



Title	微生物についての凍結乾燥と液状乾燥の比較保存実験（続報）
Author(s)	桜田, 弘一; SAKURADA, Koichi
Citation	低温科学. 生物篇, 17, 79-84
Issue Date	1959-10-24
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/17625">https://hdl.handle.net/2115/17625</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	17_p79-84.pdf



## 微生物についての凍結乾燥と液状乾燥の比較\*

保存実験 (続報)

桜田 弘 一

(低温科学研究所 医学部門)

(昭和34年7月受理)

### I. 緒 言

著者はさきに微生物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* と *Saccharomyces cerevisiae* の蒸溜水浮遊菌液を用いて実験を行つてその結果を報告した<sup>1)</sup>。即ち、乾燥直後にしらべたのでは凍結乾燥でも液状乾燥でもともに乾燥試料の含水率と生残率の間に比例的関係が認められ、含水率が小さくなるほど生残率も低かつた。また含水率に対する生残率の比率(生残率/含水率)は液状乾燥に於いては値が小さく、しかも乾燥の程度に拘らずほぼ一定しているのに反し、凍結乾燥ではそれより値が大きく、且つ乾燥度が進むほど(含水率が小さくなるほど)値が増すという傾向を示した。

ところで、微生物を乾燥する主な目的は長期保存にあるから、実際に乾燥試料を保存した場合にも、その含水率や乾燥方法の相違(液状乾燥によるか凍結乾燥によるか)が試料中の生残菌数にどのように影響するかを検討しておく必要がある。そこで次のような保存実験を試みた。

### II. 実験材料

*E. coli* の蒸溜水浮遊液を液状乾燥又は凍結乾燥したものをを用いた。調製方法や装置はすべて前報のものと同じであるから詳細は前報に譲る。

### III. 保存方法

1. 保存温度: 比較的短時日のうちに生残菌数の低下を観察するために特に高温をえらび、+25°C 及び +27°C にそれぞれ遮光保存した。

2. 保存真空度: 保存にはアンプルを用い密封保存をしたが、封入気体として乾燥空気を用い保存気圧を常圧(乾燥空気充滿)と真空(5 mm Hg)の二通りにした。

常圧にするには、乾燥終了後に試料の入つたアンプルを前報第3図に示した装置にとり付

\* 北海道大学低温科学研究所業績 第515号。

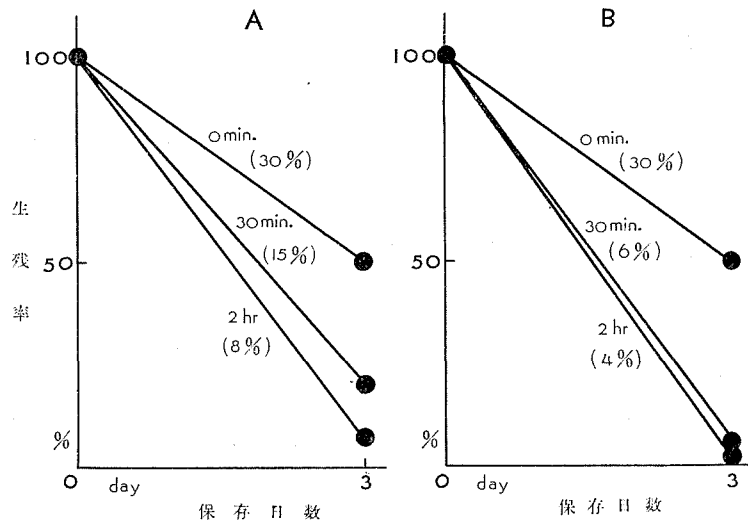
け、塩化カルシウムの入ったデシケーターを通じて乾燥空気を徐々に充たし、アンプルをとり付けたまま、真空熔封と同様の技術で熔封した。

内圧を5 mm Hgにするには、はじめから5 mm Hgの真空度で乾燥したものは勿論そのままであるが、そうでないものは同じ装置にとり付けて常圧に一旦戻すことなく5 mm Hgの真空度を得るようにした。

#### IV. 実験成績

実験1. まず最初に、試料に加えられた乾燥の程度の差が保存後の生残菌数にどのように影響するかを知るために、液状乾燥について乾燥気圧19 mm Hg及び5 mm Hgの夫々第一次乾燥終了時(第二次乾燥開始時)、第二次乾燥30分後、第二次乾燥2時間後のものの計6種を何れもアンプル内圧は常圧で+25°Cに3日間保存してみた。

