



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	凍結乾燥に於ける乾燥の機構 VIII : 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 (第2報)
Author(s)	根井, 外喜男; NEI, Tokio; 僧都, 博 他
Citation	低温科学. 生物篇, 19, 59-72
Issue Date	1961-12-20
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17652
Type	departmental bulletin paper
File Information	19_p59-72.pdf



凍結乾燥に於ける乾燥の機構 VIII*

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 (第2報)

根井外喜男 僧 都 博
花房尚史 荒木 忠

(低温科学研究所 医学部門)

(昭和36年7月受理)

I. 緒 言

凍結乾燥では試料は立体構造を保ったまま表層から深層に向って乾燥が進行するので、試料を表層から深層に亘る幾つかの層に分けて、各部分に於ける乾燥度(含湿度)とその部分にある細胞のもつ活性度とを、それぞれ乾燥の全過程に亘ってしらべ、乾燥の経過に伴うそれらの変化或いは相互の関係を比較することによって、凍結乾燥に於ける乾燥の機構を追求しようとした。前報¹⁾では、まだ実験例数が少なく従って予報的に発表したに過ぎないが、今回は更にそれを補充確認する意味で行ない、特に実験方法中不備と思われた幾つかの点に改善を加え、例数も可及的多くして、誤りの少ないよう努めた。

II. 実験方法

1. 実験材料

実験材料には前回同様酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 及び大腸菌 *Escherichia coli* を用いた。前者は麦汁寒天培地 27°C 2 日間培養のもの、後者は普通寒天培地 37°C 24 時間培養のものを、いずれも蒸溜水で3回遠心洗滌した後、それぞれ蒸溜水で 500 mg/ml 又は 200 mg/ml の濃度の菌浮遊液を作った。*S. cerev.* は蒸溜水浮遊液とすると、凍結乾燥の際飛散しやすいが、菌濃度を 500 mg/ml くらい高くするとそのおそれはなくなる。一方 *E. coli* は *S. cerev.* に比較して菌濃度が低くても飛散は少ないし、培養による菌収量もかなり少ないので、200 mg/ml の菌濃度を用いた。通常の凍結乾燥では、この様な高濃度の菌液はあまり用いられないが、本実験では前述の様な理由の外に秤量の際の誤差をなるべく少なくすることに留意したからである。

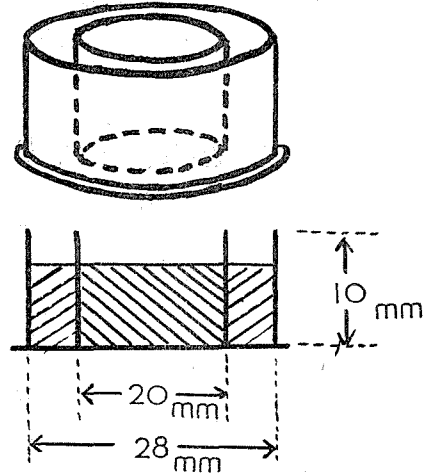
蒸溜水浮遊液の外に、各種媒質を比較検討する目的で、ゼラチンとブドウ糖とを用いた。即ち 1% ゼラチン溶液又は 5% ブドウ糖溶液中で3回遠心洗滌した上で、それぞれの液に再浮

* 北海道大学低温科学研究所業績 第589号

遊させた。

2. 凍結乾燥法

凍結には第1図のような容器を用いた。日本紙を糊づけして作り、パラフィンをしみ込ませて水を透過しないようにしたものである。これに6mmの高さまで菌液を入れると内側の菌液量は2mlとなる。このような二重壁の容器を用いたのは、別に報告²⁾するように、乾燥の過程では、下層に向って進行する乾燥の frontline (面) が平面にならず周辺部が早く乾燥して山形になりやすいので、いろいろ条件を変えて試してみた結果、この型の容器を用いてしかも次の様な凍結乾燥の方法をとる場合、比較的平面をなす事を知ったからである。

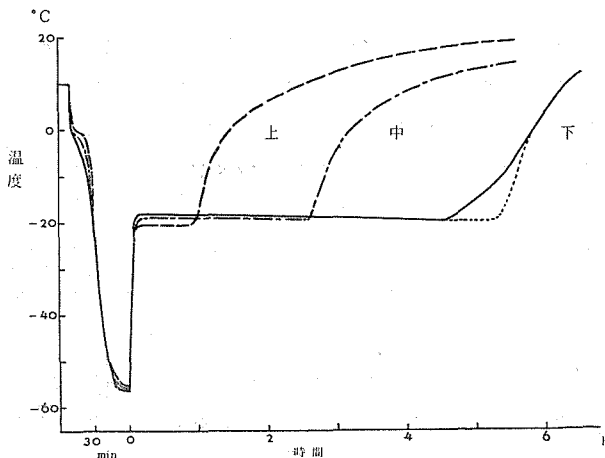


第1図 試料容器

予備凍結の方法については、種々検討した結果(別報)³⁾、底面から凍結が進行するよう次の方法を用いた。

魔法瓶中に真鍮の円柱を立て、それに一定量のドライアイス—アルコールを入れて冷却し円柱上に試料の入った容器をのせると一定の冷却速度で試料が凍結する。魔法瓶に30分間おいて充分凍結したのち、ガラス製磨り合わせ容器の底に置いたコルク片(断熱の為に入れる)の上に移して、すぐに凍結乾燥機にとりつけ、乾燥を開始する。乾燥の開始と同時に容器を30°Cの温湯中に浸して周囲から試料をあたためる。

