



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	凍結乾燥に於ける乾燥の機構 V : 薄片標本による形態的観察
Author(s)	根井, 外喜男; NEI, Tokio; 浅田, 実 他
Citation	低温科学. 生物篇, 18, 91-98
Issue Date	1960-11-04
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17644
Type	departmental bulletin paper
File Information	18_p91-98.pdf



凍結乾燥に於ける乾燥の機構 V*

薄片標本による形態的観察

根井外喜男 浅田 実

(低温科学研究所 医学部門)

(昭和 35 年 6 月受理)

I. 緒 言

凍結乾燥に関する種々の機構を明らかにする為には、全過程をできるだけ詳細に分析して考究する必要がある。その意味に於いて我々はこれまでも乾燥過程をいろいろの立場から観察し、また考察を進めてきた。特に蒸発脱水量の消長をめやすに乾燥過程の分析^{1),2),3)}を試みたが、1本の曲線で表現されるものには自ら限度があり、乾燥機構の全貌をうかがうにはまだ程遠かつた。

そこで、このような見地からの検討と平行して、形態的な立場での、例えば実際に試料自身の内部では、どのような状態で凍結し、昇華はどのように進行し、そして乾燥完了のものはどんな形態を保っているかを知りたいと思つた。立体構造を保持したまま、内部からの氷の昇華が行なわれると考えられている凍結乾燥過程の動的な経過を追究するために、まだ不十分ではあるが、さしあたって薄片標本を作ることにより、各時期に於ける状態を観察してみたのである。

このようにある現象を種々の角度から眺め、その観察事実を有機的に関連づけて説明を下すことは現象の本態をつかむのに有意義であろうと思う。

II. 実験方法

試料として主に家兔血清を用いた。血清が凍結乾燥の機構を研究するに当つての代表的な好試料にあげられるのは、定型的な海綿状構造を保つて乾燥されることにある。その外に一部寒天溶液及び酵母菌液を用いたが、その成績については次報に譲りたい。

先に行つた乾燥過程の重量変化の測定実験と対比するために、同じ形態の同じ容量の容器を用いた。但しセルロイド製容器では切片標本を作る時に壊しにくいので、パラフィン紙で同型の容器を作り、これに1cc血清を入れた。凍結は二種の冷却速度、即ち -30°C の低温室に放置して緩慢凍結させたもの及び液体窒素(凡そ -190°C)に浸して急速凍結を行なつたもので

* 北海道大学低温科学研究所業績 第558号

ある。それらの冷却速度は正確に測定してないが、緩慢凍結では -30°C まで達するのに凡そ30分、急速凍結では -190°C に達するのに1~2分を要したものと考えられる。凍結後、容量凡そ50 ccの磨合せガラス容器に移し、真空乾燥機にとりつけて型の如く凍結乾燥を行なった。装置は所謂豚式と称する放射状に多岐管を具えたもので、コンデンサーには液体窒素を用い、真空度は凡そ 10^{-2} mmHgであった。このようにして得た凍結試料、乾燥の途中の試料及び乾燥終了試料から、次のようにアニリン法によつて薄片を作り、顕微鏡でその構造を観察した。

薄片作製法は本研究所の木下、若浜等が考案した方法⁴⁾に倣い、アニリンの水飽和液が -12°C 附近を共融点とし、それより温度が高いと融けて液体となり、それより低い温度では凍結固化する性質のあることを利用したものである。

先ず凍結試料については、これを -25°C の室に移して、周囲の紙の容器を剝し、ある試料からは表層に対し平行の面が出るようにし、また他の試料からはそれに直角の面が出るようにして、機械鋸又は鉋で数ミリの厚さのブロックを切り出す。それを載せガラスの上におき、 -10°C くらいに保つたアニリン液で接着させる。液状のアニリンを試料の周辺に塗布すると、ガラスが冷えているので直ぐ固化し密着させることになるのである。次によく研いだ鉋で表面をできるだけ平滑に削つた上で、アニリンを剝して試料を裏返しにし、再びアニリンで接着して新しい表面を鉋で削り、試料の厚さを0.1 mmくらいにする。これを -10°C の室に移すと、アニリンだけが融解するので氷の部分がよく判別できるようになる。このようにして作つた切片標本を同じ -10°C の室に備えつけた偏光顕微鏡で観察するのである。

