



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	凍結乾燥に於ける乾燥の機構 X : 試料の乾燥速度及び残水量に及ぼす冷却速度の影響について
Author(s)	根井, 外喜男; NEI, Tokio; 僧都, 博 他
Citation	低温科学. 生物篇, 21, 71-79
Issue Date	1963-12-10
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17675
Type	departmental bulletin paper
File Information	21_p71-79.pdf



Tokio NEI, Hiroshi SOUZU and Naofumi HANAFUSA 1963 Mechanism of Drying during Freeze-Drying. X. Effect of the Rate of Cooling upon the Rate of Drying and the Residual Moisture Content of Specimens. *Low Temperature Science, Ser. B, 21*. (With English summary p. 79)

凍結乾燥に於ける乾燥の機構 X*

試料の乾燥速度及び残水量に及ぼす
冷却速度の影響について

根井外喜男 僧 都 博 花房尚史

(低温科学研究所 医学部門)

(昭和38年7月受理)

I. 緒 言

凍結乾燥を行なうにあたって、その操作の第一段階である凍結の条件が、被乾燥体の種々の性質にいろいろの影響を与えることについては、幾つかの事実が知られている。特に生細胞を試料とした場合に、冷却の温度や速度がその細胞活性にかなり影響することは、多くの例で実証されている¹⁾。

しかし、こうした凍結の条件が、被乾燥体全体としての(それが細胞を含むものであろうと、或いは含まない溶液のようなものであろうと、いずれであってもかまわないが)乾燥の過程、或いは乾燥後の状態にどんな影響を与えるかということについては、殆んど関心が払われていなかった。

これまでに我々の研究室では、溶液の凍結乾燥に於いて、冷却速度の乾燥速度に及ぼす影響についてしらべ²⁾、また乾燥後の被乾燥体の微細構造を顕微鏡的に観察した³⁾ことがあるが、前記のような立場からの十分な検討はなされていない。

最近凍結乾燥に於ける細胞からの脱水の機構、特に残水量とその細胞活性との関係が再検討されており、特に吾國に於ては多くの研究者の共同研究課題としてとり上げられつつある。一方、近時ようやく凍結乾燥の領域に広くとり入れられようとしている種々の食品あるいは溶液を試料とするとき、それらの乾燥の過程あるいは最終の水分量を明らかにすることは、乾燥操作の効率をあげ、製品の保存性をたかめるために必要なことであって、これらの点についても今後更に検討されねばならない問題が多い。

このような意味から、最初の凍結の条件、就中、冷却速度が試料の乾燥速度及び残水量にどのような影響を与えるかについて追求することを目的として、本実験が実施された。

* 北海道大学低温科学研究所業績 第647号

II. 実験方法

1. 実験材料

一般に凍結乾燥の試料として用いられる種々の種類の溶液，細胞浮遊液の媒質等を考慮して，ウサギ血清，5% 及び 10% ゼラチン溶液，20% ポリペプトン溶液及び 5% ブドウ糖加 5% 脱脂乳等を用いた。

2. 凍 結

乾燥速度の測定には前記試料 0.3 ml を写真用フィルムで特に作った容器に，また残水量の測定には 0.5 ml 又は 1.0 ml を秤量瓶（内容積凡そ 1.2 cm ϕ \times 1.5 cm）にそれぞれとって，次のようにして凍結させた。急速凍結には，それらの容器をそのまま直接液体窒素中に投入すると凡そ 100°C/min くらいの冷却速度で凍結し，緩慢凍結には，容器をガラス製のデシケーターに納めそれを -30°C の低温室に放置すると凡そ 1°C/min くらいの冷却速度で凍結した。緩慢凍結のものは，乾燥に移す前に更に液体窒素の温度迄冷却し，乾燥開始時の試料温度はすべて同一になるように心がけた。乾燥速度測定のものには凍結時の温度測定を行なっていないが，試料の量が 0.3 ml で少しすくないのと，特に緩慢凍結ではデシケーターに入れず容器のまま低温室に放置したので，冷却速度はそれぞれ上記のものより多少速いように思われた。

