HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	微生物についての凍結乾燥と液状乾燥の比較
Author(s)	桜田, 弘一
Citation	低温科學. 生物篇, 16, 91-105
Issue Date	1958-12-05
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17612
Type	departmental bulletin paper
File Information	16_p91-105.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

Kōichi SAKURADA 1958 Studies on the Comparison of Freeze-Drying and Liquid-Drying of Microorganisms. *Low Temperature Science, Ser. B, 16.* (With English résumé p. 105)

微生物についての凍結乾燥と液状乾燥の比較*

桜　田　弘　一
(低温科学研究所　医学部門)

(昭和 33 年 7 月受理)

I. 緒　　言

生のままでは長期保存の困難な種々の生物学的試料も，これを凍結乾燥するとよく保存されることは既に周知の事実で，実際に多くの試料について応用されている。特に血清のようなものでは，液状からの乾燥を行うと膠状の固い製品となつて溶解が非常に困難であるのに反し，凍結乾燥を行えば乾燥は極めて容易でしかも海綿状の非常に溶解性のよいものが得られ，凍結乾燥は明らかに優秀な方法であることがよく判る。凍結乾燥が始めて考案された当時から，この血清と並んで微生物の凍結乾燥が実施されて来ているが，果して微生物殊に細菌のような生きた細胞の凍結乾燥を，生細胞を含まない均一な蛋白質溶液ともみなされる血清と同一に考えてよいかは問題があると思う。血清に於いては確かに凍結乾燥の優秀な点は承認できるが，これと全く異なつた性状の細菌などに於いても凍結乾燥が液状乾燥にまさつているかどうかについては充分再検討の必要があると考えられる。

この様な見地から過去に行われた数百篇に及ぶ凍結乾燥に関する文献を省るとき，これらの点についての吟味が案外に行われていないことに驚く。つまり従来はたゞ無批判に凍結乾燥法の方がまさつているものと判定されて来たように思われる。

近年に至つて僅かに Fry & Greaves[1], Stamp[2], Mazur & Weston[3], 等の業績中に液状乾燥の再検討をも試みたものがあるが，何れも充分な吟味とは思えなかつた。

そこで著者は細菌の浮游液を用いて凍結乾燥と液状乾燥の優劣の比較を行おうとした。そして種々の計画を立て，また実際にいくつかの実験を行つてみた結果，根本的な問題でいろいろな困難な点のあることに気づいた。特に凍結乾燥と液状乾燥とは互に全く異なつた状態から異なつた方法によつて脱水される過程であるから，何を基準にして両者の比較を行つてよいか理論的にも技術的にも多くの困難に遭遇した。そこで結局は主として生残菌数に影響する因子をとり上げることとし，乾燥過程の諸条件の吟味に主眼点をおいて実験を行つた。

* 北海道大学低温科学研究所業績　第 444 号

II. 実験材料，装置及び方法

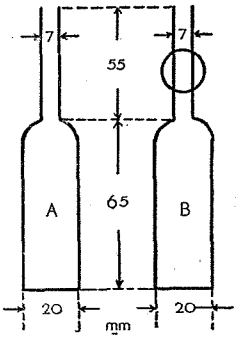
1. 実験材料

実験材料には *Escherichia coli*，及び *Saccharomyces cerevisiae S.* 214 株の蒸溜水浮游菌液を用いたが，*E. coli* はルー氏培養瓶又は茄子型培養瓶を用いて肉エキス・ペプトン寒天培地に接種し，37°C，24 時間培養で生じた菌苔を採り，蒸溜水で 4,000 r.p.m. の遠心洗滌を 3 回行つて休止菌としたものを化学天秤で湿菌重量を測定して 1 cc 中に湿菌量がおよそ 50 mg になるように蒸溜水に再浮游させた。*S. cerev. S.* 214 では麦汁寒天培地に 27°C，24 時間培養のものを蒸溜水で 3,000 r.p.m. の遠心洗滌を 3 回行つて，凍結乾燥の際の菌の飛散を防ぐため 1 cc 中の湿菌量がおよそ 400 mg の菌濃度をもつた蒸溜水浮游菌液とした。

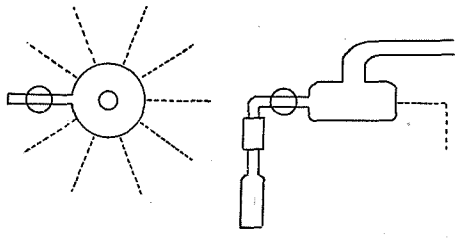
2. 実験装置及び方法

1) 液状乾燥装置とその方法

液状乾燥の方法としては別に一定の形式があるわけではない。高温での噴霧法，通風法，或いは比較的低温での減圧法等その種類・範囲は極めて雑多でしかも広い。しかし本実験では凍結乾燥との比較を目的としているので，両者の条件が少しでも近似するようにして，しかも試料が凍結しない程度の温度に保てるよう乾燥の方法を工夫したのである。



