なつた後すぐに乾燥を開始したものでは，急速な乾燥速度の上昇を以て始まつた。これは佐原のいう所謂準備段階であろう。



第4図　予備凍結の方法が乾燥過程に及ぼす影響

次に予備凍結の方法に関係なく乾燥速度上昇の段階があらわれた。これは現在迄全く見られたことのない段階であつて，今仮に増率乾燥過程と名付けておく。この段階は小さなフィルム製容器を使用した場合は殆んど出現しない。

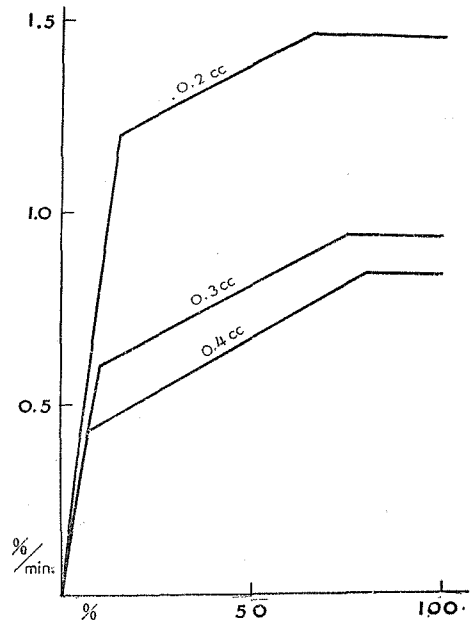
とにかく予備段階をも含めてここまでの過程は便宜上図の上に表わさないことにする。その方が問題を複雑にせず図も理解し易くなるからであつて，何れ後でくわしく説明する。

増率乾燥過程の次には，すでに佐原が主張したような恒率乾燥過程，減率乾燥過程第1段階及び第2段階が見られた。夫々の移行部の折点を第1限界点及び第2限界点と名付けておく。

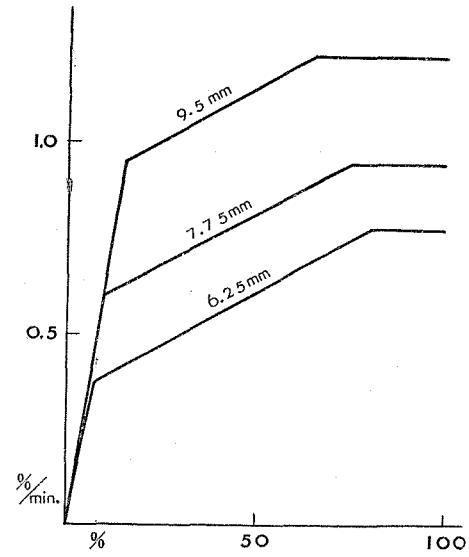
液体窒素で予備凍結を行なつたものの方が，恒率乾燥過程が幾分長く，又全般的に見て乾燥能率が僅かながら良いようであつた。液体窒素で予備凍結を行なつた後，−35°Cの低温室に約1時間放置したものは，準備段階を除いては，液体窒素で予備凍結を行なつた後直ちに乾燥を始めたものと全く同じ乾燥過程を辿つた。

2) 試料容積が乾燥過程に及ぼす影響　　容器はフィルム製で半径は7.75 mm，予備凍結は液体窒素によつた。容積は0.2 cc，0.3 cc，0.4 ccの3通りの場合について夫々行われた。

結果は第5図に示されているように，試料容積が小さくなればなる程，恒率乾燥過程と減率乾燥過程第2段階がのび，従つて減率1段は縮んで来た。しかも減率1段は何れの場合も殆



第5図 試料容積が乾燥過程に及ぼす影響



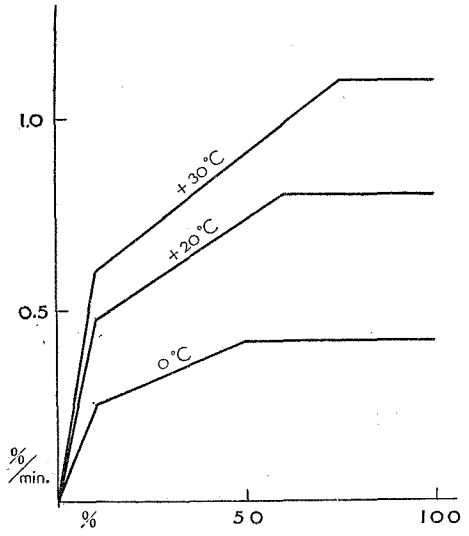
第6図 試料容器半径が乾燥過程に及ぼす影響

んど平行関係を示した。即ち減速度(広い意味での加速度)が同じであることになる。

3) 試料容器半径が乾燥過程に及ぼす影響

試料容積は 0.3 cc, 容器はフィルム製で半径は 9.5 mm, 7.75 mm, 6.25 mm のものを夫々使用した。予備凍結は液体窒素によつた。

結果は第6図に示されているように，半径が大きくなればなる程，恒率と減率2段が長くなり，従つて減率1段は短くなつた。そして減率1段が平行関係を示したこともすべて前の実験の試料容積を小さくした場合と同じ傾向を示した。



第7図 水槽温度が乾燥過程に及ぼす影響

4) 水槽温度の乾燥過程に及ぼす影響

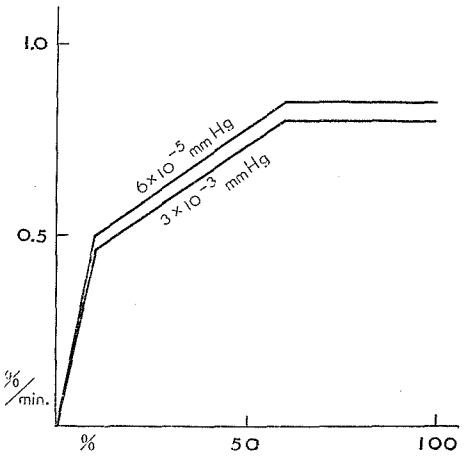
試料の外套ガラス管(冷却管)を，夫々 0°C, +20°C, +30°C の水槽につけて乾燥を行なつた。試料容積は 0.4 cc, 容器はフィルム製で半径 7.75 mm, 予備凍結は液体窒素によつた。

結果は第7図のように，水槽温度を高くすれば一般に乾燥速度は高くなつたが，恒率過程は短くなつた。これは前の実験で，乾燥速度が高くなると共に恒率過程が伸びたのと丁度反対

