



Title	凍結乾燥に於ける乾燥の機構 IV : 乾燥過程での試料中の部位による含水率と菌生残率との関係について
Author(s)	根井, 外喜男; NEI, Tokio; 坂上, 康雄 他
Citation	低温科学. 生物篇, 18, 83-89
Issue Date	1960-11-04
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17643
Type	departmental bulletin paper
File Information	18_p83-89.pdf



凍結乾燥に於ける乾燥の機構 IV*

乾燥過程での試料中の部位による含水率と
菌生残率との関係について

根井外喜男 坂上康雄

桜田弘一 荒木 忠

(低温科学研究所 医学部門)

(昭和 35 年 6 月受理)

I. 緒 言

乾燥とは要するに試料よりの水分の除去である。特に菌液の凍結乾燥を行なう場合、菌体外の水分と菌体内の水分がどのような過程を辿つて他に運び去られるか、又その結果として菌体がどのような障害を受けるか、ということが問題であり、それらの点を追究することが、我々の凍結乾燥に関する研究の大きな目的の1つとなつている。

凍結乾燥では試料が立体構造を保つたまま脱水(この場合は昇華)が行なわれるのであるから、乾燥は当然表層から深部に向つて進行するものである。ただこの場合、昇華の最前線が通過した後に残された部分は既に乾燥が完了しているものか、或いは最前線が下層に移つた後もなお引続き上層部では乾燥が進行しているものであるかを確かめる必要がある。

このことは我々が解析を試みようとしてつめていく乾燥過程の機構に大きな関連があると考えられるからである。例えば先にも千葉¹⁾が述べたように、乾燥上層部は下層部よりの昇華に対し、その水蒸気分子移動の障害となつていることなど、試料内部の部位的関係は、乾燥の立体的ダイナミックな過程にいろいろな意味をもつものであることが想像される。

更にこれらの関係は、供試細菌の種類によつてどのような差違を示すか、またそれをしらべることによつて、菌体よりの脱水の機構、更には乾燥による菌体の障害の機構をもうかがえるのではないかと考えて、本実験を行なつた。

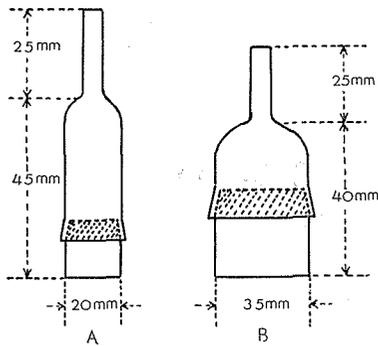
なおこの種のねらいと方法を以て実験を試みたものは、未だ文献上にその例を見ないと思う。

II. 実験方法

1. 実験材料

実験材料には *Escherichia coli* 及び *Saccharomyces cerevisiae* を用いた。 *E. coli* は普

* 北海道大学低温科学研究所業績 第 557 号



第1図 使用アンプルの略図

通寒天培地 37°C 24 時間, *S. cerev.* は麦汁寒天培地 27°C 48 時間培養したものを蒸留水で 3 回遠心洗滌した後, 400 mg/cc の濃度の菌液を調製して実験に供した。この菌濃度は通常の凍結乾燥実験には多すぎるが, 本実験では測定上の技術的な必要からこの程度の高濃度の菌液を用いたのである。

2. 凍結乾燥法

図に示すような, 実験に便なように特に作らせた A 型アンプルに, 前記菌液を 2.5 cc とり, -30°C の低温室に直立させたまま放置して緩慢な冷却速度で凍結させた後, 多岐管式凍結乾燥機に装置して乾燥を行なった。

乾燥中の室温の変化によつて乾燥速度の影響されることをおそれて, 乾燥開始とともにアンプルを 0°C の氷水中に浸した。乾燥 1.5 時間ではまだ下層に凍結部分が残っているが, 約 7 時間ではほぼ乾燥は完了して室温に放置しても残存水分のために溶解するということはない。