乾燥機は放射状に多岐管をとりつけた装置で、中央の凝縮器には液体窒素(-197°C)を用い、到達真空度 2×10^{-3} mmHg、排気量100 l/minの油廻転ポンプで真空を保った。この条件での実験終了時間(肉眼的な乾燥終了時間より更に3時間経過したもの)は12時間であった。



第2図 凍結乾燥過程の温度の消長

この凍結及び乾燥過程での試料の上中下3層に於ける温度変化は特に作った熱電対及び電子管式自記記録計によって記録された(第2図)。加温の温度を30°Cとしたのは、外部条件中の温度を一定にして、しかも其の日のうちに1系列の実験を完了できるように乾燥速度を適度に加減する必要があったからである。なお温度曲線から試料内部には過度の温度上昇のないことが確かめられた。

3. 含水率測定

試料の表層から順次深層に向って進行する乾燥過程で見かけ上の乾燥終了部分が全試料の1/3, 2/3, 3/3に当る時刻を予備試験で大体確かめておく。前記のようにして凍結の後乾燥の段階に入ってきた試料は、各時刻で乾燥を中断し、未乾燥部分の融解を防ぐために、真空に封じたまま直ちに -30°C の低温室に移す。そこで真空を破り、試料を取り出し、形が崩れないように金属の型に入れておさえながら、鋭利な剃刃で紙の容器のまま底面に平行に上中下の3層に分けて切り出し試料だけを秤量瓶にとる。これをデシケーター中に納めて常温の室で温度が戻るのを待って秤量する。この値を a とする。次に秤量瓶のまま磨り合わせ容器に入れ 60°C の温浴槽中、真空度 10^{-5}mmHg で2時間乾燥を行なう。乾燥終了後再び秤量してこの値を b とする。 $\frac{a-b}{b} \times 100$ を以て本実験に於ける含水率とする。なお b の値は更に乾熱滅菌器で 105°C 2時間加熱しても最早変らない。

4. 生菌数測定法

各乾燥段階でとり出された試料は量的に一定ではないので、生菌数を測定するためには各条件の試料は一定の規準のもとに菌液濃度がそろえられねばならない。前報¹⁾の実験では、菌液濃度を比濁によってきめることとし、各条件の処理を行なった後の菌液について混濁度を測定して総菌数を整え、更に凍結融解や凍結乾燥によって生ずる混濁度の変化の分だけ補正を行なった上で、生菌数の測定を行なったものである。

今回は比濁法によらず、直接重量を測定することによって総菌数をそろえた。即ち各試料毎に乾燥重量を測定し、それを規準として、一定の稀釈を行なって菌液を作り、更にそれを適当な濃度まで稀釈してplate count法を行ない、発育集落数を数え無処置の対照を100とする%で表わした。なお試料は乾燥したまま個々の容器を密封して -30°C の低温室に1夜放置し、翌日稀釈培養したものである。

同一条件の実験を各4例乃至8例ずつ行なった。後の成績の項に掲げる表中実験例1と2、3と4、5と6のそれぞれ2例ずつは同一日に同時に行なったものであり、いずれも同一の試料を2つに分けて含水率と生菌率とを測定した。

III. 実験成績

1. 含水率

さきにのべたように、試料全体を3層に分けて、乾燥過程の各時期に各層の含水率をしらべたのである。

1) *S. cerev.*

先ず蒸溜水浮遊液について見ると2.0~2.5時間後の上層だけが乾いた時の含水率は18.6%で中、下層はまだ凍結中であつた。それが中層まで乾燥が進行した時には、上層は11.3%となるが、凍結中の下層に接している中層では18.5%で2.0~2.5時の上層にはほぼ近い値である。更に8.0~9.0時間後の下層まで乾燥が終つたと思われる時は、上層は7.9%と減少し、中層は11.1

第1表 酵母の各種浮游液の凍結乾燥過程での部位による含水率の消長

I. 蒸留水浮游液

実験例	時間 部位	含 水 率 (%)										
		2.0~2.5 hrs		4.5~5.0 hrs			8.0~9.0 hrs			11.0~13.0 hrs		
		上	中・下	上	中	下	上	中	下	上	中	下
No. 1		17.6	凍	14.8	22.3	凍	10.2	13.0	26.7	1.9	2.2	2.8
No. 2		18.5		10.3	17.3		9.9	10.0	14.6	1.4	1.5	5.9
No. 3		19.0	結	8.8	19.3	結	5.9	13.4	19.2	1.5	1.4	0.7
No. 4		15.4		13.3	20.4		5.6	7.8	14.0	1.3	0.9	2.4
No. 5		19.1	中	9.1	15.3	中				1.0	1.4	1.9
No. 6		20.3		10.5	16.2					1.6	1.1	1.1
平均		18.6		11.3	18.5		7.9	11.1	18.6	1.5	1.4	2.5