乾燥過程の途中の試料の内部構造をしらべるということは、昇華の進行状況を知るためであつて、上層は乾燥を終了しているのに、下層はまだ未乾燥で凍結状態にあるような時期をみることになる。それには乾燥の途中で真空ポンプをとめるとすぐ試料を乾燥装置から外して低温室に移し、凍結部分が融解しないようにする。先ず -10°C の室で約2時間アニリン液に浸し、大体乾燥部分の網目構造にアニリンが浸透したと思う頃に、 -25°C に移してアニリンを固化させ、後は前に述べたと同様にして切片を作るのである。この場合は、凍結試料或いは乾燥試料と違つて、凍結部分と乾燥部分(氷のない部分)とが隣り合せて2層をなしており、乾燥部分にはアニリンが浸透するが、凍結部分にはアニリンは入らない。しかも氷とアニリンとでは -25°C での固さが違うので、鋸で削る時に切りにくいし、また -10°C でアニリンを融かす時に凍結部分との境界線で遊離しやすい。更に中心部まではなかなかアニリンが浸透しにくい上に、余り長くアニリン液に浸しておくと、凍結部分に多少の変形をきたすように思われるなど、いろいろ技術的な困難さが加わるので、満足できるほどの標本は得られなかつた。

凍結乾燥を終了した試料には、氷はないのではや低温での処理は必要ないように思われる。従つて通常の組織の固定法並びに切片作製法の応用が考えられるが、血清成分を溶解するような物質を用いたのでは、海綿状構造を壊してしまうし、アルコール固定その他2, 3の方法を試みたところでは、あまりよい結果は得られなかつた。結局前と同様、低温でアニリンに浸したものが一番形を崩すことなく、海綿状構造の狭い間隙にもよく浸透するので、それを

-25°Cに移してアニリンを凍結させ、同一の方法で切片を作り、鏡検したのである。

写真撮影には多くカラー・フィルムを使用した。これは偏光顕微鏡を用いた時に、各氷結晶の区別、氷のある部分とない部分との区別などが明瞭になるからである。本論文挿入の印画は大部分そのカラー・フィルムから白黒フィルムに焼直したものである。

III. 観 察 結 果

1. 凍 結 標 本

前記のようにして作った凍結薄片を -10°C の低温室で主として偏光顕微鏡で観察した。

1) 急 速 凍 結

まず液体窒素に浸して急速凍結させた試料の水平断面では、円形をした標本のほぼ中心から周辺部に向つて放射状に走る無数の細い筋がみえる。これをグロス・ニコルの視野におくとやはりほぼ放射状に並びやや長い形をした多数のモザイク模様からできていることがわかる(図版 II-10)。

垂直断面では、氷晶の成長が周辺部から中心部に向つて進行し、最後に中心でぶつかり合った後表層部に盛り上つた様子がよくうかがわれる。又水平断面でみられたと同様の多数のモザイク模様がみつめられる。ただ表面から盛り上つた部分だけは、他とは異なり、非常に細かな網目状の構造を示している(図版 I-1, III-13)。これらのモザイク模様は、氷片の厚さ、偏光面の方向、及び結晶の主軸(C軸)の方向によつてきまるところの固有の色模様を呈するのである。更にこれを拡大してみると、各色模様別のモザイクの中に見事に平行に並んだ柵状の構造がみえる。そのうちの透明な部分が氷であつて、この互に平行した短冊状の結晶薄片は結晶光学的に同じ性質、同じ軸方向をもち、平行して成長したものとみなされる。これを grain と称するが、各 grain の間を界するものは、凍結の過程で濃縮されて残つた血清成分であろうと考えられる。これには連続してはつきりした境界線をなしているもの、或いはちぎれて粒状をなしているものなどがあるが、全体としてはきれいな柵状構造を呈している(図版 II-11, 12, III-13)。各 grain は幅凡そ 20~30 μ 、長径は長短さまざま、中には grain boundary が蜂巢状或いは網状となつてその中に grain がとりかこまれているものもある(図版 II-11)。これらの grain の集まりである各モザイク模様の大きな氷晶は、相互には軸方向が違ふのであるからそれを構成する柵状構造も必ずしも平行していないが、大体に於いては最初に述べた放射状の方向に一致している。

なお急速凍結の場合の特徴として、屢々大きな亀裂を認める。これは各氷晶が完成した後のできるものであることは、亀裂の両側の構造に連続性のあることからわかる(図版 I-1, II-9, 10)。

2) 緩 慢 凍 結

やはり容器の周辺から結晶の生成が始まるものと思われるが、その方向はかなり勝手であつて、急速凍結のように中心部から放射状に走る構造はみられないし、表面への盛り上りもな