の結果である。しかも減率2段は何れの場合も殆んど同じ長さであつた。又減率1段も夫々平行関係は示さず，水槽温度が高くなれば減速度は急になつた。

5)　真空度の乾燥過程に及ぼす影響

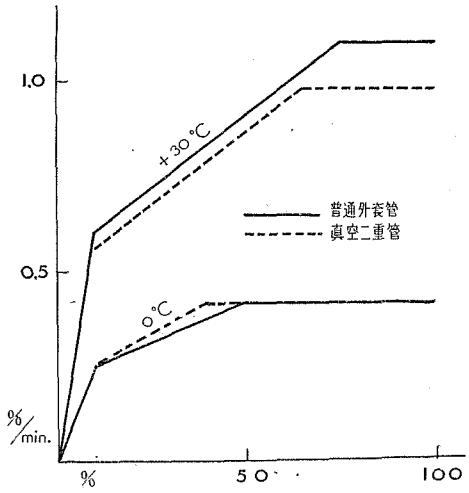
試料容積は0.4 cc, 容器はフィルム製で半径7.75 mm，水槽温度は＋20°C，予備凍結は液体窒素によつた。実験は他のすべての実験の場合と同様に，油回転真空ポンプを単独に使用した場合と，特に油拡散ポンプを併用した場合について行なつた。前者の場合到達真空度は 3×10^{-3}，後者の場合は 6×10^{-5} であつた。



第8図　真空度が乾燥過程に及ぼす影響

結果は第8図に示すように，真空度の高い方が乾燥速度は僅かに上回つたが，これ位の真空度の差では，あまり大きな相異は見られないようである。各乾燥段階の長さも殆んど同じであつた。

6)　試料の外套ガラス管を真空二重管とした場合の乾燥過程に及ぼす影響　　周囲から試料に及ぼす熱の輻射を防ぐために，普通の一重のガラス管の代りに，内部を銀渡金した真空二重ガラス管を用いて実験を行なつた。しかし熱の輻射を全く遮断することは不可能であり，どうしても外気温度の影響を受けることを予想して，この真空二重管を更に各温度の水槽に浸けて実験を行なつた。



第9図　真空二重管を用いた時の乾燥過程に及ぼす影響（血清）

試料容積 0.4 cc，容器はフィルム製で半径 7.75 mm，予備凍結は液体窒素によつた。水槽温度は 0°C と ＋30°C の場合について夫々行なつた。

結果を普通ガラス管の場合と比較して第9図に示してある。0°C の場合は両者の間に殆んど差が認められず，僅かに恒率がのびたのみである。＋30°C の場合は，普通ガラス管の場合よりも乾燥速度は一般に低下したが，恒率は矢張り幾分長いようであつた。

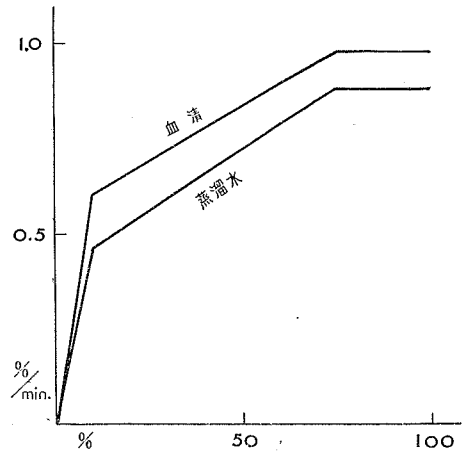
B.　蒸 溜 水

1)　血清の乾燥過程との比較　　試料容積は共に 0.4 cc，容器はポリスチロール製で半径は 8.75 mm，予備凍結は液体窒素によつた。

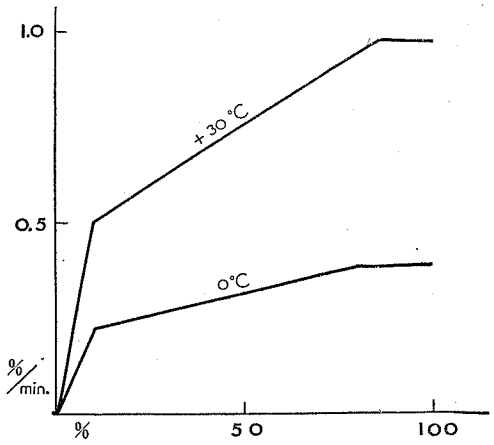
結果は第10図に示すように，血清の方が蒸溜水よりも一般に乾燥速度が高かつたのみで，各乾燥段階は蒸溜水の場合にもすべて出現し，しかも夫々の段階はこの実験に於いては殆んど同じ長さを示した。

2) 水槽温度の乾燥過程に及ぼす影響　試料容積は 0.4 cc，容器はフィルム製で半径は 7.75 mm，予備凍結は液体窒素により，水槽温度は 0°C，+30°C の場合について夫々実験を行なつた。

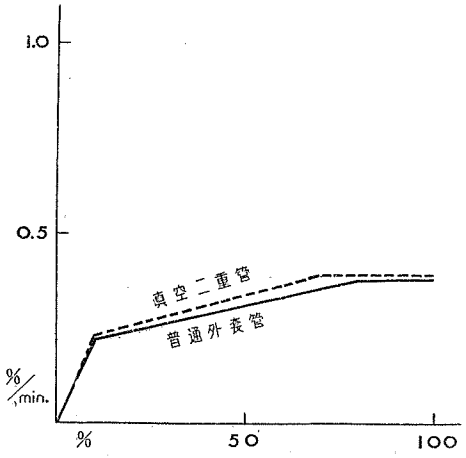
結果は第11図に示すように，+30°C の方が乾燥速度は高いが，血清の場合と異り，恒率過程は 0°C の場合僅かに長いようでもあるが大差はなく共に極めて短かかつた(増率を含めてある)。減率2段は血清の場合と同じで，0°C の場合も +30°C の場合も変化は認められず，減率1段の減速度は +30°C の方が大きかつたのは血清の場合と同じであつた。



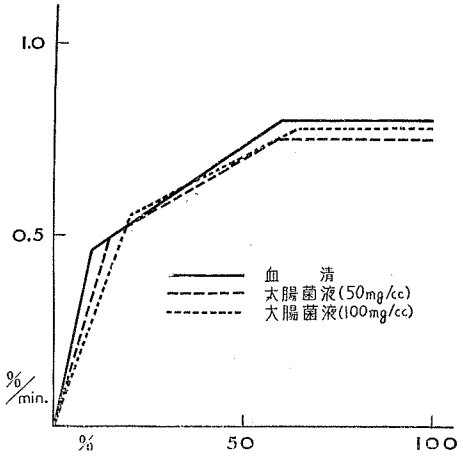
第10図　血清と蒸溜水の乾燥過程の比較



第11図　水槽温度が蒸溜水の乾燥に及ぼす影響



第12図　真空二重管を用いた時の乾燥過程に及ぼす影響（蒸溜水）



第13図血清と大腸菌液の乾燥過程の比較

3)　真空二重管を用いた場合の乾燥過程に及ぼす影響　　前と同じ実験条件で，水槽温度0°Cの場合についてのみ行なつた。

結果は第12図に示すように，　矢張り血清の場合と同様両者の間に殆んど相違は認められず，ただ恒率が僅かにのびたようであつた，

C．大腸菌液

大腸菌液の乾燥過程を血清と比較した。大腸菌液は50 mg/cc と100 mg/cc のものとを用いた。試料容積はすべて0.4 cc，容器はフィルム製で半径7.75 mm，予備凍結は液体窒素により，水槽温度は＋20°Cに保つた。