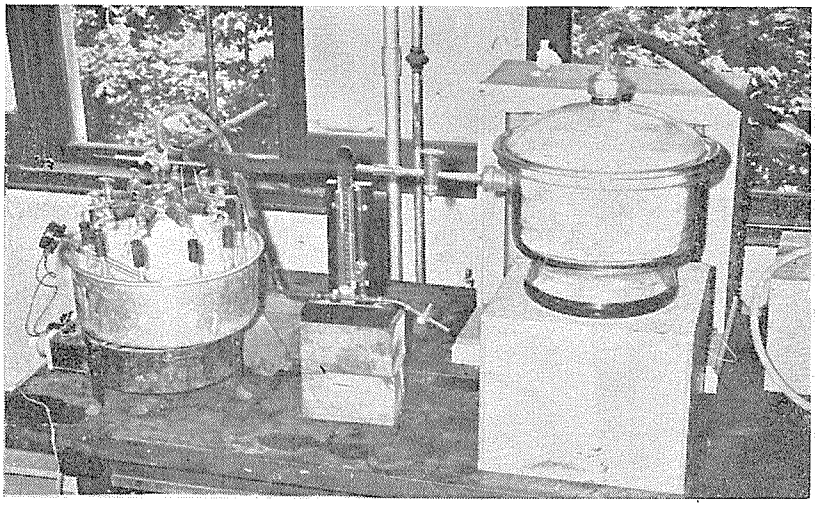
第1図 使用アムプルの略図

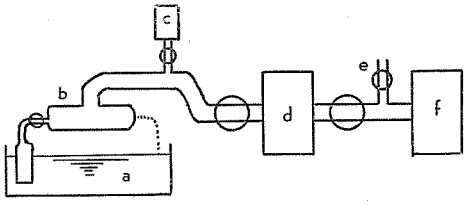


第2図 液状乾燥用放射状多岐管の略図

次に装置の概略を説明すると，第 1 図は実験に用いたアムプルの略図である。(A) と (B) は大さは同じであるが (B) はコックがついていて乾燥過程で随時真空に保つたまま取りはずして計量できるようになつており主として含水度測定に用いた。生残率測定には (A) のアムプルを使用した。

乾燥に当つては先ず試料である菌浮游液をアムプルの内壁上部や狭い頸部に附着させないように注意して先端の細長いピペットで 1 cc 宛分注する。次に第 2 図に示したようなガラス製の多岐管に 10 本宛とりつける。この際各アムプルは垂直になつて試料表面積はほゞ一定となる。この多岐管は各アムプルに於ける乾燥条件を均しくするために[4] 特に考案したものである。第 3 図はこの多岐管をとりつけた液状乾燥装置の略図である。装置内の真空度は必要に応じて (e) のコックを調整することで加減できるので乾燥に当つては先ず予め所定の真空度になるようにコックの調整をしておく。アムプルを多岐管にとりつけてから恒温槽中に浸し，試料が必





第3図　液状乾燥装置の略図

a：恒温水槽　　d：除湿器(焼石膏)
b：放射状多岐管　　e：真空度調節コック
c：水銀真空計　　f：油廻転真空ポンプ

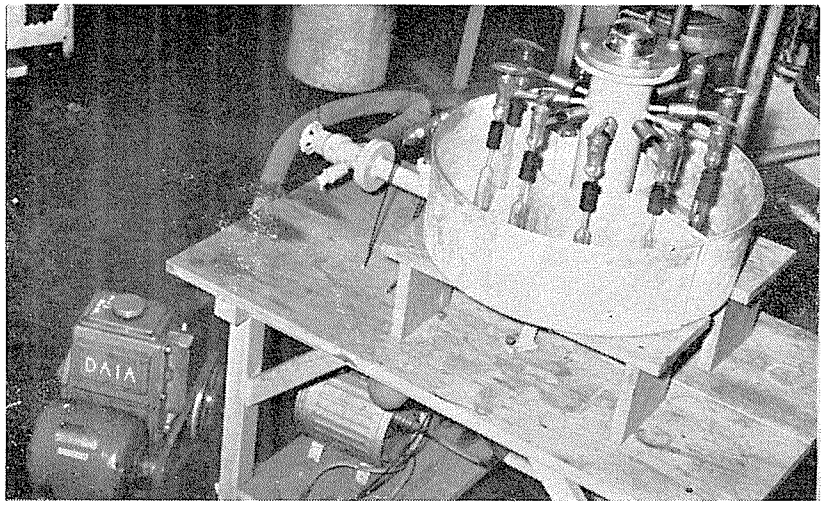
要な温度に達したとき真空ポンプを作動して減圧すると乾燥が始まる。乾燥が進むと試料の液面は次第に低下し，やがて肉眼で見える液状の部分はなくなつて試料は薄い膜様となりアムプル壁に附着してみえるようになり試料温度は恒温槽の温度にまで上昇する。この試料温度が上昇して +30°C に達したときをもつてかりに見かけの乾燥終了時とし，それまでの過程を第一次乾燥とし，それ以後を第二次乾燥として扱うこととした。

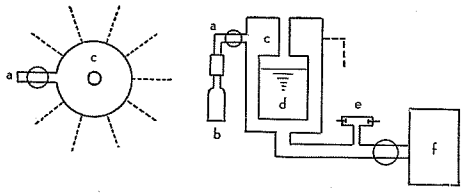
液状乾燥の場合の真空度は 5 mmHg，19 mmHg の両者とし恒温槽の温度は見かけの乾燥終了時までの時間をほゞ等しくするために夫々 +30°C，+40°C とし第二次乾燥に際しては何れも +30°C とした。第一次乾燥経過中の試料温度の大略を知るために試料中に長さ 6 cm，指示温度範囲 +30°C～−30°C の小型温度計を入れて温度を測り，大体の温度変化を知る目安とした。

2)　凍結乾燥装置とその方法

予備凍結；第1図(A)のアムプルに試料を 1 cc 宛分注して試料表面積をできるだけ一定にするためアムプルを垂直に立てて −20°C の低温室に 12 時間放置して予備凍結した。