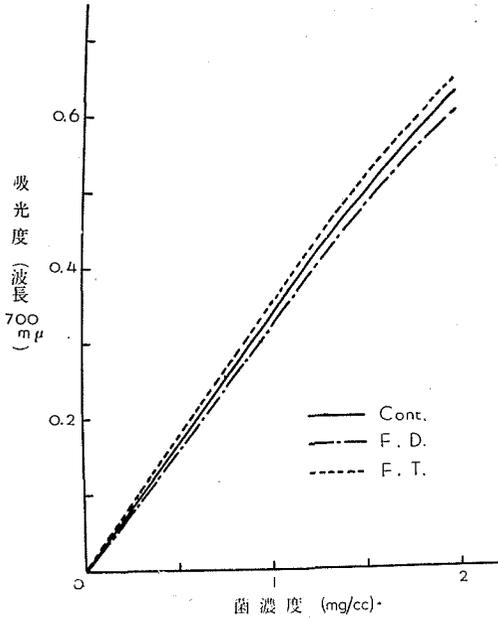
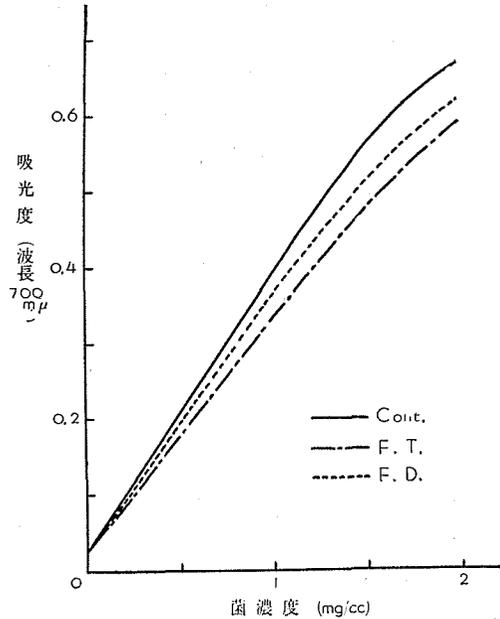
3. 含水率測定法

前記のように 1.5 時間で乾燥の途中でとめたもの, 及び 7 時間で乾燥を完了したものは, 直ちにそれを -40°C の低温室に移し, 試料中の乾燥部分を大体上中下の 3 層に分けて (使用容器の直径は凡そ 2 cm であるから, 試料 2.5 cc では液層全体が凡そ 9 mm となり, 乾燥 1.5 時間後の最下層の未乾燥凍結部分は約 3 mm, 乾燥部分は 2 mm ずつの 3 層で計凡そ 6 mm ということになる), それぞれ秤量瓶中にとる。蓋をした後, 室温に持ち出して秤量する (之を a とする)。更に秤量瓶のまま B 型アンプルに入れ, 60°C の温浴槽中, 真空度 10^{-5} mmHg で 2 時間乾燥を行なつてから, コールドトラップを通して空気を入れ, 常圧に戻してから秤量する (之を b とする)。含水率は $\frac{a-b}{b} \times 100$ をもつてあらわすこととしたが, これは乾量基準含水率であつて, 試料総量又は総水分量に対する残水率ではない。なお秤量にはすべて島津製直示天秤 LIBROR を用いた。

4. 生菌数測定法

それぞれの処理を行なつた試料を適当な濃度まで蒸留水で稀釈し, 普通寒天培地又は麦汁寒天培地の平板注加法によつて生じた集落を数えて生菌数とした。

ここで問題なのは, 試料を各層に分けてとり出す場合の測定法である。これら各層はいずれも量的に正確にとり出されたものではないので, 何らかの基準で総菌数を等しくする必要がある。そこで菌液の混濁度がその中に含まれる総菌数に比例することから, 比濁法をもつて各層から作つた各菌液の菌数をそろえることとした。しかし同一材料から出発した試料であつても, 無処理のもの, 凍結融解又は凍結乾燥を行なつて菌体の破壊をきたしたものとでは, 菌液の混濁度に差違ができるので, 各条件についてそれぞれ検定を行なつておき, 実際の試料については, その値のずれだけ補正をしてから, 生菌数の測定に移つたのである。

第2図 *E. coli* 菌液の吸光度曲線第3図 *S. cerev.* 菌液の吸光度曲線

E. coli と *S. cerev.* の各濃度の菌液について予め求めた吸光度曲線は第2図と第3図に示す通りで、0.4 mg/cc~0.7 mg/cc の範囲では、菌数と混濁度との間には直線関係がみとめられた。そこで本実験では被験材料を凡そ 0.5 mg/cc 程度に稀釈した後、それぞれ比濁し補正の稀釈を行なった上で、生菌数の測定に移った。

III. 実験成績

同一条件で行なった実験3例の平均値を以つて示した。実験例数が少なく、定量性に欠ける憾みがあるので、今回は予報的に述べるにすぎない。

1. 含水率

実験方法の項で述べたように、乾燥開始後 1.5 時間で中止してとり出したものは、含水量の凡そ 70% が脱水されており、千葉の乾燥速度曲線¹⁾ でいえば、減率第1段階の途中に相当するものと思われる。

このような乾燥未完了時の乾燥部分の含水率は第1表に示すように、表層を含めた上層部では、*E. coli* が 21.4%、*S. cerev.* が 14.4% であるのに対して、下層部ではそれぞれ 27.4% と 20.5% になつていて、上層ほど含水量が少なく、乾燥の程度の進んでいることがわかる。なお菌の種類の相違としては、*S. cerev.* が *E. coli* よりも乾燥され易いことを示している。