結果は第13図に示すように，　3者の間には著しい相違は認められず，恒率の長さも大差なかつた。ただ僅かに50 mg菌液よりも100 mg菌液が，100 mg菌液よりも血清が乾燥速度が高かつた。又今迄に見られないで初めて現われた現象は，減率2段の長さの変動であつて，血清よりも50 mg菌液の方が，更に100 mg菌液の方が長くなつた。

IV．考　　察

生物材料の凍結乾燥法が，あらゆる自然科学の領域に於いて広く利用されている現在，その乾燥の機構がまだ多く未知のままに取残されているということは，凍結乾燥の将来に一つの困難と不安を抱かしめることにもなる。又たとえ乾燥過程の詳細な追求によつて，乾燥速度にいくつかの段階があることを知り得たとしても，それが果して何を意味するのかということが分らなくては，その解析は意義が少い。すでに述べたように，内藤が総合的研究によつて初めて乾燥過程に数式を以て一定の形態を与え，更に佐原が極めて詳細に多種多様な因子の影響について研究を進め，凍結乾燥過程にも固体乾燥に於けるような各種の段階があることを指摘し，乾燥の機構について或程度の解明を与えたことは，大きな功績といわなければならぬ。

ただ凍結乾燥に於いては，固体乾燥に於けると同様な物理的因子による一定の影響の他に，時々刻々に変化する試料温度及びその勾配，真空度，容器の性質及び形状等真に複雑な諸因子がからみ合つて，その解析を一層困難ならしめているわけである。これらの複雑な諸因子をすべて明快に解析し，全く物理学的又は数学的に完全に凍結乾燥過程を表現することは先ず不可能であろう。ただこれらの因子を，除けるものは除き，除けないものはできるだけ単純化して，主要な因子による影響を選択的に取出してその傾向を比較検討することが我々に残された方法である。そういう意味からいつて，すでに述べたように著者が用いた試料容器の形と，それが真空中に吊下げられて外気からの熱伝導が遮断されているということは，底の丸い不定形なアンプレを室温にむきだして行なう実験よりも，はるかに複雑な諸因子が整理され，そのためか乾燥機構についても比較的統一された解釈を得ることができ，又或る程度定量的に乾燥過程を解析し得たと思つている。

今回の実験に於いて見られた乾燥過程の各段階は，出現したものすべてを述べると（敢て典型的乾燥過程とはいわない），1) 準備段階，2) 増率乾燥過程，3) 恒率乾燥過程，4) 減率乾燥

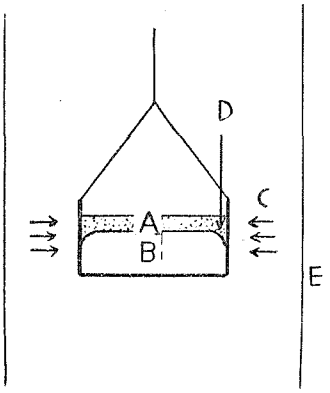
過程第1段階，5) 減率乾燥過程第2段階の5つの段階であつた。尚この他に減率2段の終り頃に，プロットした点が密集して区別されるような段階を示した場合もあるが，これはすでに実験成績の処で，しばしば図示したようなグラフのスケールのとり方では実験誤差の振れよりも小さく，その折点もはつきりしないので，この乾燥速度残水率曲線に書入れるのは適当でない。この場合は乾燥速度時間曲線について討論することになろう。以下各乾燥段階について討論を進めて行く。

準備段階については，すでに根井や佐原が乾燥過程中の試料温度を温度計や熱電対で経時的に測定して明にしたように，試料温度が比較的高い場合には乾燥開始と共に速かな蒸発が起り，その大量の蒸発によつて大量の気化の潜熱が試料から奪われ，試料温度は速かに低下する。この温度の低下と共に蒸発速度も急速に低下し，周囲からの熱の供給（主に輻射）と蒸発による熱の放出とが平衡に達して前段階は終了する。試料温度が比較的低い場合には，乾燥が開始されても発蒸は極めて僅かしか起らず，蒸発による潜熱の奪われ方も極めて少なく，周囲からの熱の供給によつて試料温度は急速に上昇する。この上昇と共に乾燥速度も上昇して行き前に述べたような平衡に達して前段階は終了することになる。結局乾燥開始時の試料温度の相違は，前段階の相違となつて現われ，前段階を経過することによつて均一化されることになるわけである。従つて第4図で明かなように，乾燥開始時の試料温度が前段階以後の乾燥経過に影響を与えることは全くない。

第4図に於いて，液体窒素によつて急速に予備凍結を行なつたものの方が乾燥速度が高いのは温度による影響を除外し得るから，その原因はどうしても凍結した試料の内部構造に求めなければならない。急速凍結の場合の氷結晶の大きさは，緩慢凍結の場合よりも小さいことはすでに知られているし，実際乾燥が終了したスポンジ状の血清を割つて肉眼的に一見しただけで前者は極めて細かな構造を示し，後者は比較的粗い構造を示していることが分る。若し何れの凍結方法によつても氷として結晶する水分量が等しいとすれば，氷の結晶が小さい方がその呈する全表面積が大きいから，従つて蒸発表面積が大きいことになり理解できるが，そのほかにスポンジ状になつた個々の間隙の連結のしかたやその間隙と間隙との間の壁の厚さ等も関係してくることであろう。ただここで問題になるのは，予備凍結によつて氷として結晶析出される水分量の問題である。液体窒素による場合は，一応試料中の凍りうる全水分が氷になると考えるとしても，—35℃で果して全水分が凍結するものであろうか。もし一部の水分が濃厚な溶液の状態で存在しているとすれば，その部分の乾燥は典型的なスポンジ状を示さないことになり乾燥速度を低下させることも考えられる。

次に増率乾燥過程とも称すべき段階が現われたことは，従来その記載がなかつたことだけに意外であつた。この段階は，準備段階とは全く別個のものであることは第4図で明らかである。その成因を初めは，乾燥開始時には蒸発表面は試料の表面である一平面にすぎないが，乾燥が進んで次第に深部に達するにつれて乾燥表面が立体的になり，従つて全体として蒸発表面積が拡大するためであると考えていた。ところが第4図の説明ですでにのべたように，これは

