



Title	凍結乾燥に於ける乾燥の機構 IX : 薄片標本による形態的観察 (第2報)
Author(s)	根井, 外喜男; NEI, Tokio; 浅田, 実 他
Citation	低温科学. 生物篇, 19, 73-78
Issue Date	1961-12-20
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/17653">https://hdl.handle.net/2115/17653</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	19_p73-78.pdf



## 凍結乾燥に於ける乾燥の機構 IX\*

薄片標本による形態的観察 (第2報)

根井外喜男 浅田 実

(低温科学研究所 医学部門)

(昭和36年7月受理)

### I. 緒 言

さきに行った血清を試料とする凍結並に乾燥過程の薄片標本の形態的観察<sup>1)</sup>に引き続き、今回は微生物細胞特に酵母及び大腸菌の浮遊液について同様の検索を試みた。

本実験はこれと平行して行なった酵母と大腸菌の凍結乾燥過程に於ける試料中の部位による含水率と生残率の消長をしらべる実験<sup>2)</sup>と関連づけるために、両者の実験条件はほぼ等しくした。

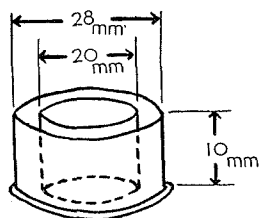
### II. 実験方法

#### 1. 試 料

麦汁寒天培地 48 時間培養酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 及び普通寒天培地 24 時間培養大腸菌 (*Escherichia coli*) をかきとり、それぞれ3回づつ遠心洗滌し、蒸溜水、1%ゼラチン溶液及び5%ブドウ糖溶液で、酵母は 500 mg/ml、大腸菌は 200 mg/ml になるように菌浮遊液を作った。

#### 2. 容 器

日本紙を糊付して図のような二重壁の容器を作り、熔融パラフィンをしみこませて、水が透過しないようにした。この容器に前記試料を内側部に 2 ml 入れると液の深さは 6 mm となる。外側部にも同じ高さまで菌液を入れた。



第1図 試料容器略図

#### 3. 温度測定

凍結並に乾燥過程の試料各部位の温度変化を測定する為に、特に熱電対を挿入した容器を用い、3打点電子管式自働平衡記録計によって全過程を自記記録させた。装置並に測定方法の詳細に

については別報<sup>3)</sup>に譲る。

\* 北海道大学低温科学研究所業績 第590号

#### 4. 凍結方法

径凡そ 10 cm のジュワー瓶に径 2 cm, 長さ 10 cm の真鍮の円柱を立て, 上 4 cm が出るくらいにドライアイス・アルコールを入れておく。この円柱の上端に前記試料の入った容器をのせると, 常に同じ条件で凍結させることができる。

#### 5. 乾燥方法

乾燥機は前報の実験<sup>1)</sup>に用いたものと同じで, 放射状型多岐管式のものである。中央の凝縮器には液体窒素を入れ, 排気速度 100 l/min, 到達真空度  $2 \times 10^{-3}$  mmHg の油廻転ポンプで真空にした。凍結した試料は直ちに本機にとりつけ, 30°C の温浴槽にひたしながら乾燥した。凍結後或いは乾燥の各過程で試料をとり出して薄片標本を作った。

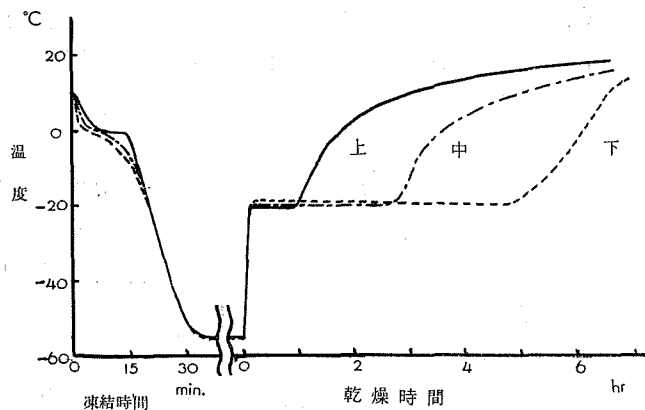
#### 6. 薄片試料作製法

凍結した試料及び乾燥途中の試料を融解しないように直ちに  $-10^{\circ}\text{C}$  の低温室に移し, ここで液状のアニリン中に浸す, 充分にアニリンが浸透したならば,  $-25^{\circ}\text{C}$  の室で凍結させ, ガラスに固着させて鉋で薄く削り, 再び  $-10^{\circ}\text{C}$  の室に移して備え付けの偏光顕微鏡で検鏡した, 薄片の作り方の具体的な方法については前報<sup>1)</sup>に述べてある。