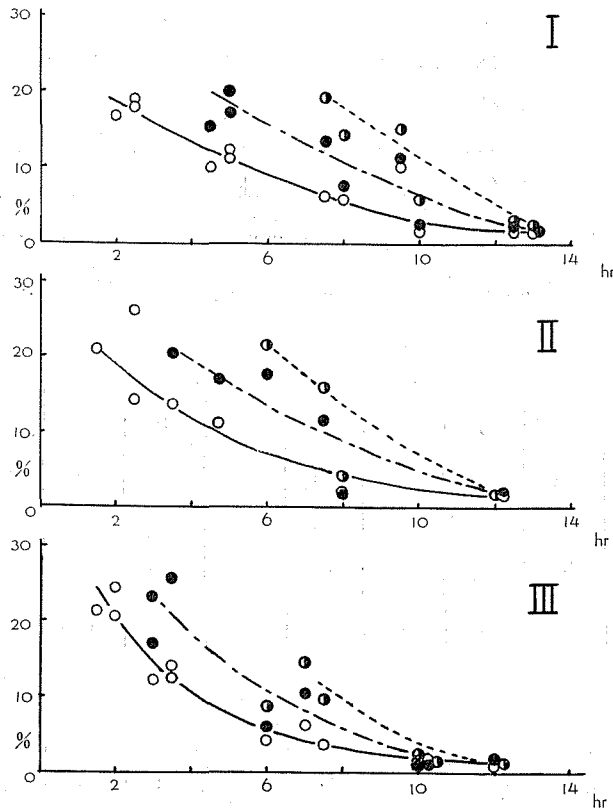
II. 1%ゼラチン浮游液

実験例	時間 部位	含 水 率 (%)										
		1.5~2.0 hrs		3.5~4.5 hrs			6.0~8.0 hrs			8.0~12.0 hrs		
		上	中・下	上	中	下	上	中	下	上	中	下
No. 1		14.0	凍	11.0	17.1	凍	14.4	19.5	21.0	1.5	2.2	1.3
No. 2		26.5	結	11.5	17.2	結	13.6	16.3	21.7	1.5	1.8	2.3
No. 3		19.9	中	11.7	20.0	中	12.0	11.5	16.7	2.7	1.8	1.5
No. 4		21.6		15.1	20.5		10.8	18.6	15.0	1.5	2.1	3.3
平均		20.5		12.3	18.7		12.7	16.5	18.6	1.8	2.0	2.1

III. 5%ブドウ糖浮游液

実験例	時間 部位	含 水 率 (%)										
		1.5~2.0 hrs		3.0~3.5 hrs			6.0~7.5 hrs			10~12 hrs		
		上	中・下	上	中	下	上	中	下	上	中	下
No. 1		20.1	凍	13.3	25.9	凍	3.2	4.4	9.4	0.8	0.9	1.1
No. 2		22.5					3.7	5.1	8.9	0.0	1.7	1.2
No. 3		23.8	結	12.4	25.0	結	3.9	6.0	8.5	2.6	0.8	1.8
No. 4		25.2		12.3	21.2		4.4	5.4	7.5	1.5	1.5	1.5
No. 5		19.7	中	12.3	16.4	中	6.9	10.1	10.1	1.5	1.0	2.2
No. 6		20.8		12.5	18.5		6.7	11.4	11.4	2.2	1.7	1.6
平均		22.0		12.6	20.1		4.8	7.1	10.5	1.4	1.3	1.6

%となる。この時の下層は18.6%で凍結層に接していた時の2.0~2.5時間後の上層或は4.5~5.0時間の中層のそれにほぼ等しい。全体が大体乾燥したと思われる時から更に3時間おいてしらべて見ると、もはや上下の差はなくなって、各層ともほぼ等しい含水率を示している。その後引き続き乾燥を続けても(3時間)もはや含水率に変わりがないことから、この条件に於ける乾



第3図 部位別の含水率の時間的推移 (酵母)

I. 蒸溜水浮遊液 II. 1%ゼラチン浮遊液 III. 5%ブドウ糖
 浮遊液 ○ 上部 ● 中部 ◐ 下部を表わす
 縦軸は含水率 横軸は乾燥時間を表わす

乾燥の終末点に達していることがわかる。要するに乾燥は上層から下層に向かって進行しており、乾燥部分の前線が通過して見かけ上は乾燥が終了したように見える層であっても、まだ含水量が多く、ある限度に達する迄は引続き乾燥が進行しているものであることがわかる。しかも乾燥の前線から見た水分の分布状態は、乾燥の時間の経過や部位に対してほぼ平行移動する形で、表層からの距離に無関係に、前線、つまり凍結層に接する面からの距離によって一定している (第3図 I)。

言いかえれば、下層に凍結層が残っている間は、それより上の層では、含水量に勾配があるが、凍結層がなくなった後に始めて次第に全層が均一の含水量に近づく。

以上は蒸溜水浮遊液で得られた結果であるが、1%ゼラチン溶液で菌浮遊液を作って行なった実験についても全く同様の経過が認められた (第3図 II)。又5%ブドウ糖溶液の浮遊液では、全体の傾向としては蒸溜水やゼラチン溶液の場合と大差はないが、ただ一般に乾燥速度が大きいようで、従って一定時間後の含水量はブドウ糖溶液の場合が他より小さい (第3図 III)。