第4図は多岐管式凍結乾燥装置の略図であるが，これも同時に 10 本のアムプルを取りつ





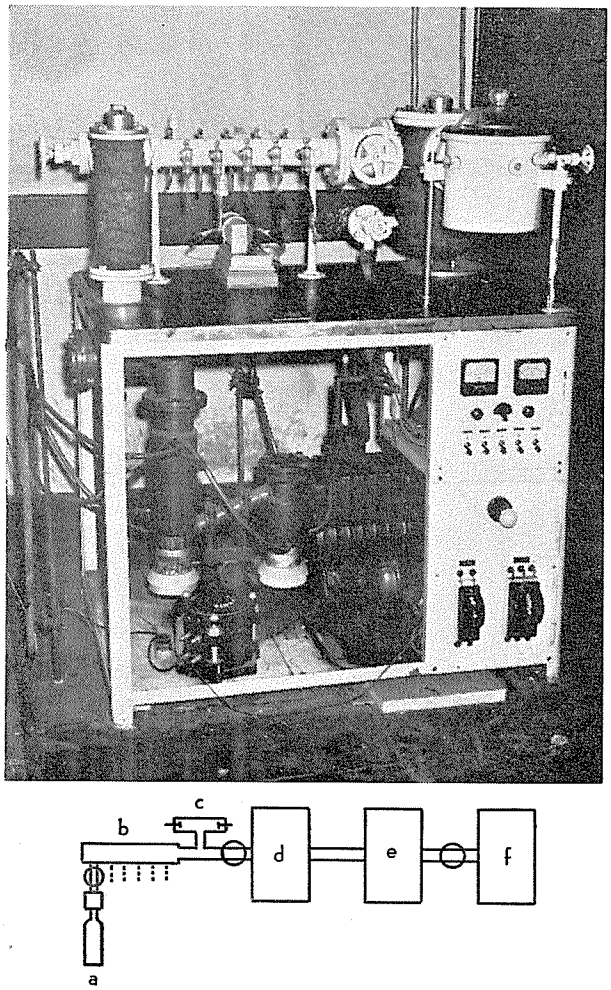
第4図 凍結乾燥装置の略図

a: 放射状多岐管　　d: 液体窒素
b: 試　　料　　e: 放電真空計
c: 除　湿　器　　f: 油廻転真空ポンプ

けることが出来るようになつている。コールドトラップには液体窒素を用い，到達真空度はおよそ 5×10^{-3} mmHg である。乾燥中の室温の変化などによつて乾燥速度が影響されるのを防ぐために，乾燥開始と共に試料を 0℃ の氷水に浸した。しかし減圧乾燥の開始と共に試料温度は低下しているので試料は融解することなく，アムプルの試料周囲は厚い氷層にとり囲まれることは室温の空気中にアムプルを露出したまま乾燥したときと同様である。乾燥が或る程度進むと試料温度は上昇してアムプルに固く附着していた氷層はとれるようになる。この時から暫時の後には乾燥を止めアムプルを室温に保つても試料の融解は起らなくなるので，それを凍結乾燥の見かけの乾燥終了時とした。この終了点を時間的に捉えるために多数の予備実験を行つた。即ち同一条件で乾燥を開始した多くの乾燥経過中のアムプルを順次一定時間おきに装置から取りはずし，融解の有無を検し，試料がもはや融解しない程の乾燥度に達するまでの所要時間は，本実験ではほぼ2時間30分であることを知つた。そこで見かけの乾燥終了時までを第一次乾燥過程，それ以後を第二次乾燥過程として扱うこととした。見かけの乾燥終了時以後は試料の熱伝導率は低下しているので，周囲の温度にそれほど敏感には左右されないと考えて，恒温槽を除きアムプルを室温に露出した。

3)　含水率測定のための諸装置と方法

含水率[5]を測定するに当つては乾量基準含水率で表わすことにしたので，基準となる乾量を求めるため第5図の略図に示したような装置を用いたが，この装置では乾燥剤には P_2O_5 を用い油拡散ポンプによつて凡そ 1×10^{-5} mmHg の高真空が得られた。測定に当つては第1図(B)のコックつきアムプルを用い，適宜の乾燥時間後真空に保つたまま秤量し，更に上記の真空装置で +60°C の恒温槽に浸して2時間乾燥した後基準の乾量を測つて夫々の時間での含水率を求めた。もちろん試料自身の重量は予め真空にして測られたアムプルの重量を差し引くこ



第5図　基準乾量を得るための真空乾燥装置の略図

a：試　　料　　d：除湿器 (P_2O_5)
b：多　岐　管　　e：油拡散真空ポンプ
c：放電真空計　　f：油廻転真空ポンプ

とによつて得られる。従つて夫々の時間での試料重量を a，基準乾燥量を b，含水率を w とすると，$w=\frac{a-b}{b}\times 100\%$ となる。

なお重量測定には島津製作所製直示天秤 "LIBROR" を使用した。

4) 生残率測定の方法

乾燥した試料のアムプルに 5 cc の蒸溜水を加えて均質の菌浮游液を作り，これを乾燥前の試料の 5 倍稀釈液と同一菌濃度とみなした。混菌重量 50 mg 或いは 400 mg のものの乾燥後の体積は極めて僅かである上に，乾燥前の試料全量の 5 倍量の蒸溜水を加えることによつて，蒸発水分量と注加水分量との誤差は生残率測定の上では殆んど問題にならなくなると考えられる。この菌液を適宜に稀釈して肉エキス・ペプトン寒天培地，或いは麦汁寒天培地の注加平板法によつて生じた菌集落を算えて菌数とした。