い。各 grain は急速凍結のものに比較してかなり大きく、数倍乃至数十倍に相当する。大体は平行して柵状に並び、更にそれが大きな氷晶を形成している。部位によつては各 grain 毎に互に入り乱れて交錯しているところがある (図版 I-2, IV-14, 15, 16)。このような状態は急速凍結では殆んどみられない。

2. 乾燥過程の標本

実験方法の項でも述べたように、乾燥の途中の試料、つまり一部はほぼ乾燥が終了して海綿状の血清成分だけが残っており (水分量を測定していないので正確な乾燥度はわからないし、また残水率何%のものを乾燥完了というかの定義もない)、他にはまだ凍結したままの未乾燥部分があるという試料を薄片にするのは技術的に非常に困難である。特に急速凍結のものでは難しいので、今回は緩慢凍結のものだけについて観察した。ここでの観察の主要な目標は、乾燥つまり昇華の進行の状況、云いかえれば乾燥部分と未乾燥部分との境界の状態を知ることにあつた。しかしこの境界線では両部分に離れやすい傾向が強いため、なかなか良い標本はできなかつた。僅かに得られた幾つかの標本から次のように云えると思う。

grain の長軸が試料の表層の方向に向いているものは、容易に内部まで昇華が進むので、grain によつて歯の欠けたように凹凸がみられるが (図版 I-4, 5, 7)、同じ面にあつても、grain の長軸がそれと直角の方向にあるものは、grain boundary の血清成分に遮られて、昇華は容易に内部まで進行し得ない (図版 I-8, V-19)。従つて試料の垂直断面全体で眺めてみると、乾燥前線は決して平坦な一線 (立体的な試料全体として考えれば一つの面) をなしているものではなく、場所によつてかなり凹凸の多いものであることがよくわかる (図版 I-3, 6, V-17)。

また短冊状 grain の集まりである一つの氷晶のうちで一部乾燥したものについてみると、凍結部分とはほぼ同じ構造を示しているので、乾燥による変形或いは切片作製時の artifact は比較的少ないものと考えられる (図版 V-18, VII-25)。

3. 乾燥後の標本

乾燥の途中でも見られたように、乾燥後の試料の内部構造は凍結時のものと大差なく、見事な柵状構造又は網状構造をそのまま残している (図版 VI-20, 21, 22, 23, VII-26)。ただ中に多少不規則な構造や短冊状配列の乱れなどがみられるのは、切片を作るに当つての技術的な欠陥ではないかと思われる (図版 VII-24)。また凍結時の標本では、grain boundary は1本の線としてみとめられることが多いが、乾燥後の所見ではその厚みや細かな分岐或いは間隙など微細な構造までよくうかがい知ることができる (図版 VI-23, VII-25, 26)。

IV. 考 察

本実験のような形態的観察に於いて、特に立体的構造を云々する為には、連続切片でも作つて立体像を再現してみない限り正確な判断は下せないとしても、切片の顕微鏡的観察の結果から、ある程度の推定はできるものと思う。凍結に引続いて行なわれる乾燥過程での脱水の状況なども、そこに意味に於いて、切片の観察からある程度の想像は可能であるといつてさしつか

えあるまい。

ただここで問題なのは、切片標本作製時の温度である。薄片を作つてそれを観察する為には、アニリンを凍らせたり融かしたりするのに -25°C や -10°C の低温室にかなりの時間おかねばならない。血清の共融点(氷晶点)は何度か明らかでないが、 NaCl のそれに近いか又はそれより低いとも云われるので、 -10°C に上げたのでは、氷晶の形態に多少の変化をきたすかもしれない。このような疑点の入る余地のないようもつと低い温度で切片を作ることを考えたのだが、アニリンに代つてそのように低い温度での処理に適する試薬はみあたらなかつたこと、また温度が低くなるほどいろいろの点で標本作製が困難になること等、温度に関しての充分な検討はまだすんでいない。

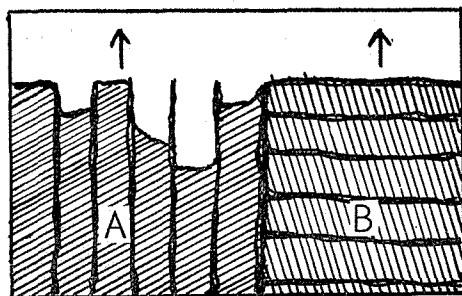
しかし乾燥終了後の試料の切片を作るのには、アニリンによる凍結法が非常に好都合であつた。通常用いられる組織の固定剤では、血清成分を溶解したり形を崩したりすることが多いが、アニリンにはその憂いはないようだつた。従つてこの方法を用いて得た所見は、試料そのものの真の形態を示しているものと考えてよいであろう。ただ度々述べたように、低温での特殊の処理であるから、操作の過程での技術的な artifact による変化は全くないとは云い切れない。また乾燥後の所見が凍結時のそれと異なつていたとしても、乾燥過程での水蒸気分子の移動或いは表面張力に伴う多少の変形によるものといえるのかもしれない。