3. 乾 燥

乾燥速度測定のもの，容器のまま次に述べる特殊装置に入れ，残水量測定のものには更に容積凡そ 50 cm³ のガラス製容器に入れて多岐管につなぎ，それぞれ液体窒素を cold trap とする 10^{-3} mm Hg の真空度の乾燥機で，室温（凡そ 20°C）露出のまま乾燥を行なった。

4. 乾燥速度の測定

乾燥速度をもとめるため，特製の self-recording torsion balance を用いた。装置の詳細はさきに報告²⁾ されているので省略するが，これによって乾燥過程の経時的な重量変化が自記記録されるので，その脱水量・時間曲線から乾燥速度が求められる。この場合は試料の量，乾燥機の性能ともに，残水量測定の場合と異なるので，乾燥速度に幾分の差はあるかもしれないが，本実験は冷却速度の差を主目標としておりその両者の比較は常に同一条件のもとで行なわれた。

5. 含水度の測定

いわゆる Abderhalden 法とよばれる天秤による重量測定法である。本実験では島津製直示天秤（実感量 1/10 mg）を用いた。秤量瓶にとった試料を前記のようにして凍結乾燥し，その残存水分量を，更に 60°C， 10^{-5} mm Hg，3 時間乾燥することによる減量から算出した。即ち乾燥試料の含水度は $\frac{A-B}{B} \times 100$ で表わされる， A は乾燥試料（今，含水度を求めようとする試料）， B は 60°C， 10^{-5} mm Hg，3 時間乾燥した後の重量である。

本実験で用いられた試料では，60°C， 10^{-5} mm Hg，3 時間乾燥による脱水量は，105°C，3 時間加熱による脱水量に等しいことも確かめられた。

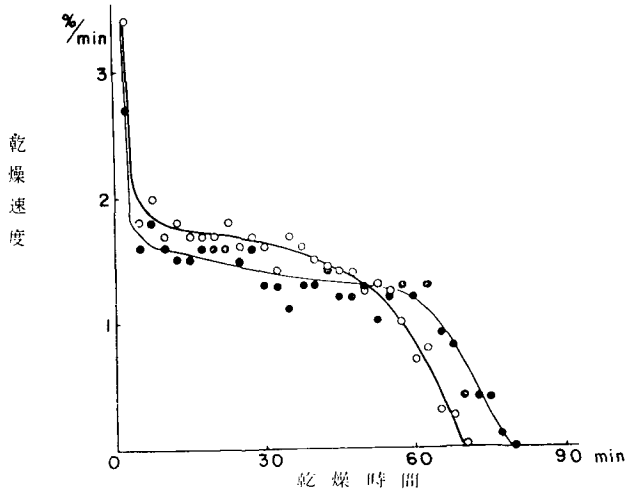
6. 乾燥試料の切片標本

秤量瓶中で乾燥した試料をそのまま取り出し、別の真空包埋装置に移し真空中でパラフィンに包埋する。これをマイクロームで 5μ くらいの切片とし、キシロールで脱パラフィンして鏡検した。

III. 結 果

第1実験

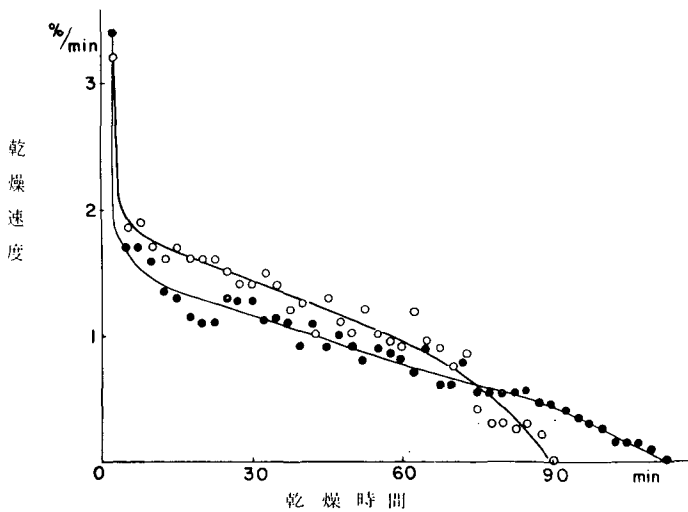
先ず self-recording torsion balance で、乾燥過程の全体の傾向をさぐろうとした。しかし、