なお対照として無処置の菌液及び凍結融解だけを行つたものを用いた。生菌数の測定にはすべて同一条件の実験を 3 回繰りかえし，その平均値をもつて表わすことにした。

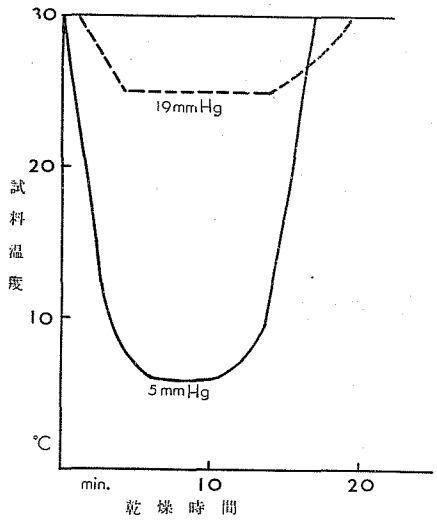
III. 実 験 成 績

E. coli の菌浮游液を用いて種々の実験を行つた結果，次のような実験成績を得た。

1. 液状乾燥について

実 験 1. 第一次乾燥と第二次乾燥の比較

先ず，試料として用いた静止菌浮游液は，+40°C，2 時間保存では生菌数には影響のないことを確かめた。次に試料のアムプルを +30°C 及び +40°C の恒温槽に浸してそれぞれ 5 mmHg，19 mmHg で減圧すると第 6 図に示したように試料の温度は乾燥の進行と共に下がりはじめて最低に達した後再び上昇し，やがて水分がほゞ無くなつたと思う頃には周囲の恒温槽と同じ温度まで達するが，5 mmHg では最低 6°C まで下がり，16 分でほぼ見かけの乾燥が終了し，19 mmHg では最低温度は，25°C で約 18 分で見かけの乾燥が終つた。



第 6 図 液状乾燥 5 mmHg 及び 19 mmHg の第一次乾燥過程に於ける試料の温度変化

この時期，即ち第一次乾燥終了時及びその後 30 分乾燥を続けた時の 5 mmHg と 19 mmHg の試料の菌生残率を測定した結果は第 1 表の如くなる。第一次乾燥終了の時期では両者の生残率はほぼ等しくその後第二次乾燥に入つてから30分後では5 mmHg で乾燥した場合の方が死滅度が高い。

また第一次乾燥は 19 mmHg の真空度で行い，続く第二次乾燥 30 分間は真空度 5 mmHg で行つて，その結果を第一次，第二次乾燥ともに 5 mmHg で乾燥したものとを比較した結果

第1表　液状乾燥過程に於ける菌の生残率

真空度 (mmHg)	生残率 第一次乾燥終了時 (%)	生残率 第二次乾燥30分後 (%)
5	80.7	23.2
19	85.9	59.5

第2表　液状乾燥過程の途中で真空度を変えた場合の菌の生残率

真空度 第一次乾燥 (mmHg)	真空度 第二次乾燥 (mmHg)	生残率 第一次乾燥終了時 (%)	生残率 第二次乾燥30分後 (%)
5	5	80.7	23.2
19	5	85.9	24.1

は第2表に示すように何れの時期に於いても両者の間に殆んど差はなかつた。

これらのことから第一次乾燥終了時では生残率は少なくとも温度や気圧の条件が相異してもほぼ一定であり，第二次乾燥過程では乾燥条件に依つて違うことが判る。

実　験 2.　第一次乾燥過程での温度と気圧の吟味

第一次乾燥終了時の生残率がそれまでの乾燥条件の差に拘わらず一定であることを更に確かめるために次のような実験を行つた。

真空度は 19 mmHg であるが試料温度を 5 mmHg の乾燥の時と同程度まで下げた。これは恒温槽温度を加減することによつて試料温度の下降曲線，上昇曲線，最低温度を殆んど同様にすることができた。その大半の過程に於いて試料温度を約 +6°C に止めることはできたが，第一次乾燥終了までの時間は著しく延長して 6 時間を越えた。

第3表　液状乾燥過程で試料の温度を変えた場合の菌の生残率

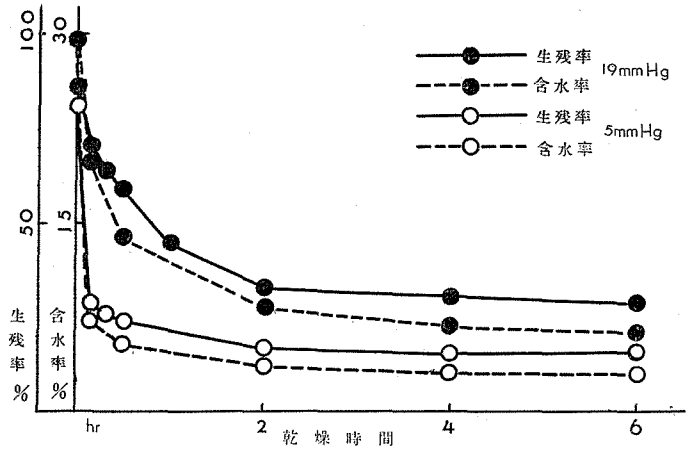
真空度 (mmHg)	最低試料温度 (°C)	生残率 第一次乾燥終了時 (%)	生残率 第二次乾燥30分後 (%)
19	+6	85.9	70.2
19	+25	85.9	70.7

結果は，第3表のように同じ 19 mmHg の +6°C と +25°C の比較では両者はほぼ同程度の生残率を示した。更にこの試料を 30 分間第二次乾燥を行つたものでは条件が全く同じであるから当然のことであるが両者の間に殆んど変りはみられない。これによつても第一次乾燥では温度と気圧によつて左右されるところの乾燥速度は生残率に対して殆んど影響を及ぼさないことが判つた。

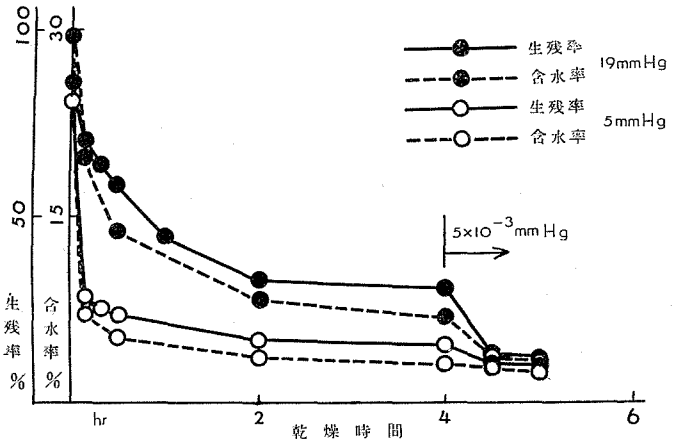
実　験 3.　含水量と生残菌との関係について

実験1で第二次乾燥に入つてからの生残率は乾燥時の真空度に影響されていることが判つた。このことを更に確かめるために 19 mmHg 及び 5 mmHg の乾燥を第二次乾燥に入つてから 6 時間後まで行い，夫々一定時間毎に含水率と生残率を調べてみた。その結果は第7図に示すように，含水率は 30 分くらいまで急激に低下し，それからはやや減り方が少くなり 2 時間以後は殆んど変らなくなる。しかも 5 mmHg 乾燥のものは 19 mmHg 乾燥のものより常に下廻つていた。一方生残率も殆んど含水率と同じ様な傾向を示すことが判たつ。要するに乾燥時間の経過に伴なつて，しかも真空度の高い方が含水率も生残率も低くなることを知つた。