その結果は第1図に見られるように19 mm Hgの場合も5 mm Hgの場合も保存後の生残菌数は乾燥程度の進んだものほど著しく低下した。

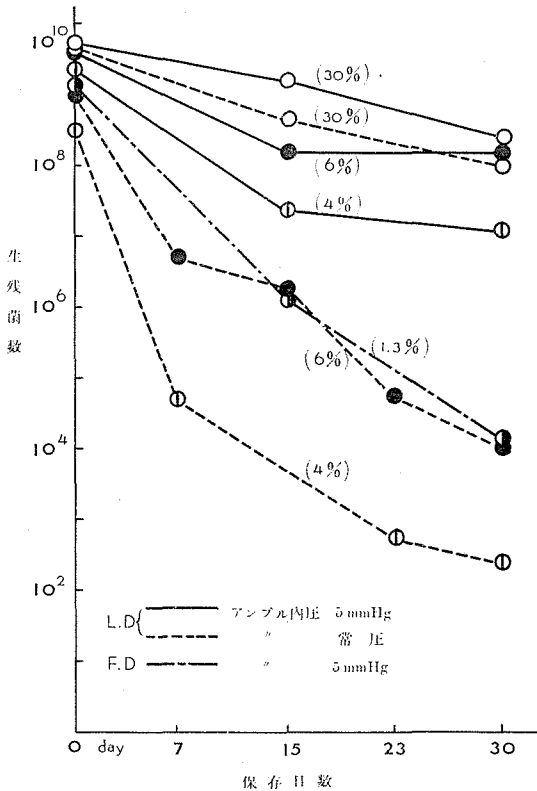


第1図 乾燥の程度と保存後の生残率(常圧 +25°C保存)

(A) 19 mm Hgで乾燥した場合 (B) 5 mm Hgで乾燥した場合  
括弧内は含水率を示す。

このことは含水率の少ないものほど保存による生残菌の減少の著しいことを意味し、従来一般に考えられていたような保存にはできるだけ水分を少なくした方がよいという常識に反するが、保存期間があまりに短いので更に長時間の観察を試みた。

実験2. ここでは液状乾燥は乾燥気圧5 mm Hgの場合だけとし、第一次乾燥終了時、第二次乾燥30分後、第二次乾燥2時間後の3種、凍結乾燥では第二次乾燥2時間後のものを保存温度を+27°Cとして真空及び常圧保存した。



第2図 液状乾燥ならびに凍結乾燥における乾燥の程度と保存後の生残菌数 (+27°C 保存) 括弧内は含水率を示す。

し、凍結乾燥試料は含水率が小さいから、この結果からだけでは、乾燥方法の差によるものか、水分量の差によるものかは判らない。そこで別に更に長期間の保存を試み、4カ月目の成績をみたところ、第1表のように、各条件とも生残菌数はかなり減少しているが、乾燥度との関係は同じような傾向で、含水率の小さいものほど生残菌数は少ないという結果であつた。

実験3. 凍結乾燥と液状乾燥の比較並びに含水率の差による検討を行うために更に長期間の保存実験を試みた。凍結乾燥では第一次乾燥終了時、第二次乾燥1時間30分、2時間30分、4時間後の4種、液状乾燥では第一次乾燥終了時、第二次乾燥30分、2時間後の3種のを、何れも同一真空度5mmHgで熔封し、+27°Cに7カ月保存してそれらの保存過程での生残菌数の低下を追究した。なお対照として乾燥操作を加えるまえの蒸溜水浮遊菌液を常圧のまま熔封して同時に保存した。

その結果は第3図に示した通りである。個々の例ではかなりの変動があつて厳密な差は論じ難いが、全般としては前実験と同様の傾向を示している。即ち、どの条件のものも時日の経過と共に生残菌数は漸次減少するが7カ月後でもなお相当の菌数の生残するものが多い。含水

第1表 液状乾燥ならびに凍結乾燥の保存4カ月後の生残菌数

乾燥条件	試料		4カ月保存後の生残菌数
	乾燥時間	含水率	
液状乾燥	0分	30%	87×10 <sup>3</sup>
	30分	6%	19×10 <sup>3</sup>
	2時間	4%	21×10 <sup>1</sup>
凍結乾燥	2時間	1.3%	2