### III. 観察結果

#### 1. 温度曲線

凍結及び乾燥の全過程に亘って記録された試料の上中下 3 層中の 3 点の温度曲線は図の如くで, 本実験のような条件では, 試料の底面から凍結が始まり, 氷晶の形成が漸次上方に向って進行することがわかる。下層と上層とでは時間的なずればかりではなく, その凍結曲線が異なる。例えば下層では底面からの冷却が大きいために, はっきりした氷点を示さずに低下する



第2図 凍結及び乾燥過程の試料の温度曲線

のに反し, 中層, 上層と凍結が上方に進むに従って, 熱の奪われ方がおそくなって氷点は明瞭に且つ滞留時間が長くなり, 大体氷結が終わったところで急速に低下する。 $-20^{\circ}\text{C}$  付近で 3 点の温度はほぼ一致し, その後  $-55^{\circ}\text{C}$  くらいまで下降した。乾燥過程では各層ともほぼ  $-20^{\circ}\text{C}$  前

後を保ちながら表層から順次深部に向って乾燥が進行する。やがて各点附近の氷晶が昇華するに従い、上層から順に温度が上り、室温に近づく。

## 2. 凍結標本

### 1) 酵 母

水、ゼラチン溶液、ブドウ糖溶液の3種の媒質のどれを用いた場合でも、先ず弱拡大のクロス・ニコルでみると、様々の色を呈する幾つかのモザイク模様が見られる。

その1つの模様を更に強拡大でみると、きれいに並列した柵状構造のできていたのがよくわかる。これは、蒸溜水浮遊液のものでは幅凡そ50 $\mu$ 、長さ数mmに亘る氷晶とその間にはさまれた濃縮された菌体と思われる部分から成っている。ゼラチン菌液では氷晶がやや大きく、ブドウ糖菌液では更に大きくて凡そ80~100 $\mu$ の幅をもっており、それぞれ間に濃縮されたゼラチン又はブドウ糖と菌体をはさんで不透明部分を作っている。

試料全体として部位による差違を眺めてみると、前回報告の実験条件では、一重容器で周囲全体から冷却したので、部位によって氷晶の大きさや軸方向などが不定であったが、今回は二重容器で、しかも底面からの一方冷却なので、比較的一定した形態を示した。即ち、底部では氷晶が小さく、しかも長軸方向が水平または斜めになるものもあったが、上層に向うに従って、氷晶は大きくなり、長軸も殆んどが垂直の方向を向いて並列するものが多かった。これは温度曲線からも想像されるところである。ただブドウ糖浮遊液などでは、底面から表面まで見事に垂直に並列した氷晶のみられることがあった(図版 III-9)。

外側の二重壁の間の部分では、表層から底部に亘って、斜め又は水平に走る氷晶が多く個々の氷晶の大きさも、内側より外側の方が大きかった。

### 2) 大腸菌

試料全体としての mosaic pattern については、酵母との比較、或は3種の媒液間の比較でも大差はみとめられない。個々の氷晶の大きさもほぼ酵母の場合と同じで、蒸溜水菌液で最も小さく、ブドウ糖菌液で最も大きい。ただ試料としての菌濃度が低い為か、蒸溜水菌液では、酵母ほどきれいな柵状構造にはなっていなかった。

## 3. 乾燥過程及び乾燥後の標本

最初の凍結でできた内部構造が保たれたまま、氷晶が次第に昇華して行く様子がよくうかがわれた。短冊状の個々の氷晶が消失したあと、その間にはさまれていた濃縮部分からどのように或いはどの程度脱水されるかは、偏光顕微鏡の倍率が400倍までしか上げられなかった為、観察が不十分であった。ただ凍結部分と乾燥部分との境界面をはさんで、両側の部分に形態的な差や大きな食い違いが無いところから考えて、乾燥による変形は殆んどないものと思われる。従って乾燥試料の内部構造は凍結時の条件によってほぼ決定されるものといつてさしつかえないであろう。

なお前報でも述べたように、氷晶の長軸が試料の表層方向に向いているものは、氷晶の昇華は進行しやすいが、それに直角の方向を向いているものでは、進行がやや阻害されるような

傾向がみとめられる。従って、個々の mosaic pattern によって乾燥速度が違い、特に grain boundary に沿って乾燥が進み易く (図版 IV-10), また平行して同じく表層方向に向いているもののうちでも進行速度に差のあることが多い (図版 I-4, VI-25, VII-27)。強拡大にすれば、個々の氷晶について、その昇華面を明らかにみとめることができ、時に遊離して閉ぢ込められた個々の菌体をみることもある (図版 I-3)。

#### IV. 考 察

酵母や大腸菌のような微生物細胞の浮遊液 (かなりの濃度にする必要がある) を凍結させても、基本的な形態的所見としては、先に報告した血清の場合と大差はない。また使用菌種の差違によって形態的な差違を生ずるまでには至らないようである。むしろそれら菌液に於ける菌濃度、媒質の種類やその濃度などが、生成されるべき氷晶の形態や大きさなどを規定するものであろうと思う。更にそれにも増して、凍結の際の冷却のしかた或いは冷却速度などが、氷晶の性状に大きく影響するものと思われる。