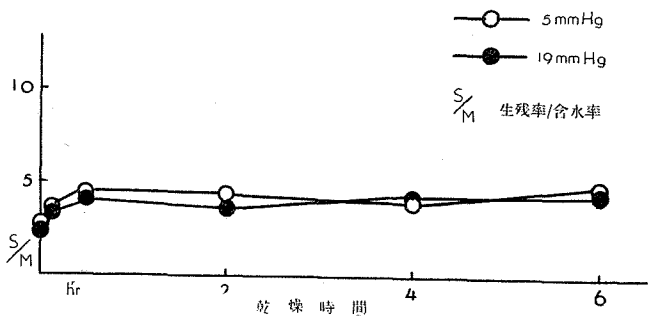
次に第二次乾燥の過程で急に真空度を変えた場合は含水率及び生残率にどのような変化を生ずるかを見るために，5 mmHg と 19 mmHg で充分に平衡状態に達した時（第二次乾燥 4 時



第7図　液状乾燥5 mmHg及び19 mmHgの第次二乾燥過程に於ける生残率及び含水率の変化



第8図　液状乾燥の第二次乾燥過程の途中から真空度を変えた場合の生残率及び含水率の変化



第9図　液状乾燥5 mmHg及び19 mmHgの第二次乾燥過程に於ける生残率と含水率の比

間) に 5×10^{-3} mmHg にきりかえると，含水率も生残率もともに変化し，やはり両者の間に一定の平行関係のあることがうかがわれた (第8図)。

そこで含水率と生残率との関係を一層はつきりさせるために，含水率に対する生残率の比を各段階で求めてみると第9図に示すように，最初は脱水の程度に比較して生残菌はやや少ないのが，30分以後では残水率と生残率とが全く比例することが判つた。しかも5 mmHgと19 mmHg真空度の差があるにも拘らず，第二次乾燥過程では含水率と生残率との関係は両者全く同一であることを知つた。

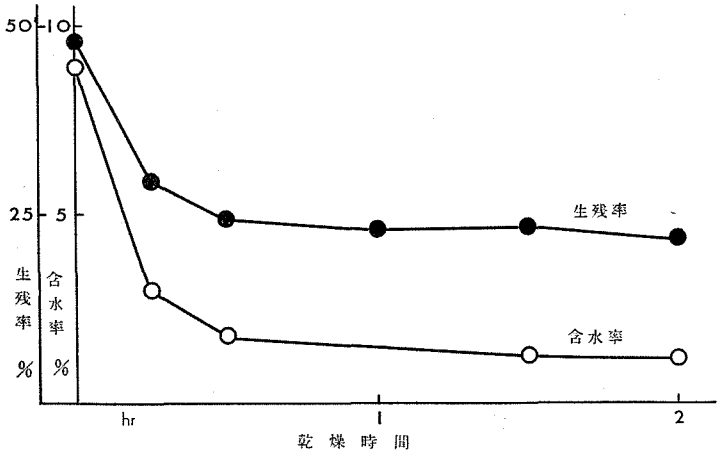
実験 4. 真空度による影響の吟味

以上の実験によつて，第二次乾燥では真空度によつて生菌数の左右されることが判つたが，果して真空そのものが影響するのか，或いは乾燥の結果含水量が低下することによつて生菌数が減少するのか決定できなかつた。この点を確かめるために 5 mmHg で第一次乾燥終了時まで乾燥した試料を液体窒素で約 −190°C に冷却してそれ以上乾燥の進まないように抑えておきながら 5×10^{-3} mmHg の高真空に30分間おいてみた。この様に高真空にさらしても生残率には変化が認められなかつたので真空度そのものは何ら影響はなく生残率の低下は主として含水度の低下によるものであることが判つた。

2. 凍結乾燥について

実　験 5. 含水量と生残菌との関係について

凍結乾燥に於いて見かけの乾燥終了時を決めることは必ずしも容易ではないが，既に実験方法の項で述べたように多くの実験経験から，今回の乾燥条件ではその点が大体乾燥開始から2時間30分にあることを確認した。今液状乾燥に做つて，いわゆる見かけの乾燥終了時及びそれ以後の第二次乾燥過程での含水率及び生残率を検べてみると，やはり含水率，生残率ともに時間の経過に従つて低下することが知られた (第10図)。これを液状乾燥のものと比較するとみかけの乾燥終了時，即ち第一次乾燥の終りでは第4表のようになり，凍結乾燥では遙かに含



第10図　凍結乾燥の第二次乾燥過程に於ける生残率と含水率の変化

水率も生残率も低いことがわかる。また第二次乾燥では既に第7図及び第10図に示したように，液状乾燥では2時間で大略一定の含水率に達し 19 mmHg では 8.5%，5 mmHg では 3.7% となつてそれ以後は余り低下しなくなるが，凍結乾燥では 30 分で 1.8% となり殆んど平衡の状態に達した。

第4表 凍結乾燥と液状乾燥の第一次乾燥終了時に於ける含水率及び生残率の比較

	含水率 (%)	生残率 (%)
凍結乾燥 5×10^{-3} mmHg	8.9	48.0
液状乾燥 5 mmHg	29.9	80.7
液状乾燥 19 mmHg	30.0	85.9