第2図は30日までの保存成績を示すものであるが、どの乾燥度のものでも真空保存した場合の生残菌数は常圧保存のそれを上廻っている。この点では従来の通念のとおりであるが、乾燥度の進んだものほど保存後の生残菌数が低いという点では真空保存、常圧保存の何れの場合も実験1.にみられたと同様な結果であつた。

次に同一保存条件で、液状乾燥したものと凍結乾燥したものの保存性を比較するために、それぞれを真空保存した場合について生残菌数の変化をみると、凍結乾燥試料の生残菌数の方が少ない。但

率との関係では、本実験においてもやはり含水率の小さなものほど生残菌数の少くなる傾向がみとめられた。また凍結乾燥菌が液状乾燥菌に比較して生残菌の少ないのは含水率の差だけによるものかどうかこれだけの例数では明らかでないが、7カ月目の成績で、含水率9%の凍結乾燥菌が6%及び4%の液状乾燥菌より多く、1.3%以下の凍結乾燥菌が最下位にある点などからみれば、ほぼ含水率に平行しているようにもみえる。本実験で特に注目すべきは、対照の無処置菌液が液状のまま+27°Cで保存されても、乾燥菌に比較してより多く生残しているという事実である。

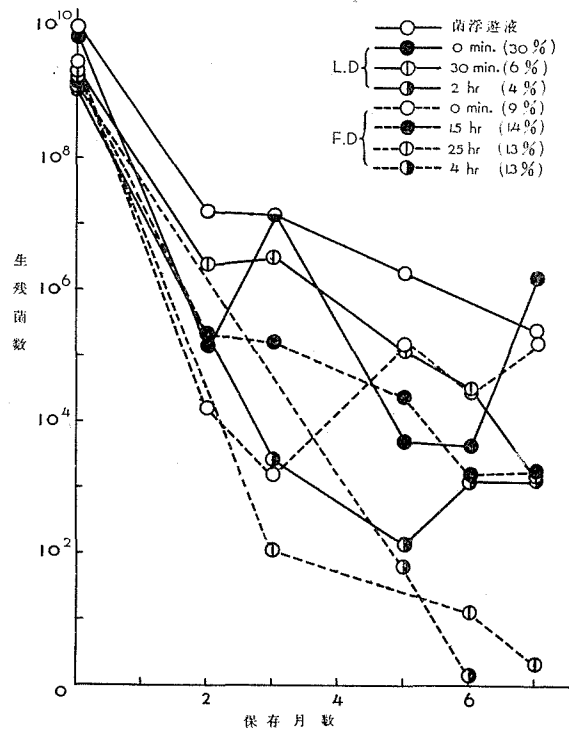
## V. 考 察

微生物の乾燥保存に関しては多くの研究が行われている。種々の保存条件、特に保存温度、封入気体などにつ

いていろいろと検べられており、また乾燥試料作製の際のメジウムの種類や試料の含水率などが保存後の生残菌数を左右する要因として論議されてきた。保存温度については、多くの研究があり、その結果はすべて保存温度の高いほど生残菌数の低下が著しいことを示している。

保存試料の含水度に関しては、Rogersの報告<sup>2)</sup>以来、含水率の小さいものほど保存後の生残率が大きく、従つて乾燥保存にあつては出来るだけ水分を除く必要があるものとされていた。しかしFry及びGreavesの実験<sup>3)</sup>では乾燥時間がより長く、つまりより完全に乾燥したものは乾燥直後ばかりでなく、数カ月の保存でも低い生残率を示している。Obayashiの研究<sup>4)</sup>でも、ある程度以上乾燥されたBCGワクチンは保存性がかえつて悪くなつていく。

著者は凍結乾燥と液状乾燥の比較を窮極の目的として実験を行つたので、保存実験の結果を知るためには多少特殊な条件ではあるが、短期間内で観察を終えるよう保存温度を比較的高温(+25°C, +27°C)に保ち、前報でも述べたような理由の外に菌体自身の含水率を直接且つ正確に測定できるように取って蒸留水浮遊菌液を用い、乾燥したものである。またアンプル内の封入気体も特殊なものを用いず、除湿した空気を充填した常圧の場合と真空(5 mm Hg)の場合とについて比較検討した。