ポリスチロール製の半径 8.75 mm の容器を使用したときだけ見られる現象であつて，以後の実験に於いて半径 7.75 mm の場合にはその長さが短く或いは時に現われず，又これと同じ大きさのフイルム製容器を使用した場合には常に殆んど見られなくなつた。又血清の乾燥過程を透明なポリスチロール製容器の側壁を通してよく観察していると，乾燥が終了したスポンジ状の部分と，未乾燥の凍結部分とは極めて明瞭な一線を以つて境され，顕微鏡的には或る一定の幅を以つて乾燥が進行しているのかも知れぬが，決して厚い深さに亘つて立体的に乾燥が進行しているようには見えない。又この増率乾燥過程は，蒸溜水の凍結乾燥の場合にも出現した。以上のいろいろな事実からその成因は，周囲からの輻射熱によつて容器周辺に沿つて生ずる“堀れ”のための蒸発表面積の拡大によるものと考えるのが至当のようである（第 14 図）。従つて容器半径によつて影響され，又透明なポリスチロールと現像済の薄黒色のフイルムとではその熱の透過性の点でも，又その熱容量の点でも相当の違いがあることは容易に考えられることである。従つて半径 7.75 mm のフイルム製容器を用いた場合にはこの“堀れ”は極めて僅かであり，“堀れ”の上部の乾燥終了層の熱吸収及び蒸発に対する抵抗等が更に“堀れ”の生成を制限するように働くから，まず殆んど“堀れ”が生じないと見做して良いものと思われる。これに対して蒸溜水の場合には，血清のような乾燥終了層の熱吸収及び蒸発に対する抵抗もなく，“堀れ”はますます増大して行くものと考えられるが，これについては後に再び述べる。とにかく凍結乾燥に於いては，周囲から熱が供給される限りこの“堀れ”の問題が生ずるであろうし，ましてガラス製アンプレを室温にむきだしにして乾燥を行なうような場合には，一層問題を複雑にすることになろう。

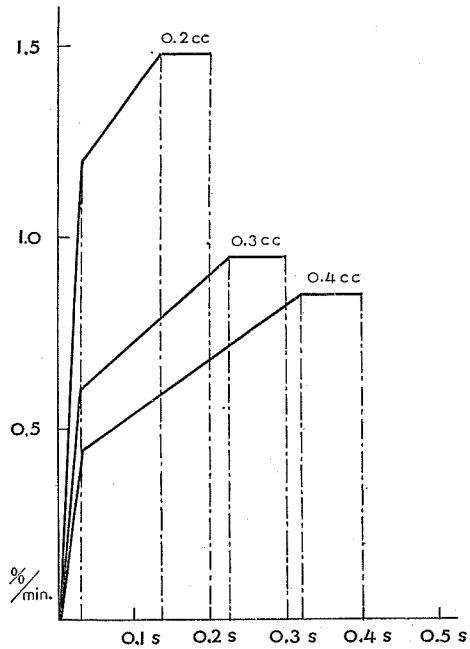


第 14 図　周囲よりの輻射熱に依る“堀れ”の形成を示す
A：乾燥終了部分，B：未乾燥凍結部分，C：輻射熱，D：“堀れ”，E：外套ガラス管

第 5 図に於いて，試料容積が小さくなれば乾燥速度は高まり同時に恒率と減率 2 段が伸びてきたが，これと同じ傾向が第 6 図に於いて容器の半径を大きくした時に見られた。しかも減率 1 段の傾斜は何れの場合もすべて同様であつて，減速度が同じであることを示した。これは試料容積とその蒸発表面との関係という一つの因子にしぼつて考えると良いわけで，この 2 種の実験は実は同じ意味を示していることになる。即ち他の条件が一定ならば，蒸発表面と試料容積との比が大となれば乾燥能率は高くなり，恒率と減率 2 段はのび，減率 1 段は縮み，その減速度は一定である。

ところが，第 5 図の横軸に残水率の代りに残水量をとつて見ると第 15 図のようになり意外のことに気が付いた。即ち恒率による脱水量と減率 2 段による脱水量は夫々 0.07 cc，0.075 cc，0.08 cc と 0.03 cc，0.03 cc，0.028 cc で何れの場合も夫々殆んど等しいことである。試料の多少は，ただ減率 1 段による脱水量の多少となるだけである。この場合容器の半径が同じであ

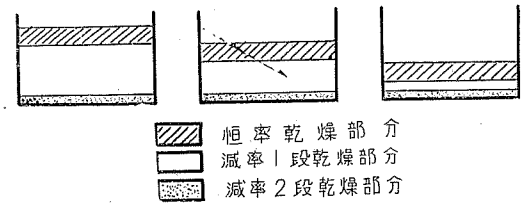
るから，乾燥が開始されて恒率乾燥過程を示す深さが一定であり，次に減率1段があり，この深さは試料容積により異なるが，最後に再び減率2段を示す一定の深さが存在することになる(第16図)。即ち或る一定の深さ迄は恒率乾燥が行なわれるが，その後は乾燥終了部分が水蒸気分子の通過を妨げ，蒸発の抵抗となり乾燥速度が低下する。これが減率1段であると考える。この抵抗は層の厚さと共に増大するがその割合は何れの場合も全く同じ筈である。即ち減速度は等しいわけである。そして遂に乾燥表面は容器の底面に達し，その乾燥と共に急激な蒸発表面の縮小となり，明らかな折点を境として減率2段に入る。このように説明すれば，第1限界点は比較的不明瞭であつても第2限界点は比較的明瞭であることが納得できる。



第15図 試料容積の変化に依る乾燥速度残水量曲線(血清1 cc よりの蒸発水分量をSとす)

第17図は，第6図の横軸を残水量に直し，この場合には容器の半径が夫々違うので計算によつて深さに換算したものである。そうすると前の場合と全く同様に，容器の半径に関係なく，恒率と減率2段を示す深さは一定になつてくる。結局恒率乾燥過程とは，乾燥終了層が未だ水蒸気分子の移動に対して抵抗とならない間の乾燥であり，或る一定の深さになつて抵抗となり乾燥速度が次第に低下するのが減率乾燥過程第1段階であり，底面の乾燥が減率乾燥過程第2段階であると推論できる。