実験 6. 真空度による影響の吟味

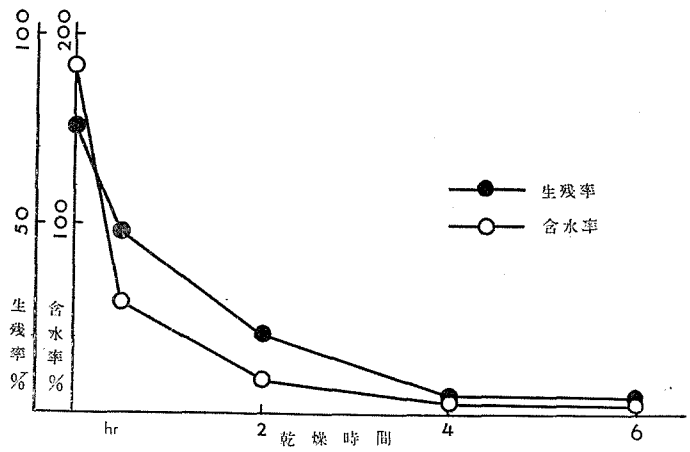
凍結乾燥の際にも単に真空状態にさらされるだけで生残率の低下が生じるものか，或いはやはり含水量が低下することによるのかを知るために，液状乾燥試料について行つたのと同じ要領で検べてみた。即ち第一次乾燥終了時まで乾燥をした試料を液体窒素で冷却しながら乾燥が進行しないようにして 5×10^{-3} mmHg に 30 分間おいたのである。その結果生残率は変らなかつたので，凍結乾燥に於いても生残率の低下は液状乾燥の場合と同様含水率の低下によるものであることを知つた。

以上に述べた実験成績はすべて *E. coli* について行つた実験から得たものであるが，同じ微生物でも多少その性状の異なる *S. cerev.* を用いて同様の実験を行つた。

1. 液状乾燥について

実験 1. 含水量と生残菌との関係について

さきに *E. coli* での実験で知られた含水量と生残菌との関係がこの場合ではどうか検べてみると，第11図に示したように含水率の低下に伴なつて生残率を低下すると云う平行的関係があることは *E. coli* の場合と同様であつた。



第11図 *S. cerev.* の液状乾燥 5 mmHg の第二次乾燥過程に於ける生残率及び含水率の変化

2. 凍結乾燥について

実　験 2.　含水量と生残菌との関係について

E. coli では凍結乾燥に於いても液状乾燥に於ける様な含水率と生残率との平行的関係がみられたが，*S. cerev.* では実験の結果，みかけの乾燥終了時に於いて既に生残率は 0.3% 程に落ちて平衡に達したもののようで以後1時間の乾燥でも殆んど変らず，含水率も同様にみかけの乾燥終了時でも非常に低く使用天秤の感度外にまで低下したので，液状乾燥のような明らかな平行的関係があるかどうかは判らなかつた。

IV. 考　　察

既に緒論に於いても述べたように，凍結乾燥と液状乾燥の比較を行うに当つては，如何なる点に焦点をおいて比較してよいのか，その具体的な方法に迷つた。なぜならば両者は夫々質的に全く異なつた乾燥過程を辿ると考えられるうえに，凍結乾燥はまだよいとしても，液状乾燥の方法には別に一定の形式はないので，やり方によつては千差万別の結果が出るであろうことが予想されたからである。そこで如何なる基準を想定したならば両者の比較検討に便であるかを考え，先ず従来殆んど乾燥機構のしらべられていない液状乾燥をとりあげ，然もそれをなるべく凍結乾燥に近いような条件のもとで手がかりを求めようと試みた。

最初に乾燥過程を規定するのに，肉眼的に大体水分が無くなつた時期をもつて所謂見かけの乾燥終了時とし，乾燥開始からそれまでの間を第一次乾燥，それ以後を第二次乾燥と分けて考えてみた。この見かけの乾燥終了時というのは液状乾燥に於いては比較的はつきりと認め易いもので，大体の規準とするには好都合であつた。

このようにして，細菌の浮游液を液状のままなるべく低い温度で然も減圧によつて乾燥して行く時，気圧，温度などの乾燥速度に関する因子がどのように試料の性状特に菌の増殖力に対して影響を及ぼすものであるかを吟味した結果は，既に実験成績の項でも述べたように，乾燥条件は異なつていても，乾燥過程のある時期には同じ程度の障害しか与えず，生残率は凡そ 80%，含水率もまた等しく約 30% であることを知つた。つまりこの時期が見かけの乾燥終了時で，経験的ではあるが肉眼によつて判定することが可能なのである。然もこの時期までの第一次乾燥の過程では，気圧，温度及び時間などをいろいろに組合わせて乾燥の条件を変えても第一次乾燥終了時(即ち見かけの乾燥終了時)の生残数は殆んど常に同じ数値を示すことを知つた。但しこれらの乾燥条件に関与する因子は相互に因果関係をもつているので，各因子単独の影響を確認することは困難であるが，とにかく乾燥条件による差は見出せなかつた。