液状試料を凍結させる時、その中に出来る氷晶の形態は、容器の形などによつても違つてあろうが、冷却速度に左右されるところが最も大きい。本実験の観察結果からもわかるように急速凍結と緩慢凍結のこの程度の冷却速度の差でも、明らかに grain の大きさ、氷晶の形や方向性などの異なることがよくみとめられた。概念的に急速凍結では氷晶は小さいが数は多く、緩慢凍結では氷晶の形は大きいが数は少ないということは、よく知られているところである。

そこでこの冷却速度による凍結の状態の差が如何に次の乾燥速度に関係するかということについては、これまでもあまりはつきりした結果が得られていない。乾燥速度に殆んど差がなかつたり¹⁾、急速凍結のものの方が乾燥速度が大きいといわれたり²⁾したが、経験的には緩慢凍結の方が早く乾くようにも思われる。試料が純粹の水であつて、各氷晶がそれぞれ独立した粒子であるならば、その表面積から考えて当然凍結速度の大きなものは乾燥速度が大きくなるであろうが、既に再三述べているように、各 grain はすべて濃縮された血清成分にとりかこまれているので、その grain が相互に連接しているか、或いは全く個々に独立しているかによつて乾燥速度は違つてくることになる。この点については、もう少し立体構造を知る方法を工夫し検討しなければ、明らかににはできないが、例えば図版 II-11, III-13, IV-14, 16 のような所見からすれば、緩慢凍結の方が昇華には好都合であるといえるように思う。

また乾燥過程の機構を考えてみるのに、例えば蒸発水分量の変化から求められた乾燥曲線^{2),3)}は、多数の実験例から得られた値をまとめて smooth curve として表わされたものであり、時々刻々に変化しつつある三次元的な現象を一つの点として記録し連続して線として表現しているにすぎない。しかし試料の立体的構造から考えて、同一時点に於ける現象或いは変化

といつても、試料の中の部位によつて決して同一ではないであろうし、それを総合したものが常に一定の値を示すとは限らないであろう。例えば恒率乾燥過程とはいつても、微視的に考えれば、その時の最も昇華の盛んな部分の氷晶の状態によつては、多少の変動があつてもよいと思う。このことは第1図で示された氷晶の状態からでも理解できることである。さきに乾燥速度曲線に於いて、特に昇華の盛んな時期に、実験誤差以上と思われる曲線上の小さな変動をみとめた¹⁾のは、この点を裏付けるものかもしれない。



第1図 氷晶の方向と乾燥の運速

さて、従来細胞や組織から作られた凍結乾燥標本は別として、血清のような液状試料の乾燥後の形態的観察を行なつたものとしては、内藤の著述⁶⁾に掲載された写真を見出すだけである。今日ではその原著を入手することができず、わずかに弱拡大の該図から網状構造をうかがう程度で、より微細な構造については知ることができない。

一方凍結乾燥に於ける乾燥過程で、凍結試料の内部からどのような機序で昇華が行なわれているかについての形態的立場からの検討としては、Stephensonの理論的見地での模式図⁷⁾があげられるくらいで、実験的研究は見当らない。

本実験もまだ緒についたばかりで、不十分な点が多々感ぜられる。従つてこの程度の実験では到底乾燥機構の全貌はうかがうべくもない。今後更に、多くの試料につき、種々条件を変え、検討を重ねて、形態的な微細構造を一層はつきりさせることができるならば、他の立場からの吟味と総合することによつて、機構解明に役立たせうるものと考えている。

V. 結 論

血清を1cc一定の形の容器に入れ、液体窒素又は -30°C の低温室で予備凍結させたものを、常法に従つて凍結乾燥した。

予備凍結だけのもの、乾燥の途中のもの及び乾燥の完了したものについて、アニリン法によつて凍結薄片を作り、 -10°C の室で偏光顕微鏡を用いて観察した。

その結果、短冊状 grain とその周囲の血清成分、更にそれら柵状構造からできた氷晶のモザイク模様がよくみとめられ、その大きさ、形、配列等は最初の冷却速度によつて異なることが確認された。乾燥過程での標本では、乾燥部分と凍結部分の境界の状態をみることができ、それから氷の昇華の状況がうかがわれた。乾燥完了後も、最初の凍結時の内部構造をほぼ保持し、凍結速度による形態的差違はよくみとめられた。