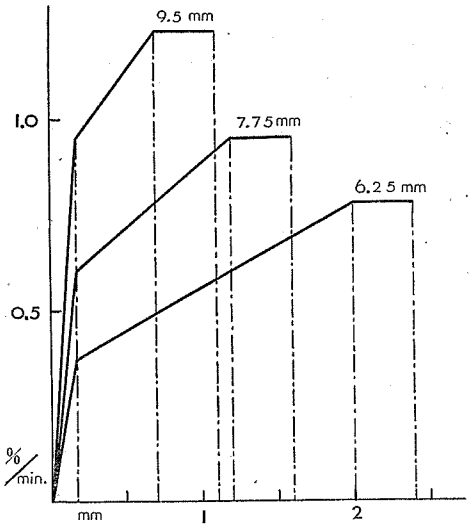
勿論ここでも，すでにのべた“堀れ”が減率1段の始まりの部分を打消して恒率を延長したり，“堀れ”が底面に達してからの蒸発表面積の縮小による乾燥速度の低下が，本来の減率1段の乾燥速度の低下に加わつて，減速度を高めること等も考えられるわけだが，試料が血清の場合はすでに述べたようにこの“堀れ”の影響は極めて小さいものと考えてさしつかえないようである。



第16図 同一容器で試料の容積の異なる場合，各乾燥段階を示す部分の深さの関係を示す

又試料容積の大小によつてその総熱容量も変つてくるし，試料が熱の輻射をうける側面積も夫々異なつてくるから，当然各恒率及び減率2段の深さも計算上全く一致するわけではない。ことに試料容積が0.2 cc とか，容器半径が9.5 mm になつたりして，試料の深さが極めて浅い場合には，こ

れを予備凍結すると，試料は主に容器の周辺部分に片寄つて凍結され中央部は低くくぼんだ形になつて蒸発表面積に誤差を生じてくる。以上のような理由からか試料が余り浅い場合と，あまり深くて側面積が大きくなるような場合には誤差がやや大きいようであつた。従つて試料容積 0.2 cc 以下は行なわなかつたし，0.4 cc 以上はこの実験装置の測定限界を越えているので行なつていない。



第17図　試料容器半径の相違に依る乾燥速度残水量(深さ)曲線

しかし，理論的に更に第5，6図について考察すると試料容積が次第に増加するか，容器の半径が小さくなるかして乾燥速度が低下してくると，恒率と減率2段は次第に縮んできて遂には殆んど消失し，原点を通る減率1段の1直線のみによつて表現される場合が考えられる。これが即ち内藤の曲線である $y=W\cdot e^{-\alpha\theta}$ なる脱水量時間曲線を乾燥速度残水率曲線に直した場合の形態であつて，この場合には確かに佐原が述べているように，内藤の曲線は極めて乾燥能率の悪い場合に近似的に表わされたものであろう。しかし反対に試料容積が次第に小さくなるか，容器の半径が大きくなるかしていくと，減率1段は遂に消失して恒率から直ちに減率2段に入るような乾燥形態を示すようになり，この点を境として恒率が反対に縮み始め，遂には原点を通る減率2段の1直線で表現されるようになる(試料層が極めて薄くて，乾燥開始と同時に底面の乾燥が始まり，急激な蒸発表面の縮小のみにて終始することになる)。これは極端に乾燥速度が良くて，しかも内藤の曲線にて表現されるような場合である。結局凍結乾燥過程には，原則的な出現形態などというものはなくて，種々の条件によつていろいろの段階が複雑に組合つて出現し，その中には内藤の曲線にて表現されるような場合もあるということになる。

しかも，これらの各乾燥過程が，今迄述べたように純粋に物理的な要因によつて出現するものであるとすれば，これらの乾燥速度残水率曲線の各段階及びその折点をグラフで追跡することが出来るわけで，その結果が第18図及び第19図に示されている。

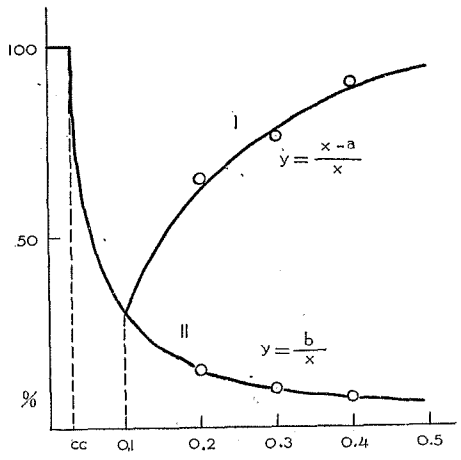
第18図に於いてIは第1限界点の推移を表わす曲線であつて

$$y=\frac{x-a}{x} \qquad (1)$$

なる式で与えられる。ここに x は試料容積であり，y は残水率を100で除した値であり，a は恒率乾燥部分の体積であつて一定である。IIは第2限界点を表わす曲線であつて

$$y=\frac{b}{x} \qquad (2)$$

なる式で与えられる。ここに b は底の乾燥部分の容積であり一定である。又(1)式が成立するには $x \geq a+b$ でなければならず，(2)の場合は $x \geq b$ でなければならないことはすでにのべた各乾燥過程部分の意義からいつて当然のことである。(1)式(2)式を解けばこの2曲線の交点に於ける x，y が夫々求まり，この値は減率1段部分が消失して恒率から直ちに減率2段に入る時の試料容積即ち $x=a+b$ のときを表わしていて実際に計算によつて求めたこの値 $(a+b)$ は，この図から求めた値とほぼ一致した。この点からは，第1限界点は第2限界点の表わす曲線にのり，$x=b$ 即ち底の乾燥が最初から起るような場合に至つて恒率乾燥部分は消失し，$y=1$ となつてあとはいくら試料容積を小さくしても，第5図に於いて常に残水率100%の線上より出発して原点を通る直線にて表わされるようになる。



第18図 試料容積の相違に依る第1及び第2限界点残水率曲線

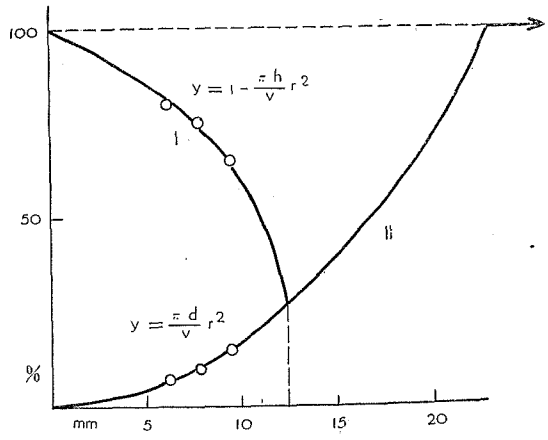
第19図も，本質的には第18図と同じであるが，第1限界点は

$$y = 1 - \frac{\pi h}{V} r^2 \qquad (1)$$

第2限界点は

$$y = \frac{\pi d}{V} r^2 \qquad (2)$$

なる式で表現される。ここに y は残水率を100で除した値であり，h は恒率乾燥部分の深さ，V は試料の容積，r は容器の半径，d は底の乾燥の厚さである。$V=0.3$ cc であり，h，d は計算により求められるから，IとIIが交わつた点即ち丁度恒率乾燥から直ちに減率2段に入る場合の r を計算で求めると，グラフから求めた値とほぼ一致した。これより更に r が大きくなるとIはIIに従つて変化し，$y=1$ 即ち試料容積 V の厚さが底面の乾燥の厚さになるような r より更に大きくなれば，第6図に於いて常に残水率100%の線上より出発して原点を通る直線を以つて表わされるようになる。