第1図 ウサギ血清の乾燥速度曲線

● 急速凍結 ○ 緩慢凍結

縦軸の%/minは全蒸発量に対する単位時間蒸発量の割合



第2図 5%ゼラチンの乾燥速度曲線

● 急速凍結 ○ 緩慢凍結

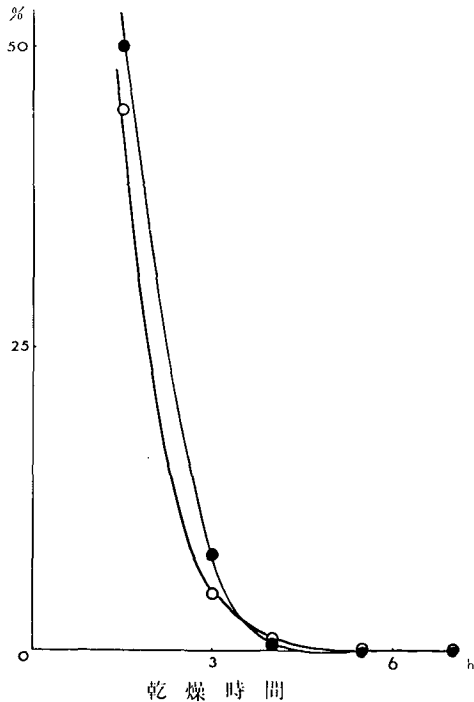
この方法では、次の Abderhalden 法に比較して脱水量（逆にいえば残水量）の測定の鋭感度が劣るので、乾燥終末の特に微量測定を必要とする段階については、あまり正確なことは言えない。従ってこの方法では、大部分の氷の昇華する過程（飛び得る水として考えて見ても其の大部分を占めるもの）だけを取り上げて考えてみることにする。

その測定結果は第1図及び第2図に示すように、ウサギ血清についても、また5%ゼラチンについても、緩慢凍結のものは、急速凍結のものに比較して、ある段階までは乾燥速度は常に大きいことがわかった。即ち緩慢凍結の方が早く乾くことが認められた。

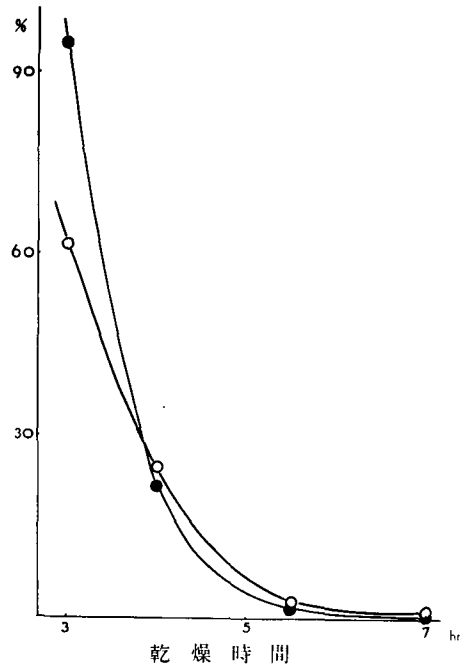
第2実験

次に血清について、通常の凍結乾燥（秤量瓶、多岐管式）を行なった場合、乾燥全過程に亘って脱水量及び Abderhalden 法による含水度の測定をした結果、第3図及び第4図に示すように、ある時間までは（この場合では約4時間後）緩慢凍結の残水量は少ない、つまり乾燥が早く進行するが、それ以後では逆になって急速凍結の方が先に乾燥するということがわかった。要するに、乾燥曲線として表わすと2つの曲線が一点で交わるというわけである。この点は、血清の場合、全水分量の約2%、含水度にして約28%（血清の乾燥量は全試料重量の約8%）のところになる。