2) *E. coli*

次に *E. coli* についても全く同様の実験を行なった結果を *S. cerev.* と比較して見る (菌濃度だけは 200 mg/ml でやや低い)。

上層から下層に向っての乾燥の進行に伴って順次含水量が減少し、最後に全層が均一になるという乾燥過程の本質には変りないが一般に乾燥速度がおそく、同一時間の乾燥では *E. coli* の方が含水量が多い (第 4 図 I, II, III)。例えば、蒸溜水浮遊液でも 1% セラチン浮遊液でも、

第 2 表 大腸菌の各種浮遊液の凍結乾燥過程での部位による含水率の消長

I. 蒸溜水浮遊液

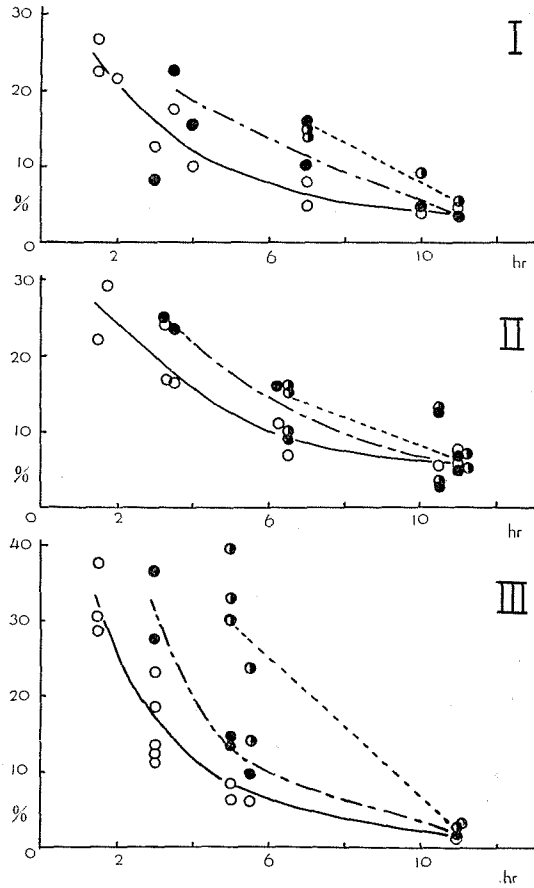
実験例	時間 部位	含 水 率 (%)										
		1.5~2.0 hrs		3.0~4.0 hrs			7.0 hrs			10.0~11.0 hrs		
		上	中・下	上	中	下	上	中	下	上	中	下
No. 1	21.5	凍	—	—	凍	8.0	16.0	14.2	3.7	4.4	9.1	
No. 2	22.5	結	9.3	18.2	結	4.7	10.1	14.3	—	—	—	
No. 3	25.8	中	16.7	21.6	中	9.6	11.6	8.7	5.2	5.7	5.2	
No. 4	28.4		17.5	23.8		7.5	12.9	11.9	4.2	2.2	4.9	
平 均	24.6		14.5	21.2		7.5	10.2	12.3	4.4	4.1	6.4	

II. 1%セラチン浮遊液

実験例	時間 部位	含 水 率 (%)										
		1.5 hrs		3.3~3.5 hrs			6.5 hrs			10.5~11.0 hrs		
		上	中・下	上	中	下	上	中	下	上	中	下
No. 1	27.8	凍	15.1	21.9	凍	7.1	—	8.5	5.1	2.5	2.7	
No. 2	30.4	結	17.1	25.6	結	6.7	8.8	15.8	—	—	—	
No. 3	23.3	中	16.5	24.8	中	10.9	—	13.4	5.5	4.7	4.8	
No. 4	20.4		24.1	25.6		11.3	16.5	19.2	7.7	6.8	6.2	
平 均	25.5		18.2	24.5		9.0	12.6	14.2	6.1	4.6	4.6	

III. 5%ブドウ糖浮遊液

実験例	時間 部位	含 水 率 (%)										
		1.5 hrs		3.0 hrs			5.0~5.5 hrs			10.0~11.0 hrs		
		上	中・下	上	中	下	上	中	下	上	中	下
No. 1	30.5	凍	13.6	24.4	凍	5.2	8.2	14.3	1.5	0.8	1.2	
No. 2	30.4	結	23.0	30.1	結	6.9	10.8	23.6	1.0	0.8	2.5	
No. 3	28.6	中	11.4	32.6	中	8.0	8.7	29.6	1.1	1.0	1.6	
No. 4	28.9		18.5	—		8.1	13.8	31.0	1.0	1.5	3.0	
No. 5	33.0		11.7	—		6.4	12.5	33.4	2.2	1.9	2.7	
No. 6	—		12.9	—		6.7	10.1	—	2.0	1.3	1.5	
平 均	30.3		15.2	29.0		6.9	10.7	26.4	1.6	1.2	2.1	