更に乾燥終了時のものをみると、全体としてはもちろん含水率は低下しているが、部位としての差は余り明らかでない。その後なお乾燥を継続すると、*E. coli* では漸次含水率を低下するが、*S. cerev.* では 1.5 時間後で既にこの乾燥条件での最低限界に達したとみえて、大体

第1表 凍結乾燥過程に於ける試料中の部位による含水率の消長

乾燥時間	部位	試料	
		<i>E. coli</i> (%)	<i>S. cerev.</i> (%)
1.5時間(乾燥未了)	上層	21.4	14.4
	下層	27.4	20.5
7時間(乾燥終了時)	上層	5.0	5.0
	中層	4.3	4.8
	下層	4.4	4.5
更に30分乾燥後	全体	4.3	0.5
〃 1.5時間後	同	1.8	0.2
〃 2.5時間後	同	1.0	0.2

一定の含水率で止つている。

2. 菌生残率

含水率の場合と同様の過程について、実験方法の項で述べたような補正を加えながら菌の生残率をみると、第2表に示すように、乾燥の経過に伴つて、大体含水率に平行した生残率の減少がみとめられた。

第2表 凍結乾燥過程に於ける試料中の部位による生残率の消長

乾燥時間	部位	試料	
		<i>E. coli</i> (%)	<i>S. cerev.</i> (%)
無処理対照	全体	100	100
凍結融解	〃	92.2	46.7
凍結乾燥1.5時間 (乾燥未了)	上層	60.9	2.5
	下層	79.4	3.6
	凍結層	92.0	50.0
凍結乾燥7時間 (乾燥終了時)	上層	15.4	1.2
	中層	48.0	1.4
	下層	70.2	1.7
更に2.5時間乾燥後	全体	25.0	0.3

別に行なつた凍結融解の実験、即ち乾燥の場合と同一条件で凍結させ、10°Cの温浴槽で融解させたものでは、*E. coli* は92.2%、*S. cerev.* は46.7%の生残率を示した。之に対し乾燥未完了凍結部分は *E. coli* 92.0%、*S. cerev.* 50.0%で、ほぼ同じ値であることがわかつた。また同じ試料の乾燥部分の上層は60.9%と2.5%であり、下層は79.4%と3.6%であつて、上層部ほど生残率の低下することがみとめられた。第1次の乾燥終了時に於いてもほぼ同様の傾向でやはり上層部ほど生残率は低下するという結果を示した。

更に乾燥を継続した場合 *E. coli* はかなり減少するけれども、*S. cerev.* では既に相当乾燥が進んでいるため、それほど目立つた減少は示さない。

両菌種間の差はこの表にあげたように歴然としており、いずれにしても乾燥の度の進むほど菌の障害が大きくなるが、特に *S. cerev.* は *E. coli* よりもはるかに乾燥され易く、それだけ障害の度の大きいことを示している。

IV. 考 察

緒言に於いても述べたように、本実験の目的は乾燥機構の解明にあり、特に従来は試料全体を一括して扱って、その脱水量や生残菌の消長をしらべていたにすぎないのに反し、今回は更に試料の立体的構造を考慮して、部位によるそれらの変化を追究したものである。

このようなねらいで検討した結果は、本実験の成績が示すように、乾燥の経過に伴って表層部ほど乾燥の度が進み、含水量とともに生残菌も減少する傾向を示している。但し本実験では、実験例数は少なく、条件の吟味も充分でないので、定量的に余りはつきりした結論は下せない。今回は定性的な傾向を述べるにとどめて、今後更に検討したいと考えている。それにしても乾燥7時間のもので生残率では部位による差が明らかであるにも拘らず、含水率に殆んど差がないのは、実験の不備によるものか、もし真実とすれば解釈に苦しむところである。

乾燥過程での氷の昇華の状況を考えてみれば、部位的にみて表層から順次深層に向って進行するものであり、これを試料中の水分の立場からみれば、菌液中の水分の大部分を占めるところの菌体外の自由に存在し最もとれ易い水分から昇華が行なわれ、それに引続いて菌体周辺に密着したややとれにくい水分、そして最後に菌体内の水分が運ばれて行くものと想像される。しかもこれらの昇華過程が表層から深層に向ってすべてオーバーラップしながら進行しているであろうことがよくうかがわれるのである。