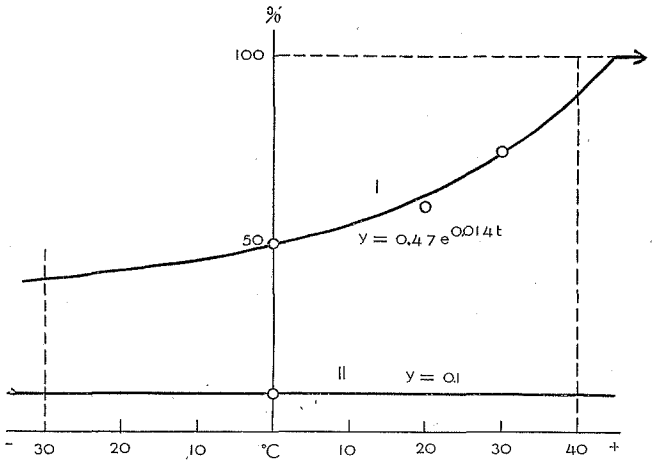


第19図 試料容器半径の相違による第1及び第2限界点残水率曲線

凍結乾燥に於いて，恒率，減率1段，減率2段の各乾燥過程が出現するような乾燥形態をとる場合には，あらゆる諸条件がきまれば，恒率と減率2段部分の試料の厚さと，減率1段の減速度は決定されるという結論に到達する。

次に試料の外套ガラス管を種々な温度の水槽につけて，熱の供給が乾燥過程に及ぼす影響を見た第7図に於いては，熱の供給が乾燥能率を促進することは一見して分るが，恒率過程が縮んでくることは，前の実験で試料容積と蒸発表面との関係に於いて示した恒率過程の態度と全く反対になつている。佐原がしばしば述べているような，乾燥能率が良ければ恒率乾燥過程が伸びてくるといつた考え方は，すでに述べたような種々な因子をすべて統合したまま数多く行なつた実験の結果として総括的に得られた概念であろうと思う。もつと個々の因子を独立的に吟味することが必要であり，そのためには，不定形のアンプレによる乾燥殊に室温にむきだしにしたような場合には不適当であろうし，アンプレ中にていろいろ試料の形を変える試みも，ただいたずらに混乱を増すのみで，何等本質的なものに触れる手掛りとはならないであろうと思われる。

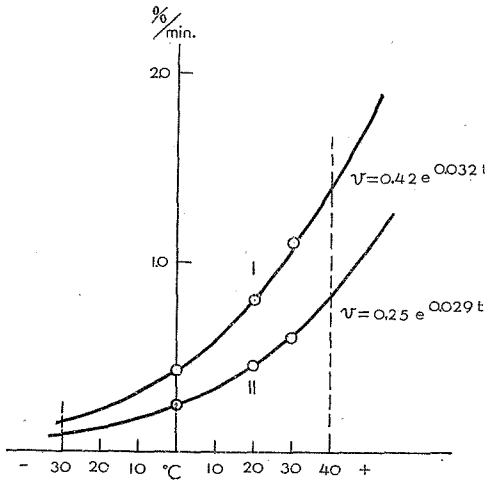
第7図に於いては，試料容積も容器の大きさも同じであるから，ここに表現されている各乾燥段階の長さはそのままその部分の容積及びその深さを示している。だから温度が高くなつて乾燥能率が良くなると，実際の試料の恒率を示す部分の厚さが薄くなるわけである。これは熱によつて水蒸気分子の移動速度が大になり，そのために薄い乾燥終了層の出現で速にこれが蒸発の抵抗となるものと考えられる。反対に温度が低くて乾燥速度がおそく，水蒸気分子の移動速度が小さい場合には，乾燥終了層がかなりの厚さになつても，それが抵抗とならないものと思われる。又減率1段に入つてからの減速度も水蒸気分子の移動速度の高い場合の方が高い。これに対して，減率2段を示す部分の厚さは殆んど相違を示していないのは，底面の乾燥という概念からいつて当然のことであろう。



第20図　水槽温度の相違による第1及第2限界点残水率曲線

この水槽温度の変化による第1及び第2限界点の推移を残水率と乾燥速度の両方から捉えて実験式を与えてみた。その結果が第20図及び第21図に示してある。

第20図に於いて，Iは第1限界点の推移を示し $y=0.47\,e^{0.014\,t}$ なる実験式で与えられた。ここに t は℃，y は残水率を100で除した値である。この実験条件では係数は0.47，指数は0.014と決つた訳だが，諸因子の変化によつては，指数が大きくなつてこの曲線の傾斜が急となり，或いは0℃の時の値が大となれば係数は大きくなる。又 $y\leqq 1$ であるから，$1=0.47\,e^{0.014t}$ を解けば t の限界が求められるわけであるが，実際には水槽温度を＋40℃以上にすれば試料が融けて了うし，又一方－30℃以下の低温恒温槽につけると殆んど乾燥が行なわれず，実験終了迄に非常な長時日を要することになる。

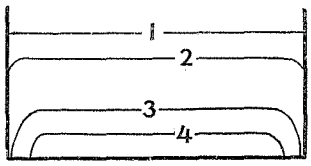


第21図 水槽温度の相違による第1及び第2限界点乾燥速度曲線

第21図は縦軸に乾燥速度をとつてみた。第1限界点は，$v=0.42\,e^{0.032t}$，第2限界点は，$v=0.25\,e^{0.029t}$ なる実験式が与えられた。ここに t は℃，v は蒸発速度 %/min. である。

水槽温度には，すでに述べたように或る範囲の限界があつて，この範囲外の実験は殆んど不可能だが，もし他の諸因子の調整によつて実験可能としたものとして第7図について理論的考察を進めるならば，温度を次第に低くすれば，恒率は次第に長くなつて減率1段は消失し，遂には凍結しない蒸溜水からの蒸発と同様に，長い恒率の後に直ちに減率2段が来る場合も考えられ，又温度を次第に高くすれば，恒率は次第に縮んで遂には消失し，減率1段の傾斜（減速度）は次第に急となり，遂には原点を通る1本の直線で表わされるようになることも考えられる。