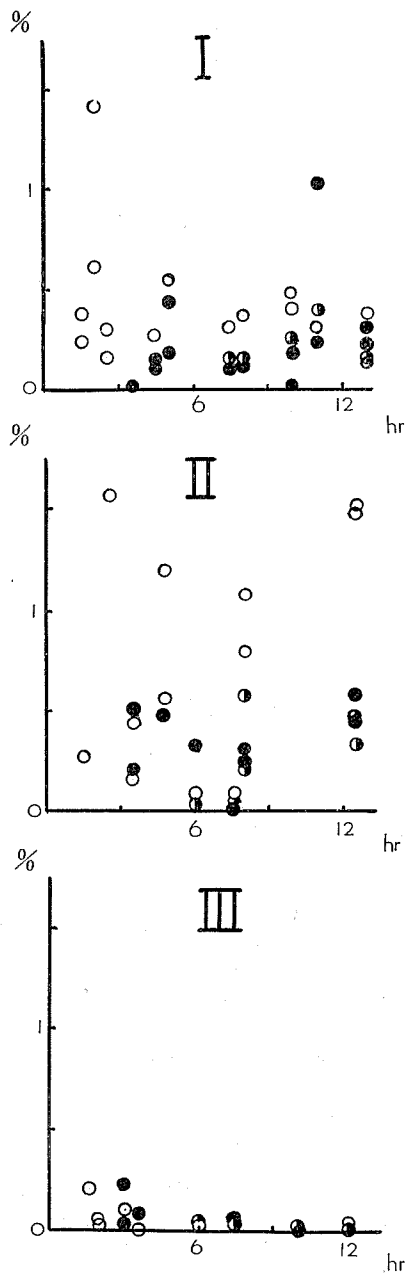
第4図 部位別の含水率の時間的推移 (大腸菌)

I. 蒸溜水浮游液 II. 1%ゼラチン浮游液 III. 5%ブドウ糖
 浮游液 ○ 上部 ● 中部 ● 下部を表わす
 縦軸は含水率 横軸は乾燥時間を表わす

凍結層に接する乾燥層の含水率は *S. cerev.* が凡そ 18% 前後であるのに比して *E. coli* は 20 乃至 30% くらいの値を示している。最後の全層が均一になった時の含水率も *S. cerev.* の 2% 前後に対して、*E. coli* では 4~6% で、かなり高い。

乾燥過程での各部位の相互関係は、傾向として、*S. cerev.* の時と大した差はない。ただ 5% ブドウ糖溶液に浮遊した場合は *S. cerev.* と同様他の媒質を用いた時と多少異なり、凍結層が残っている間は、それに接する層が比較的含水率が大きくて、30% 以上の値を示しているのに、凍結層がなくなると急に低下して、最後には 1~2% の含水率を示す。

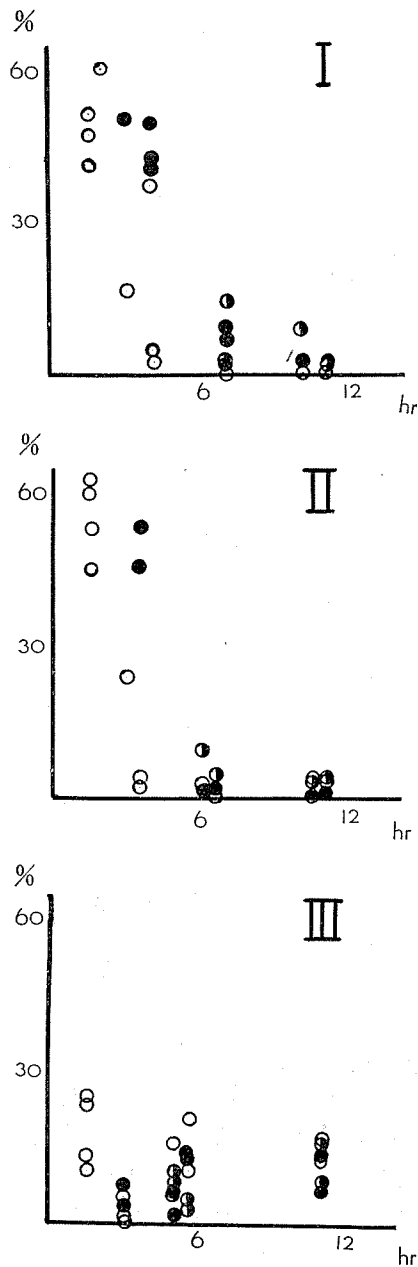
この凍結層と接する層の含水率が高いことはブドウ糖溶液の性質によるものらしく、恐らくは濃縮されたブドウ糖溶液が融解してくるのを部位に分ける際に測りこむためであろうと思われる。



第5図 部位別の生残率の時間的推移 (酵母)

I. 蒸溜水浮游液 II. 1%ゼラチン浮游液
 III. 5%ブドウ糖浮游液

○ 上部 ● 中部 ◐ 下部を表わす
 縦軸は生残率 横軸は乾燥時間を表わす



第6図 部位別の生残率の時間的推移 (大腸菌)