主要文献

- 1) 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**, 59-65.
- 2) 千葉重雄 1957 同 II, 同誌, **15**, 75-94.
- 3) 千葉重雄・坂上康雄・桜田弘一 1958 同 III, 同誌, **16**, 129-138.
- 4) 木下誠一・若浜五郎 1959 アニリン固定法による積雪の薄片. 低温科学, 生物篇, **18**, 77-96.
- 5) 佐原幸雄 1953-1955 凍結乾燥に関する基礎的研究 1-7. 日本細菌学雑誌, **8-10**.
- 6) 内藤良一 1943 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, 1-116.
- 7) Stephenson, J. L. 1953 Theory of the vacuum drying of frozen tissues. Bull. Math. Biophys., **15**, 411-429.

Résumé

After the rabbit serum of 1 cc in volume contained in a special paraffined paper vessel was rapidly frozen by direct immersion in liquid nitrogen or slowly frozen by air cooling at -30°C ., drying was done with ordinary freeze-drying procedures.

Of the frozen, half-dried and dried materials obtained at each stage of the freeze-drying process, thin sectioned specimens were made by use of anilin as a fixing material at low temperatures ranging from -10° to -25°C .. Observations with polarizing microscope at -10°C . revealed the following findings.

Typical mosaic patterns, composed of numerous small ice crystals (grains), thin but long, lined up side by side in parallel, were visible under crossed nicols. The sizes, shapes and arrangements of those large and small ice crystals depended upon the cooling rate during the prefreezing process.

Many figures obtained from the half-dried specimens illustrated the situation at the juncture of the dried and frozen part and suggested to the writers the process of sublimation of ice crystals.

The completely dried material showed the network structures just like the figures of grain boundary in the frozen state of the same kind of material.

図 版 説 明

- 図版 I-1 急速凍結 (-190°C) 試料の凍結状態。 倍率 $\times 6$
- 図版 I-2 緩慢凍結 (-30°C) 試料の凍結状態。 倍率 $\times 6$
- 図版 I-3 緩慢凍結試料の乾燥過程 (上半部は乾燥部分, 下半部は凍結部分)。 倍率 $\times 6$
- 図版 I-4 3. の一部 (下半部は凍結部分, 3. と色調は異なる)。 倍率 $\times 24$
- 図版 I-5 3. の一部 (左半部は凍結部分, 3. と色調は異なる)。 倍率 $\times 24$
- 図版 I-6 緩慢凍結試料の乾燥過程 (上半部は乾燥部分, 下半部は凍結部分)。 倍率 $\times 6$
- 図版 I-7 6. の一部 (下半部は乾燥部分, 6. と色調は異なる)。 倍率 $\times 24$
- 図版 I-8 6. の一部 (下半部は凍結部分, 6. と色調は異なる)。 倍率 $\times 24$
- 図版 II-9 急速凍結試料の凍結状態 (普通写真)。
- 図版 II-10 急速凍結試料の凍結状態 (偏光写真)。
- 図版 II-11 急速凍結試料の凍結状態。
- 図版 II-12 急速凍結試料の凍結状態。
- 図版 III-13 急速凍結試料の凍結状態 (試料中心部の垂直断面, 表層から底面まで)。
- 図版 IV-14 緩慢凍結試料の凍結状態。
- 図版 IV-15 14. の一部。
- 図版 IV-16 14. の一部。
- 図版 V-17 緩慢凍結試料の乾燥過程 (I-6 と同一のもの, 上半部は乾燥部分, 下半部は凍結部分)。
- 図版 V-18 17. の一部 (左上半部は乾燥部分, 右下半部は凍結部分)。
- 図版 V-19 17. の一部 (上半部は乾燥部分, 下半部は乾燥部分)。
- 図版 VI-20 急速凍結試料の乾燥後の状態。
- 図版 VI-21 急速凍結試料の乾燥後の状態。
- 図版 VI-22 急速凍結試料の乾燥後の状態。
- 図版 VI-23 急速凍結試料の乾燥後の状態。
- 図版 VII-24 緩慢凍結試料の乾燥後の状態。
- 図版 VII-25 緩慢凍結試料の乾燥後の状態 (これだけは乾燥過程のものである。上部は乾燥がすすんでいるが, 下部には凍結部分が残っている)。
- 図版 VII-26 緩慢凍結試料の乾燥後の状態。