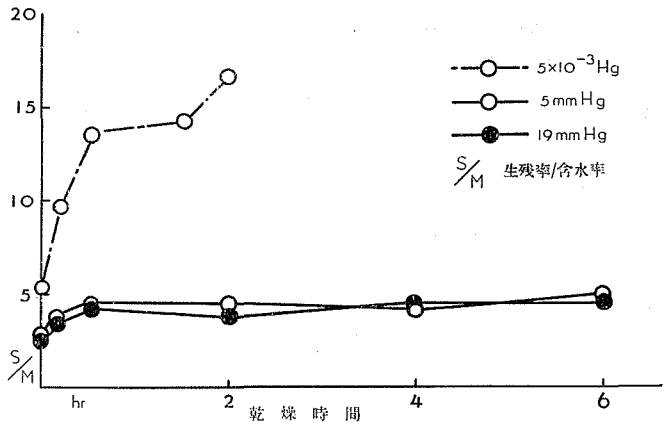
次いで第二次乾燥に移り，その過程に於いける含水率と生残率をしらべてみるに，両者はほぼ平行に低下していることがわかり，特に途中で真空度を変えてみた場合も両者平行して変化すること，また試料温度を下げ蒸発を防いでおいて高真空下に曝した実験では生残数の変らないことなどから，生残率は試料中の含水度と極めて密接な関係にあることを知つた。勿論含水度は乾燥過程の乾燥条件に左右されるものではあるが，真空度や温度が直接生残率に影響す

るのではなく，菌体からどれだけ水分が取られるかによつて障害の程度が決まつてくるもののように思われる。

要するに第一次乾燥では乾燥条件の如何に拘らずほぼ同一の含水率，生残率を示すに反し，第二次乾燥では乾燥条件によつて含水率は異なり，含水率によつて生残率もまた決まつてくるのである。従つて，かりに規準としてとり上げた見かけの乾燥終了時を境として，その前後の乾燥過程にこのような質的な差のあることが知られた。つまり最初は便宜的に分けて考えてみた二つの乾燥過程が，実験的結果からも夫々の意義をもつていることが判つたのである。いまその機構を考えてみるのに，前者では，細胞外及び細胞内から自由にとれる水分で多少の乾燥条件の差に拘らず比較的容易に脱水され，しかも生菌に対しては割合に障害とならないような水分の蒸発が起こると考えられる。後者では，それよりも脱水し難い菌体内水分の蒸発が起こると考えられ，従つて乾燥条件によつて含水度も変り，また生残率にも大きな影響を与えるものと思われる。

さて肝臓の凍結乾燥と液状乾燥との比較であるが，凍結乾燥では液状乾燥の如く，第一次及び第二次乾燥にはつきり分けるだけの肉眼的な規準はつかみにくい。しかし液状乾燥の場合との比較のために，既述のような経験的な方法で凍結乾燥過程も亦二段階に分けて考えてみることにした。実験の結果第一次乾燥に於いて既に生残率は 50 %以下に，含水率は 10% 以下に低下しており，その成績を液状乾燥のそれに比較してみると，何れも遙かに低い値を示している。だがこの数値だけで液状乾燥と凍結乾燥の本質的な差乃至は優劣を論ずることはできない。けれども第二次乾燥過程での生残率と含水量の関係は液状乾燥の場合と同様ほぼ平行的な関係を示したので，この場合も乾燥過程を二段階に区別して考えることは妥当のようにみえた。しかし他の実験[6]で凍結乾燥試料がかなり厚い層をもつた菌浮游液であつたとき，乾燥後の上層と下層の菌の生残率の異なることが認められている。それ故，液状乾燥と凍結乾燥の両過程をいずれも二段階にすることが見かけ上可能であるからといつて，その意味が同一であるとは限らない。

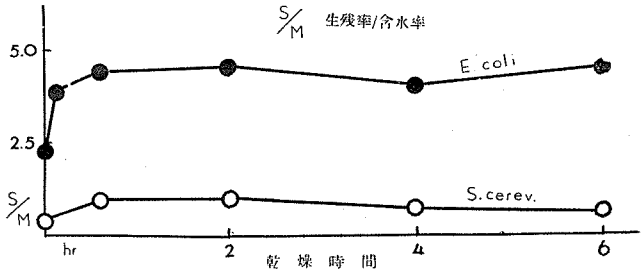
凍結乾燥では予備凍結による菌の死滅も乾燥による死滅として算入しているが（本実験では凍結融解によつて，*E. coli* は約 4% が死滅している），それにも拘らず第一次乾燥終了時及び第二次乾燥過程での各点に於ける生残率の含水率を基準とした比（S/M で表わす）を液状乾燥の場合のそれらと比較すると第 12 図に示したように，両者の間にかなりの差違のあることが判る。即ち液状乾燥ではこの比は乾燥条件が異なつても変らず，然も乾燥の経過に拘らず一定であるのに反し凍結乾燥ではその値は遙かに高く，乾燥の経過に伴つて一層大になることである。これはつまり，前者では脱水量に平行して生菌数が減少することを示し，後者では脱水量が多くなつて行つても生菌はそれほど障害されないことを示すものと思われる。その理由を考えてみるのに液状乾燥では乾燥中比較的高い温度に保たれているのでその温度範囲に於いては細胞構造は高いエネルギーを持つた状態にあり，その状態での脱水が強い障害を与えているのではないかと想像される。実際に蛋白質などの生物的活性をもつた物質の乾燥についても同



第12図　凍結乾燥及び液状乾燥（5 mmHg, 19 mmHg）の第二次乾燥過程に於ける生残率と含水率の比

様な議論が行われている[7]。又乾燥試料の様相から，水の表面張力その他の物理的，機械的障害なども考えられる。

なお，若し凍結乾燥と液状乾燥の速度の差による影響を想像するとすれば，当然同じ液状乾燥の間でも速度の差が出てもよい筈である。Mazur 及び Weston[3] は液状からの最も急速な乾燥である噴霧乾燥法が standard な凍結乾燥よりも高い Fungus spores の生残率を得た理由として乾燥速度を挙げているが，それは凍結乾燥の緩慢な脱水が有害なのは長い間（数10分）比較的高濃度の溶質に触れているからであるとし，溶媒である血清中の食塩の氷点と乾燥中の恒温槽温度（−5℃〜−10℃）について論じている。Stamp[2] は3日間に亘る緩慢な液状乾燥を行つて凍結乾燥との比較をしているが，Mazur 等とは逆に乾燥速度の緩慢な液状乾燥の方が凍結乾燥よりも遙かに高い生残率を示したと述べている。これらの事実を考慮して，乾燥速度が直接生残率を左右することが有り得るとしても，それらは時間の差が非常に大きい場合であつて，本実験のような速度の差では余り大きな影響は表われるとは考えられない。