次に蒸溜水の凍結乾燥過程であるが，以上のような乾燥機構の概念から考えると，恒率過程が主で，最後に底の乾燥である減率2段が現われると予想されたが，実験結果は意外にも第10図のように血清の場合と殆んど全く同じ乾燥過程形態を示した。ただ一般に血清より乾燥速度が下回つているのは，0.4 cc の血清から蒸発する全水分量は0.4 cc より少ないことによるものであろう。そうでなければ乾燥終了層の抵抗などのない蒸溜水の方が乾燥速度が高い筈である。



第22図 蒸溜水（氷）の乾燥に於いて“堀れ”の形成に依る蒸発表面積の変化を示す

この蒸溜水（氷）の乾燥過程の説明は，蒸発表面積の変化のみに頼らざるを得ない。又事実蒸溜水の乾燥をよく観察していると，“堀れ”が次第に深くなつて遂に容器の底面に達し，以

後次第に蒸発表面積が縮小して行く様子が分る(第22図)。結局氷の乾燥に於いては増率で始まり，僅かの恒率を経て減率1段となり，最後に血清の場合と同様な底面の乾燥である減率2段に入ることになる。即ち血清と蒸溜水がたとえ同じような乾燥態度を示したとしても，それは偶然の一致であつて，少なくとも恒率と減率1段の生成機構は異なつているのである。このことは蒸溜水の乾燥に於いて水槽温度を変えて行なつた実験により更に確かめられた。

即ち第11図で分るように，水槽温度を高くして乾燥速度を高めても，又反対に水槽温度を低くして乾燥速度を低めても，血清の場合と異なり，恒率の長さは殆んど変化がなくて短い(増率も含めてある)。だから比較的水槽温度が高い場合には，たまたま血清と蒸溜水は同様な乾燥過程を示すが，水槽温度を低くすると，両者の間には根本的な相違がはつきり現われてくる。蒸溜水の乾燥に於いては，水槽温度を低くすれば，全体として乾燥時間が延長するのみで，“堀れ”によつて生ずる各乾燥段階の長さの割合は変化しないものと思われる。

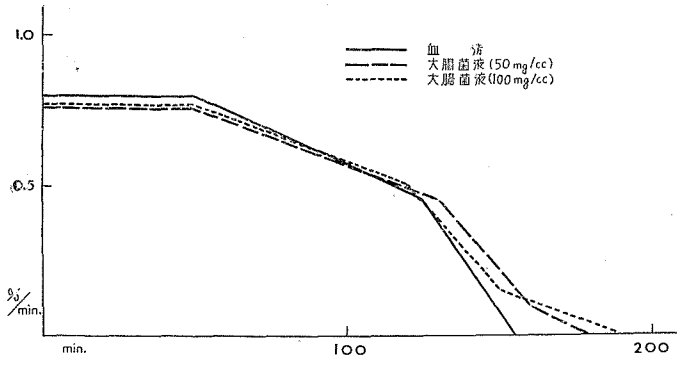
即ち或る温度では(例えば第10図のように)，偶然血清と蒸溜水は同様な乾燥過程を示すかも知れないが，乾燥機構の点からは，本質的相違があることが明らかである。

次に真空度の変化が乾燥過程に及ぼす影響を調べた実験では，第8図に示すように，真空度を高めた方が幾分乾燥速度は上回つているが，この程度の真空度の範囲内では，これ位の差は大してひびいてこないようである。恒率の長さも殆んど変化がないのは，真空度に事実関係がないのか，又これ位の差ではつきり現われないのか分らない。低真空でしかももつと真空度の差を大きくした比較実験が必要であろう。

すでにしばしば触れたように，“堀れ”の現象が凍結乾燥過程の解析を複雑化していることが分つたので，これを完全に除去することは不可能としても，或る程度又はなるべくこれを除いてみることは，他の現象との混乱を避け個々の現象を解析する上に必要である。この目的のために真空二重管を使用して実験を行なつたのであるが，結果は第9図，第12図のように，水槽温度が比較的高い場合には熱の輻射を或る程度防止するらしく，一般に乾燥速度が下回つているが，水槽温度が低い場合には試料が血清でも蒸溜水でも殆んど全く相違が見られない。恒率が何れの場合も僅かにのびているようであるが，蒸溜水の場合は“堀れ”の遅延のためと説明できるし，血清の場合も，僅かの“堀れ”の出来方の相違によるものか，或いは水槽温度を変えて行なつた実験と同様に，一般に乾燥速度が低下したための伸びと考えられる。何れにしても，真空二重管を使用しても熱はその外管や他の露出部分から伝導によつて内管に及び，そこから輻射によつて試料に与えられるらしく，明らかな違いは見られなかつた。

最後に生物材料として，血清以外に大腸菌液を用いて凍結乾燥を行なつたのであるが，一般に菌液の方が乾燥速度に於いて下回つているのは，同じ0.4 cc の血清よりも菌液の方が水分の全蒸発量が多いためであろう。従つて血清よりは100 mg 菌液が，100 mg 菌液よりは50 mg 菌液が乾燥速度が幾分かずつ低い。乾燥過程も血清の場合と同様に，恒率，減率1段，減率2段の3段階を示した。ただ異なつていることは，菌液は血清よりも減率2段がのび，しかも，50 mg 菌液よりも100 mg 菌液の方が長い。容器は同じものを用いたのだから底の乾燥量に相

違があるのは今迄の考え方に矛盾する。従つて菌液の場合には，減率2段の中には底の乾燥の他に何かが含まれていなければならない。即ち見かけ上乾燥した部分から，最終的に脱水される可成りの量の水分があることになり，これが菌体外部に密着した水分か菌体と菌体の間の狭い間隙に取囲まれた水分か或いは菌体内の水分かは不明としても，この菌液のメヂウムは蒸溜水であることなどから，最も常識的に考えて菌体内水分と考えておく。すると見かけの乾燥が底面に達しても菌体内水分は一部(或いは全部かも知れぬ)残つていて，底の乾燥と平行して或いは底の乾燥が終つてから菌体内水分の脱水は行なわれる。この合計されたものが菌液の場合の減率2段である。確かに菌液の場合の乾燥速度残水率曲線では，減率2段の最後の辺りでプロツトした点が密集して佐原のいう減率3段のような曲線が見られるようであるが，その傾向は極めて小さくて前にも述べたように，この図に書入れるのは適当でない。乾燥速度時間曲線を描いてみるとこの段階の存在が極めてはつきりする。これが第23図である。血清の場合は減率2段は殆んど直線的に終了するのに対して，菌液の場合(特に100 mg菌液の場合)は，減率2段に再び折点が現われて長く尾を引いている。これが見かけの乾燥より一足おくれておこつている菌体内水分の脱水と思われるわけである。この部分をとりだして更に詳細に解析するとか，他の種々の異なつた菌液と比較検討するとか，或いは又菌と同大同型の人工的粒子の浮遊液と比較して見るとかが，残された問題を解決する手掛りとなろう。とにかく，もし菌体内水分の脱水の程度が菌の生残率に大きな影響を与えるものとすれば，乾燥速度残水率曲線の生物学的意義は，真にこのあるかなしかの所謂減率3段にのみ存在することになる。その意味に於いても，この最後の段階をより精密に測定することが必要であつて，そのためには一層高感度の測定法を工夫しなければならないと考えている。