ここで媒質としてゼラチンとブドウ糖だけをとり上げ、しかも濃度としてそれぞれ 1% と 5% しかしらべなかつたのは、さし当り本実験と平行して行なっている同じ条件の試料の残水量と生残菌との関係の実験<sup>2)</sup> に対照させ、その機構の説明に役立たせたいと考えたからで、詳細な検討は将来に譲ることにする。

また技術的な面の、殊に標本作製過程での温度の問題で、疑点のあることは前報で述べておいたが、その点については、本実験に於ても解決されていない。例えばブドウ糖菌液の凍結試料を  $-10^{\circ}\text{C}$  においたのでは、凍結状態に形態的变化をきたすのでなからうかというようなことである。

微生物を用いた今回の実験では、より一層倍率を上げて詳細な観察を行ない、菌体自身の乾燥の状態をみるべきであったが、これは装置の関係で果すことができなかった。

更に今後、別な角度から行なう種々の検討とも総合して、凍結或いは乾燥過程の機構の解明につとめたいと思う。

#### V. 結 論

酵母及び大腸菌の蒸溜水、ゼラチン、ブドウ糖溶液の浮遊液を一定の形の容器に入れ、 $-55^{\circ}\text{C}$  まで凍結させた後、乾燥に移し、その試料の凍結状態並に乾燥状態をアニリン法で凍結切片を作って観察した。

先ず凍結試料では、前報の血清の場合と同様、氷晶の結晶軸を異にするために生ずる mosaic pattern がみとめられ、それは更に短冊状の氷晶とその間にはさまれた濃縮菌体及び媒質成分から成り、柵状構造を呈することが観察された。菌の種類や媒質の種類によって、この構造に質的な差はみられないが、ただ 5% ブドウ糖菌液では蒸溜水菌液よりかなり氷晶が大きかった。

乾燥過程の標本では、氷晶の昇華面がよく観察され、個々の氷晶或は個々の mosaic pattern によって昇華の進行速度の異なるようすがわかれた。また最初の凍結によって形成された試料の内部構造は、乾燥によっては殆んど変化をおこさないことがみとめられた。

## 文 献

- 1) 根井外喜男・浅田 実 1960 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. 低温科学, 生物篇, **18**, 91-98.
- 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. VIII. 乾燥過程での試料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). 低温科学, 生物篇, **19**, 59-72.
- 3) 荒木 忠・根井外喜男 1961 凍結乾燥に於ける乾燥の機構. VII. 凍結及び乾燥過程の試料温度の推移. 低温科学, 生物篇, **19**, 43-47.

## Résumé

Frozen and freeze-dried state of cell suspensions, *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli*, were microscopically observed with thin-sectioned specimens prepared by anilin method.

Small ice crystals, thin but long, lined up side by side in parallel in mosaic patterns, were made evident by means of crossed nicols of a polarizing microscope. The size of ice crystals depended mostly upon the rate of cooling and partly upon the sort of media.

There was no essential difference between yeast and coli cells in respect to morphological findings of ice crystals and their sublimation.

The results obtained were almost the same as those reported in our previous paper.

## 図版説明

I-1	酵 母 (蒸溜水)	凍結状態			× 24
2	" (ゼラチン)	乾燥過程	上半部乾燥	下半部凍結	× 60
3	" (ブドウ糖液)	"	"	"	× 240
4	大腸菌 ( " )	"	赤色部乾燥	青色部凍結	× 240
II-5	酵 母 (蒸溜水)	凍結状態			× 20
6	" ( " )	"			× 50
7	" ( " )	乾燥過程	上半部乾燥	下半部凍結	× 50
8	" (ゼラチン液)	凍結状態			× 20
III-9	酵 母 (ブドウ糖液)	凍結状態			× 20
IV-10	酵 母 (ゼラチン液)	乾燥過程	上半部乾燥	下半部凍結	× 20
11	" ( " )	"	"	"	× 50
12	" (ブドウ糖液)	"	"	"	× 20
13	" ( " )	"	"	"	× 50
V-14	大腸菌 (蒸溜水)	凍結状態			× 20
15	" ( " )	"			× 50
16	" (ゼラチン液)	"			× 20
17	" ( " )	"			× 50
18	" (ブドウ糖液)	"			× 20
19	" ( " )	"			× 50
VI-20	大腸菌 (蒸溜水)	乾燥過程	上半部乾燥	下半部凍結	× 20
21	" ( " )	"	"	"	× 50
22	" (ゼラチン液)	"	"	"	× 20
23	" ( " )	"	"	"	× 50
24	" (ブドウ糖液)	"	"	"	× 20
25	" ( " )	"	"	"	× 50
VII-26	大腸菌 (蒸溜水)	乾燥過程	上半部乾燥	下半部凍結	× 200
27	" (ゼラチン液)	"	"	"	× 200
28	" (ブドウ糖液)	"	"	"	× 200