第13図　液状乾燥5 mmHg の第二次乾燥過程に於ける *E. coli* 及び *S. cerev.* の生残率と含水率の比の比較

次に微生物の種類を変えて *S. cerev.* を用いて行つた実験成績を *E. coli* のそれと比較してみると，液状乾燥では含水率と生残率との関係は両者ほゞ同様な傾向にあることを知つた。

しかしその比 S/M についてみると第13図のように，同じ5 mmHg乾燥であつても *S. cerev.* の方が遙かに値が小さいので同じ脱水量では *S. cerev.* の方の障害度は大きい訳である。更に凍結乾燥についてみると第一次乾燥で既に含水率は極めて低く，その後の乾燥過程でもすべて使用天秤の感度外となつた為，生残率との比 S/M を求めることはできなかつたが，とにかく *E. coli* に較べて非常に脱水され易いと同時に障害の度の大きいこともよく認められた。これは凍結乃至凍結乾燥に対する抵抗性が *S. cerev.* の方が遙かに小さいことによるものであろうし，そのような事実は既に他の実験[8]でも得られている。

なお，微生物浮游液の乾燥には一般に種々の medium を用いて行つた研究が多く，抗脱水作用とか保護膠質としての作用とかいろいろに論議されてまだ問題が多いので，著者は条件をなるべく単純化するために試料を蒸溜水浮游液として実験した。

従来凍結乾燥に於ける乾燥菌体の含水量と生残菌との関係を論じた報告[9),10)]はかなり多く，特に保存性との関連性について述べられているが，それを乾燥過程の吟味に於いて行つた業績は佐原[11)]以外のものでは殆んど見当らない。

本実験では，特に液状乾燥との比較という点で種々の実験ならびに考察を試みたもので，凍結乾燥と液状乾燥の本質的な差異の一端が窺えたように思う。しかしその本態を論ずる為には，更に今後の研究に俟たなければならないものと考えている。

V. 結　　論

微生物試料についての凍結乾燥と液状乾燥の比較を行うために，*Escherichia coli* (一部 *Sacharomyces cerevisiae*) の蒸溜水浮游液を用い，種々の乾燥条件が主として試料の含水度や生菌数にどのような影響を及ぼすかという点を基準として検討した。

1) 液状乾燥の全過程を見かけの乾燥終了時を境として二つの過程に分けて考えると，第一次乾燥過程では乾燥時の温度や気圧などの乾燥条件の差は残水率や生残率に影響せずほぼ同じ値を示すのに反し，第二次乾燥過程では条件の差によつてこれらの率が明らかに変動した。しかし生残率は殆んど常に残水量に比例していた。

2) 凍結乾燥では，見かけの乾燥終了時で既に液状乾燥のものより遙かに含水率も生残率も低かつた。特に含水率に対する生残率の比率 (生残率/含水率) をとつてみると，液状乾燥のものは値が小さくしかもほぼ一定しているが (乾燥経過の比較的初期にはやや増加)，凍結乾燥のものはそれより値が大きくてしかも増加の傾向にあつた。

3) *S. cerev.* は液状乾燥の場合はほぼ *E. coli* と同様の結果を示したが，凍結乾燥では脱水量が非常に多く障害度も亦大きかつた。

稿を終るに臨んで，終始御懇篤な御指導と御鞭撻ならびに御校閲を賜わりました根井教授ならびに林助教授に心から厚く御礼申し上げます。

文　　献

1) Fry, R. M. & R. I. N. Greaves, 1951 The survival of bacteria during and after drying. J. Hyg., ***49***, 220.
2) Stamp, L. 1947 The preservation of bacteria by drying. J. Gen. Microbiol., ***1***, 251.
3) Mazur, P. & W. Weston, 1959 The effect of spray-drying on the viability of fungus spores. J. Bact., ***71***, 257.
4) Malmstrom, B. G. 1951 Theoretical consideration of the rate of dehydration by histological freezing-drying. Exp. Cell Res., ***2***, 688.
5) 亀井三郎 1948 空気の調湿及び乾燥.
6) 桜田・坂上・千葉 未発表.
7) Bailey, R. 1954 The Protein. Academic press, N. Y.
8) 千葉・坂上・桜田 1958 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 III. 低温科学, 生物篇, ***16***, 129.
9) Proom, H. & L. M. Hemmons, 1949 The drying and preservation of bacterial cultures. J. Gen. Microbiol., ***3***, 7.
10) Obayashi, Y. 1955 Dried BCG vaccine. W. H. O.
11) 佐原幸雄 1955 凍結乾燥の基礎研究. 綜合医学, ***12***, 715.

Résumé

In order to clarify the difference between freeze-drying and liquid-drying (drying from the liquid state) in suspensions of microorganisms, *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* were used. In particular, residual moisture content and survival of the specimens were examined under several conditions of drying.

When the whole liquid-drying process was divided into two parts, i.e., the primary and secondary drying processes, at the point of macroscopic completion of drying, specimens dried under different conditions of drying were similar to one another in percantage of the moisture content and of the survival at the end point of the primary drying process, whereas they showed different percentages during the secondary process. In spite of various drying conditions, however, the survival rate depended always upon the residual moisture content.

The percentages of the residual moisture content and the survival in specimens were far less at the point of macroscopic completion of drying in freeze-drying than at the corresponding point in liquid-drying. The ratio of these percentages (survival/moisture) was high and increased more during the progress of drying in freeze-drying, while it was low and almost constant in liquid-driyng.

In liquid-drying *E. coli* and *S. cerev.* showed similar results. In freeze-drying, however, the latter was more easily dehydrated and damaged than the former.