I. 蒸溜水浮游液 II. 1%ゼラチン浮游液
 III. 5%ブドウ糖浮游液

○ 上部 ● 中部 ◐ 下部を表わす
 縦軸は生残率 横軸は乾燥時間を表わす

2. 生 残 率

1) *S. cerev.*

(1) 乾燥過程特に部位と生残率との関係

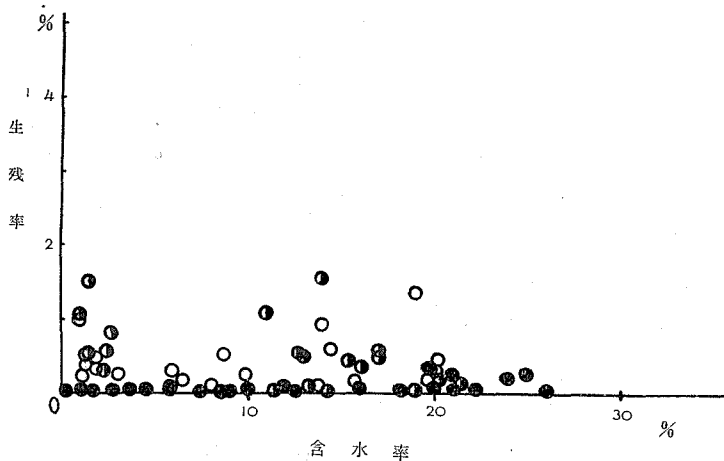
第5図でみられるように、これらの乾燥層での生残率はいずれもほぼ1%又はそれ以下となっている。但しその値は個々の例によってかなり変動が大きく、乾燥の経過時間から見ても或いは部位から見ても必ずしも一定の傾向はみとめがたいようである。

蒸溜水浮遊液やゼラチン浮遊液では、むしろ概して上層の方が生残率が高いようにさえ見えるので、乾燥以前の問題として、凍結過程だけで部位による差が出来るのではないかと考え、その点の吟味を行なった。即ち凍結乾燥を行なうのと全く同一の条件で予備凍結だけを行ないそれを -30°C の低温室で3層に切り出して試験管にとり $+30^{\circ}\text{C}$ の温浴槽で融解して生菌数をしらべてみた。その結果部位による生残率の差は全く認められなかった。

ブドウ糖浮遊液では乾燥の初期から乾燥部分の生残率は低く、大部分のものが0.1%以下の値を示した、この場合にも時間や部位によるはっきりした差はみとめにくかった。

(2) 含水率と生残率との関係

時間の経過や部位を問わず、含水率と生残率との関係を図示すると第7図の通りである。この図から一見してわかるように、生残率の分散がかなり大きくて含水率との相関関係は見出し難い。ただブドウ糖浮遊液では、一般に値が低いせいもあって、含水率の多寡に無関係に、ほぼ同じ程度の生残率を示すように見える。



第7図 含水率と生残率との関係(酵母)

- 蒸溜水浮遊液 ● 5%ブドウ糖浮遊液
⊖ 1%ゼラチン浮遊液を表わす

2) *E. coli*

*E. coli*の生残率は第6図にみられる通り *S. cerev.*に比較してはるかに大きな値であった。

(1) 乾燥過程特に部位と生残率との関係

蒸溜水浮遊液と1%ゼラチン浮遊液とでは、同じ部位のものは時間の経過するに従い生残率が低くなり、また同じ時刻のものは上層ほど生残率が低くなっていることから、結局、乾燥が進む程生残率の低下することがわかる。しかし5%ブドウ糖浮遊液では、かなり様子が異なり乾燥過程の途中で生残率が低く、乾燥終了後の生残率がかえって高いという結果を示している。

ブドウ糖溶液は、 -30°C ぐらいまでの温度で凍結させたのでは、そのまま長時間おくと凍結状態が変ることを経験しており、試料は乾燥したものとは言え、ある程度の水分量を持ったまま一夜保存されていて、其の間に多少の変化のおきるおそれがあるので、保存時間の吟味を行なってみた。即ち同一乾燥試料をすぐに秤量、稀釈、培養を行なうものと、一夜 -30°C においた後同じ操作で培養したものと生残率を比較してみると、第3表の如く、かなり生菌数の減少することが認められた。

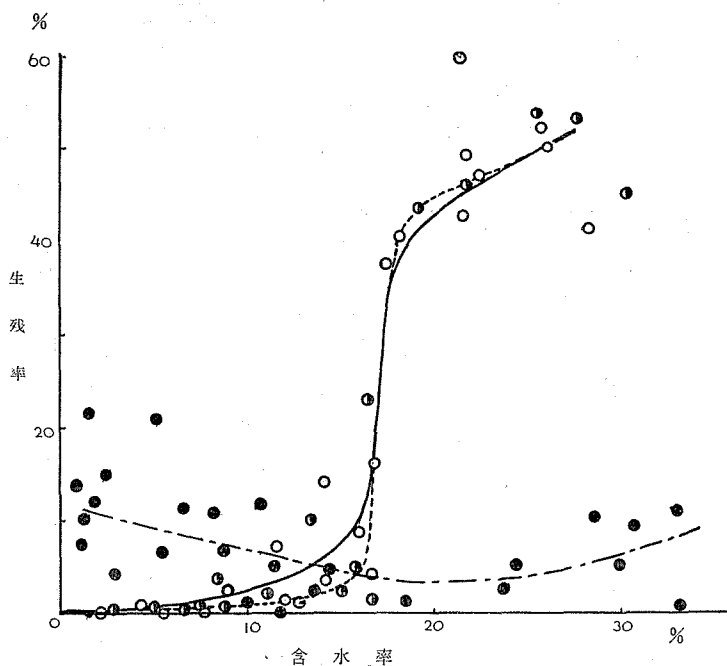
第3表 乾燥試料の即日培養と翌日培養の比較 (大腸菌ブドウ糖浮遊液)