この場合、生物学的に最も意義が深いのは、菌体内水分の脱水であつて、これが前記のように、昇華前線の進行にややおくれて、やはり表層のものから深層のものへと絶えず進行しているものと考えられるのである。但しこの実験に於いて、果して菌体内水分が凍結していて昇華の形で脱水が行なわれているのか、或いは凍結しないままで蒸発の形で脱水が行なわれているのかは明らかでない。非常に重要な問題ではあるが、本実験の限りでは何れとも実証できないし、また今回のねらいの範囲を越えているので、さしあたりはふれないことにしておく。

いずれにせよ、この菌体内水分の脱水と考えられる過程及びそれによるとと思われる菌の障害が菌の種類によつてかなり異なるものであることは興味深い。この事実は既に桜田²⁾ や千葉等³⁾ によつてみとめられたことであり、本実験に於いて更に確認されたわけである。即ち同じ乾燥条件のものとの同一段階で、酵母の含水率、生残率が*E. coli* のそれよりはるかに低いということは、酵母のほうが菌体内脱水が容易に行なわれ、従つて菌の破壊もたやすくおこるからであろうと想像される。これは恐らく両菌種の細胞としての本質的な差違、とりわけ細胞膜の性状や細胞質の構造などによるものと考えられる。

更に乾燥過程での大腸菌と酵母との含水率と生残率との関係をよく観察してみると、含水率の割合からみて、酵母の生残率は大腸菌に比較してかなり低いのである。このことはやはり酵母が障害されやすいものであることをよく示していると思う。

また部位による差違を考えると、上層と下層の含水率の差は、大腸菌と酵母とで殆んど同じ程度だが、生残率については、大腸菌では上下でかなり差があるのに酵母では殆んど差がない。もつともこれは酵母の生残率がすべて低いために差が小さいのであつて、相対的に考えればあまり有意義な差はみとめられぬのかもしれない。しかしこの点に於いて意義をもめようとするれば、既に他の論文³⁾に於いて述べられたように、大腸菌では見かけの乾燥よりも菌体内水分の脱水はかなり遅れて進行するために、部位による差が大きくなるけれども、酵母では脱水され易いために、昇華前線の進行にあまり遅れることなく菌体内脱水が行なわれるので上下層による差違が殆んどなくなるのであろうとの推論が下される。しかしこの点に関しては今少し詳細な実験を行なつた後に論ずる必要があると思う。

菌の種類による差違はともかくとして、ほぼ乾燥が終了したと思われる時期にもなお試料中の部位によつて含水率に差があるものならば、今後乾燥終末点の決定に大きな問題を提起することとなるであろう。既に従来も多く論ぜられていたように、乾燥終了試料の残水量は、その後の保存の効果に大きな影響を及ぼすものであつて、適度の含水量でとどめるよう乾燥を完了することが必要である。ところがこれまでのように、試料全体として測定して適度の含水量を得たといつても、表層部ではそれよりも低く、深層部ではそれよりも高い含水度をもつていることになるから、適当であるとはいえない。これらの点に於いてもどのように扱うべきか、まだ問題は今後に残されていると思う。

V. 結 論

大腸菌と酵母の蒸溜水浮遊液を用い、凍結乾燥過程の各段階で、試料中の各部位の含水率と生残率を検討した結果

1) 含水率、生残率ともに乾燥時間の経過にともなつて漸次減少するが、表層部は深層部よりもその減少の程度が大きい。これは乾燥が表層から順次深層に向つて進行するとともに、ある限度に達するまでは、表層部でも引続き昇華が行なわれていることを示すものと思う。

2) 大腸菌と酵母とを比較してみると、各時期、各部位で酵母のほうが含水率も生残率も低いことから、酵母は脱水が速やかで菌の障害も早くにおこることがわかつた。

文 献

- 1) 千葉重雄 1957 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. 低温科学, 生物篇, **15**, 75-94.
- 2) 桜田弘一 1958 微生物に於ける凍結乾燥と液状乾燥の比較. 低温科学, 生物篇, **16**, 91-105.
- 3) 千葉重雄・坂上康雄・桜田弘一 1958 凍結乾燥に於ける乾燥機構. 含水量測定による乾燥過程の分析 III. 低温科学, 生物篇, **16**, 129-138.

Résumé

Using coli bacillus and yeast cell suspensions as experimental materials, the writers measured water content and survival of cells at the upper and lower part of the sample during the drying process.

Water content and survival rate were gradually reduced as the drying time passed and always showed less value at the upper part than at the lower part until the drying reached some certain limit.

It is considered that sublimation of ice proceeds from the surface of the frozen material to its bottom and that evaporation of remained water is still going on for a while even from the portion where visible ice crystal has already disappeared by sublimation.

Such reduction in water content and survival rate during freeze-drying was much more remarkable in yeast cell suspensions than in coli bacillus suspensions. The observations made during such a process show that yeast cells can easily be dehydrated and that cell injury caused by freeze-drying becomes manifest in the early stage of drying.