第23図　兎血清及び大腸菌液の乾燥速度時間曲線に依る乾燥過程の比較

乾燥速度残水率曲線の各段階が出現する機構が，殆んど全く物理的要因によるものであることが解明された現在，残された生物学的意義の問題は，殆んど菌液の凍結乾燥に於ける菌体内水分の脱水と，それが菌の生物学的性質に及ぼす影響ということに焦点がしぼられてきたといえるであろうし，又この問題の解明には，すべて乾燥速度特性曲線にのみ頼ることは危険であつて，形態学的な或いは生化学的立場からの定量的研究も平行して行なわれることが必要で

あろう。

V. 結　　言

生物材料の凍結乾燥に於いて，試料の経時的重量変化を光学系を用いて自記せしめ，この脱水量時間曲線から製図と計算によつて，乾燥速度時間曲線及び乾燥速度残水率曲線（乾燥速度特性曲線）を描いて凍結乾燥過程を解析し，凍結乾燥の機構について次の結論を得た。

1) 血清の凍結乾燥過程には，準備段階，増率乾燥過程，恒率乾燥過程，減率乾燥過程第1段階，及び第2段階が出現する。

2) 以上の諸段階は，種々の条件によつていろいろに組合されて或いは単独に出現する。凍結乾燥過程の典型的形態というものはない。

3) 準備段階は乾燥開始時の試料温度によつてきまり，増率過程は試料容器周辺に沿つて周囲からの輻射熱のために生ずる“堀れ”により生じ，恒率過程は乾燥終了層が未だ水蒸気分子移動の抵抗とならない間の過程で，減率1段は乾燥終了層がある深さに達して水蒸気分子移動に対する抵抗となつて生じ，減率2段は容器底面の乾燥であると考える。

4) 蒸溜水の凍結乾燥の場合も，血清と同じような各乾燥過程を示すが，この場合の各段階の生成機構は“堀れ”のみによるものであつて，血清の場合とは本質的に異なつたものである。

5) 大腸菌液の凍結乾燥に於いて，減率乾燥過程第3段階が現われた。この段階のみが菌体内水分脱水の問題とからんで，生物学的意義があるようである。

稿を終るに臨んで，終始御親切な御指導と御鞭撻を賜わりました根井教授に心から厚く御礼申し上げます。

文　　献

1) 内藤良一 1953 血清等の凍結真空乾燥法. 陸軍軍医学校防疫研究報告, 2部, 715号.
2) 佐原幸雄 凍結乾燥に関する基礎的研究, 第1報～第7報. 日本細菌学雑誌, ***8***, 611 (1953); ***9***, 125, 749, 963 (1954); ***10***, 151, 205, 907 (1955).
3) 根井外喜男・田村浩一 1950 生物学的材料の凍結真空乾燥法 I. 乾燥過程中の真空度と乾燥度及び温度の消長について. 北海道医学雑誌, ***25***, 200.
4) 根井外喜男・中川 勇・森 玄治 1955 凍結乾燥に於ける乾燥の機構. 含水量測定による乾燥過程の分析（予報）. 低温科学, 生物篇, ***13***, 59.
5) 亀井三郎 1948 空気の調湿及乾燥.
6) Taylor, A. C. 1945 The Rate of freezing, drying and rehydration of nerves. J. Cell. and Comp. Physiol., ***25***, 161.
7) Ede, A. J. 1949 Physics of the low-temperature vaccum drying process. Part I and II. J. Soc. Chem. Ind., ***68***, 330, 336.
8) Jansen, M. T. 1945 Testing the performance of a simple freeze-drying apparatus for histochemical purposes. Exp. Cell. Research, ***7***, 318.
9) 根井外喜男・吉本千禎・千葉重雄 1957 凍結乾燥に於ける乾燥過程の測定（特に真空中の重量測定について）. 真空工業, ***4***, 154.

10) 吉本千禎・千葉重雄・根井外喜男 1957 記錄真空重量計の試作. 低温科学, 生物篇, ***15***, 71.
11) Stephenson, J. L. 1953 Theory of the vacuum drying of frozen tissue. Bull. Math. Biophys. ***15***, 411.
12) Stephenson, J. L. 1954 Theory for the design of apparatus for tissues. Stain Technol. ***26***, 105.
13) Malmstrom, Bo G. 1951 Theoretical consideration of the rate of dehydration by histological freezing-drying. Exp. Cell Research, ***2***, 688.

Résumé

From the "dehydration-time curve" which was optically recorded on a revolving photographic paper by making use of a simple band torsion balance and which indicated the change in weight of the biological material during freeze-drying, the "rate of drying-time curve" and the "rate of drying-residual moisture content curve" were obtained by drafting and calculation.

The results obtained through analysis of these curves are as follows:

1) The freeze-drying process of rabbit serum is made up of five stages: (1) preparatory stage, (2) stage of increasing rate of drying, (3) stage of constant rate, (4) the first stage of decreasing rate, and (5) the second stage of decreasing rate.

2) These stages make their appearance separately or jointly, lasting long or short according as the contributing factors are varied. No definite type of freeze-drying has been observed.

3) Preparatory stage is determined by the temperature of the material at the outset of drying.

Stage of increasing rate of drying arises from the increase of surface area from which the evaporation occurs due to the development of "hollow" along the side wall of the container by a heat radiation from outside.

Constant rate of drying is maintained as long as the dried layer of the material does not prevent water vapor from passing through it.

The first stage of decreasing rate of drying appears for the period in which the dried layer prevents the vapor from passing through it. The second stage of decreasing rate of drying manifests itself while the surface of the material at the bottom of the container is being dried.

4) Also in the freeze-drying (i.e. sublimation) process of pure ice there appear various drying stages as descrived above.

The variation of these stages, however, is caused only by the change in surface area of ice due to the development of "hollow", so that the mechanism of appearance of these stages comes out essentially different from that of rabbit serum.

5) In the freeze-drying process of bacterial suspension of Escherichia coli, there appears a third stage of decreasing rate of drying, where a little moisture barely escapes from the material. It is to be considered that this stage corresponds to the period of dehydration from the bacterial cells and has some biological significance.