部 位	1.5 hrs		3.5 hrs		7.0 hrs		10.5 hrs	
	生 残 率 (%)		生 残 率 (%)		生 残 率 (%)		生 残 率 (%)	
	即日培養	翌日培養	即日培養	翌日培養	即日培養	翌日培養	即日培養	翌日培養
上	15.0	12.0	6.2	0.1	32.2	12.3	33.4	27.1
	35.8	24.1	2.0	0.2	49.7	0.0		
中	凍 結 中		22.8	5.2	34.4	0.6	—	21.9
			16.9	5.7	32.5	1.4		
下	凍 結 中		凍 結 中		14.1	0.8	29.3	11.5
					15.0	0.6		

本実験では、測定の時間的な関係もあって、乾燥後一夜 -30°C に放置したのち、生菌数の測定を行っていたので、ブドウ糖溶液で乾燥途中のもの生残率の低いのは、このような理由が関係していたのかもしれない。

(2) 含水率と生残率との関係

この場合にも生残率にかなり値の大きなばらつきが見られるが、全般的にながめて、蒸溜水浮遊液では、含水率が低いほど生残率が低くなること、ゼラチン浮遊液では、それがやや極端になって、僅かの含水率の差で、かなり生残率が異なるという傾向がみられた。一方ブドウ糖浮遊液では、一般に生残率が低く(これは *S. cerev.* の場合にもみとめられる)、しかもある範囲の含水率を持ったものが、生残率が低いという現象がみとめられた(第8図)。但しこの図で含水率30%附近より多いものは、前述(65頁末尾)のように測定値が高すぎるのかもしれないから、それを補正すれば、ブドウ糖の曲線は右上りにはならないかもしれない。



第8図 含水率と生残率との関係(大腸菌)

○ 蒸溜水浮游液 ● 5%ブドウ糖浮游液 ◐ 1%ゼラチン浮游液を表わす

IV. 考 察

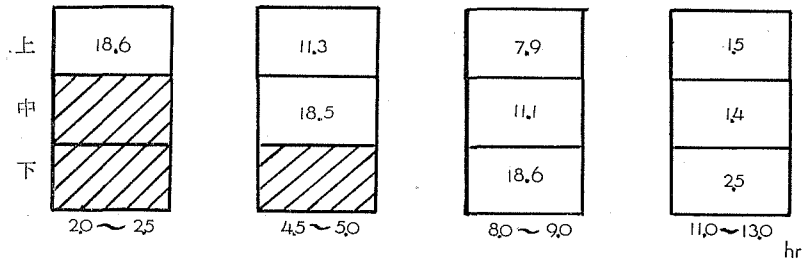
本実験は凍結乾燥の過程を、試料自身の内部の問題として、できるだけ詳細にしらべたいということに目的があった。特に水分のとれ方が、実験対象である微生物の機能(生物学的活性)にどのような影響を与えるかを検討することにあつた。従来は試料全体が一つの均一状態のものとして、或いは均一なものを見做さないまでも、全体を一つにひっくるめて扱われたことが多いが、凍結乾燥の特徴である立体的構造を保ちながら、乾燥が表層から深層に向い、しかも相当長時間に亘って乾燥が進行し続けるものであることから考えて、乾燥機構を分析する方法の一つとして、このようなねらい方をしたわけである。

本実験のように、試料中の含水度と活性度との関係をしらべる場合にも、試料内部が常に均一に変化するものならば問題はないが、時間の経過と共に試料中の部位によって差異の起こることが想像される以上、果してどの部分をどのようにとり扱ったらよいか甚だ難しい問題である。特に乾燥過程そのものの検討を目的とする限り、時々刻々に変る経過を動的に追求するためには、試料中の部位による差をどんな方法で測定するか、たとえ、幾つかの部分にわけて調べたとしても、よりミクロな立場から考えれば、やはりまだ試料中の部位によって勾配があり、結局、点か面での測定ができない限り、実験は不可能ということになる。そこで可能

な限り幾つかの部位に分けるとして、本実験では便宜上、上中下3層に分けて測定し、その結果から表面より底面に至るまでの全部位の状態を推定したのである。

細胞の浮遊液を試料とする場合、脱水の過程をしらべるためには、蒸溜水浮遊液を用いるのが、条件を最も単純化する意味で都合がよい。本実験でもこの水浮遊液の場合を基本にして考察を進めることにする。

全般として、上層から下層に向って乾燥の進行することは、肉眼的観察でも知られる通りである。言いかえれば下層ほど含水率が高いということになる。その状態を部位についてもう少し詳細に眺めてみると、第9図に示すように凍結層に接している部分は、いずれも19%、19%、19% (8~9時間のものは氷がなくなった直後であるから同じ条件と見做してよい) というように全く同程度の含水率を示し、その上の層は、11%、11% というようにこれまた同一含水率を示すことから、各部位の含水率は凍結層からの距離によってきまることがわかる。