第3図 液状乾燥ならびに凍結乾燥に於ける乾燥の程度と保存後の生残菌数の関係 (5 mm Hg, +27°C 保存)

その結果、含水率の低いものほど生残菌数が低下するという事実が、真空保存でも常圧保存でも、また凍結乾燥でも液状乾燥でも、7カ月までのいろいろの時期において常に認められた。このことは含水率の小さいほど保存性が良いという従来の一般的な通念に反している。しかし前述のように Fry 及び Greaves や Obayashi らは過度の乾燥は保存性を害うと云う結果を挙げており、特に Fry らはメジウム中にグルコースを含むとき乾燥による菌の死滅が少ないのは、グルコースが試料の乾燥をある程度おさえるからであると想定している。ところで、本実験で用いた試料は蒸溜水浮遊菌液であり、その含水率は菌体だけの含水率を示すものなので、いろいろなメジウムを用いた従来諸報告のそれとは直接に比較することはできない。それにしても含水率が多いほど保存性がよいという事実には驚き、漸次保存期間を延長して再三実験をくりかえしたが、7カ月までの期間内ではその何れにおいても同様の結果を認めた。特に意外であつたのは +27°C の温度での保存で、無処理の対照である浮遊菌液そのものが他の乾燥菌体のいずれよりも保存性がよいという事実である。この事実が真であれば、従来の乾燥保存の意義が全く失われることになるが、それを何と説明してよいのか、これだけの実験ではその理由を解釈することはできない。今後更に長期間の保存についての検討が必要であらうと思う。

次に、保存時のアンプル内圧又は封入気体に関しては Rogers, Naylor 及び Smith<sup>9)</sup> 等の研究があり、何れも真空保存が最もよく、空気乃至酸素中での保存は生残菌の減少を招くことを報告している。著者の実験においては空気充填常圧保存と真空保存 (5 mm Hg) を行つただけであるが、従来の報告と同様後者の優秀なことを認めた。

最後に、凍結乾燥と液状乾燥の比較では、両者の間で試料の乾燥の程度が相当にちがひ、同一含水量のものを揃えることは難しいので、多少含水量のちがうもの 2, 3 について比較するに留まつたが、+27°C、7カ月間の真空保存の結果では、結局含水率が小さいほど生残菌数が少なくなると云う傾向がみられただけで乾燥方法の相異による影響はあるのか否か確認することができなかつた。

保存実験の上から凍結乾燥と液状乾燥の比較を行うには、種々の保存条件の下で更に長期の観察を続け、しかも、でき得れば同一含水量の試料を得て比較検討することが必要であらうと思う。

## VI. 結 論

微生物についての凍結乾燥と液状乾燥の比較を保存試験の上から検討した。

*E. coli* の蒸溜水浮遊菌液を用いて、種々の乾燥条件と保存条件のもとで観察した結果、+27°C、7カ月までの保存の成績では、すべて試料の含水率の小さいものほど生残菌数の減少することを認めた。しかし凍結乾燥と液状乾燥との間には本質的な差異があるのかどうかは明らかでなかつた。

筆を擱くにあたつて、御指導と御校閲を賜つた根井教授、ならびに種々の御教示を下さ

つた林助教授に心からの感謝を捧げます。

#### 文 献

- 1) 桜田弘一 1958 微生物についての凍結乾燥と液状乾燥の比較. 低温科学, 生物篇, **16**, 91.
- 2) Rogers, L. A. 1914 The preparation of dried cultures. J. Inf. Dis., **14**, 100.
- 3) Fry, R. M. & R. I. N. Greaves 1951 The survival of bacteria during and after drying. J. Hyg., **49**, 220.
- 4) Obayashi, Y. 1955 Dried BCG vaccine. W. H. O. Geneva.
- 5) Naylor, H. B. & P. A. Smith, 1946 Factors affecting the viability of *Serratia marcescens* during dehydration and storage. J. Bact., **52**, 565.

#### Résumé

For comparison of freeze-drying and liquid-drying, aqueous suspensions of *Escherichia coli* were desiccated from the frozen state or from the liquid state and preserved at 25° or 27°C for seven months. Under such experimental conditions, it was noted in all instances that the less the water content of dried material was, the more the viable cells decreased in number during preservation. Essential difference between freeze-drying and liquid-drying could not be detected in preserved materials.