第9図 蒸溜水浮遊液の凍結乾燥過程における部位による含水率の消長

下部の数字は凍結乾燥経過時間を、わく内の数字は各部位の含水率(%)を表わす。斜線の部位は凍結中の部分。

此の凍結層が多少でも残っている限りは、上層からもまだ脱水が行なわれていることになり、下層の凍結層が全く消失してしまつて、始めて、上~下層間の勾配が漸次なくなり、やがて試料全体が均一の含水度となる。これが恐らく乾燥の終末点であつて、それから先は乾燥を続けても、その乾燥条件ではもはやそれ以上の脱水は行なわれないようである。

なお、各部位の含水率とそれぞれの経過時間を考え合わせると、乾燥速度は、下層に進む程低下していることがわかる。

酵母と大腸菌の比較では、前者がはるかに脱水されやすく、しかも最終の含水率が低いという事実は、既に他にも報告された通り¹³⁾であつて、これは恐らく細胞の本質的な性質の差によるものであろう。

含水率と生残率との関係については、大腸菌では含水率の低下に伴い生残率も低下するという傾向を示しているが、酵母では、その関係があまりはっきりしていない。これは、酵母細胞は外部条件に対する抵抗性が一般に低く、凍結だけで既にかかなりの障害をおこすために、これに更に加わる乾燥の害の多少の差は、あまりはっきりした形となつて現われないのか、或いは乾燥による障害が大きくて僅かの脱水で既に最大限の障害に達するというものか明らか

でない。

乾燥の際の媒質として、水の他にゼラチンとブドウ糖とを使用してみた。これは凍結乾燥に際し、媒質として蛋白性物質或いは糖類が有効であることから、それらの物質の脱水の状況を知るために使ってみたのであるが、その作用機序を知る為には、各種の濃度で、各種の物質について更に詳しく検討する必要がある。それは今後の研究に俟つ予定であるが、とにかくゼラチンも1%くらいでは、含水率や生残率の関係は、水だけの場合と大差ないことが明らかとなった。

要するに、今回の実験結果からも知られるように、特に細胞浮遊液などの乾燥過程の生残率その他種々の機能的変化をしらべる場合、試料中の部位によって、いろいろな段階のあることを考慮し、サンプリングと取り扱いに充分の注意を払う必要があることを強調しておきたい。

凍結及び乾燥に伴う細胞からの脱水の機構と、その細胞の生物活性に及ぼす影響については、本実験の結果を基とし、更に他の種々の角度からの観察結果をおりまぜて、総合的に考察を進めているので、近く別に報告したいと考えている。

V. 結 論

微生物浮遊液の凍結乾燥に於ける乾燥の機構を明らかにするために、試料を表層から深層に亘る三層に分けて、乾燥の各段階で含水率と生残率との関係をしらべて見た。試料には、酵母及び大腸菌を、媒液には蒸溜水、1%ゼラチン溶液及び5%ブドウ糖溶液を用いた。

その結果は次の通りであった。

1) 乾燥は表層から深層に向かって進行し、凍結層が残っている限りは、その上層からの脱水は続いている。凍結層に接する上層は、常に同一の含水率を示し、その界面より遠くなる程(表層に近いほど)含水率は小さい。

凍結層がなくなった後は試料全体が均一の含水率に近づき、最後に乾燥終末点に達する。

2) 酵母は大腸菌にくらべて、概して含水率が低く、生残率もまた甚しく低かった。

3) 1%ゼラチン溶液での所見は、蒸溜水のそれにほぼ等しいが、5%ブドウ糖溶液のもの、かなり異なった結果を示した。

4) 大腸菌では一般に(ブドウ糖の場合を除き)含水率が低くなるに従って生残率は小さくなったが、酵母では含水率と生残率との間にあまりはっきりした関係が認められなかった。

文 献

- 1) 根井外喜男・坂上康雄・桜田弘一・荒木 忠 1960 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. 低温科学, 生物篇, **18**, 83-89.
- 2) 根井外喜男・僧都 博・花房尙史・荒木 忠 1961 凍結乾燥に於ける乾燥の機構. VI. 乾燥過程の試料の昇華面を常に平面にするための工夫. 低温科学, 生物篇, **19**, 37-41.
- 3) 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.

Résumé

In order to investigate the mechanism of drying during freeze-drying of microorganisms, water content and cell survival at three layers, the upper, middle and lower of specimen, were measured at several stages during the drying process.

Use was made of *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli* as experimental materials and of distilled water, 1% gelatin solution and 5% glucose solution as drying media.

Dehydration gradually proceeded from the upper surface of the frozen material to its bottom. While there was still some frozen part, evaporation of water from the apparent dried part was going on till the final stage of drying, showing different value in water content at the upper and lower layer, the latter being always higher than the former. The layer, just adjacent to the frozen part, descending gradually towards the bottom, indicated the uniform percentage of water content at each stage of drying. A few hours after ice entirely sublimed, all layers in the whole specimen reached the same minimum value in water content. That was the final point of drying.

In water content and cell survival during drying, yeast cells showed, in any case, lower values than coli bacillus. In this experiment, both distilled water and gelatin used as drying media brought about similar results, but glucose was to some extent different from the others.

The relationship between water content and cell survival at each layer of the specimen was somewhat complicated. Water and survival of cells decreased in parallel as drying proceeded in coli bacillus suspension, excepting only the case of using glucose. The relationship between them could not easily be estimated in yeast cells, because the survival rate of cells was extremely low even at the initial stage of drying and it was not constant.