一方、このような凍結乾燥過程で、実際の試料の乾燥の程度を肉眼的に観察してみると、こ



第3図 ウサギ血清の残水率（全水分量に対する）・時間曲線
● 急速凍結 ○ 緩慢凍結



第4図 第3図を Abderhalden 法（含水量/乾燥量）で表わした乾燥曲線
● 急速凍結 ○ 緩慢凍結

の点以前のものでは、試料中に僅かながら未乾燥の氷の部分が残っており、この点以後のものでは、みかけ上は殆んど乾燥しており、そのまま放置しても溶け出すことはない。

従って、試料中の氷が殆んど昇華してしまうまでは、緩慢凍結のものの方が早く乾燥し、氷がなくなった後の僅かの水分の乾燥の過程では、急速凍結のものの方が逆に早くなるものと考えられる。

なお未乾燥の氷の残る過程では、残水量を測定するために乾燥を中断すると試料が溶けてしまうので、乾燥試料の含水度測定と同一の方法をとることはできない。この過程のものだけは試料全体の重量変化から脱水量を求めた。

第3実験

以上のように、冷却速度によって乾燥曲線の異なることがわかった。この両曲線の交点によって前後に分けられる二つの過程は、所要時間から見れば、乾燥終末に近づくほど脱水量の割に時間がかかり、前後はほぼ同じくらいの時間を要することになるが、それぞれの脱水量から見れば、前半では全脱水量の98%がとれ、後半では残りの僅か2%がとれることになるわけである。

そこでこの乾燥の終末に近い段階での僅かの残水量を問題にするためには、できるだけ正確な微量測定法で、しかも種々の試料について吟味することが必要であろうと考えて、第1表に示すような試料について、Abderhalden法による含水量を求めた。その結果はやはり急速凍結のものが常に緩慢凍結のものより残水量(含水度)が小さいので、前述の所見が確認されたわけである。

ただ、全く同一条件で乾燥を行なったにも拘らず、試料の種類によって含水度が異なること、また急速凍結と緩慢凍結の含水度の比にかなりの差のあることなどが、明らかな事実としてまとめられた。

第1表 凍結条件と乾燥後の含水度との関係

試料	乾燥条件	凍結条件	含水度		急速凍結と緩慢凍結の含水度の比
			実験1 (%)	実験2 (%)	
5% ブドウ糖 } 5% 脱脂乳 } 1.0 ml	10 ⁻³ mm Hg 9 時間	急 速	3.2	4.4	1:2.3
		緩 慢	5.6	11.8	
20% ポリペプトン 0.5 ml	"	急 速	4.0	4.7	1:1.2
		緩 慢	4.5	6.2	
ウサギ血清 1.0 ml	"	急 速	0.3	0.2	1:2.1
		緩 慢	0.5	0.5	
10% ゼラチン 0.5 ml	"	急 速	0.2	—	1:10.5
		緩 慢	2.1	—	

数値は各々6例の平均値

第4実験

真空度 10^{-3} mm Hg, 室温9時間の乾燥ではまだ試料中に水分が残っているので, これを更に脱水した結果についてしらべた。例えば同じ乾燥条件でも乾燥時間を延長すれば, 僅かながらも脱水されて行く。その結果は, 第2表に示すように, 緩慢凍結のもの脱水が大きいので, 急速凍結のものとの差は次第にちぢまって行くことがわかった。この乾燥を更に続ければもっと差は小さくなるのであろうが, それには非常に長い時間を要するので, 乾燥条件を一層きびしくして更に乾燥を促すと, 例えば 10^{-5} mm Hg, 60°C 3時間で, 冷却速度による差は全くなくなり, 乾燥量は両者同一となった。結局最終的にとれるだけの水分がとれた時には, 冷却速度の差はなくなるわけである。

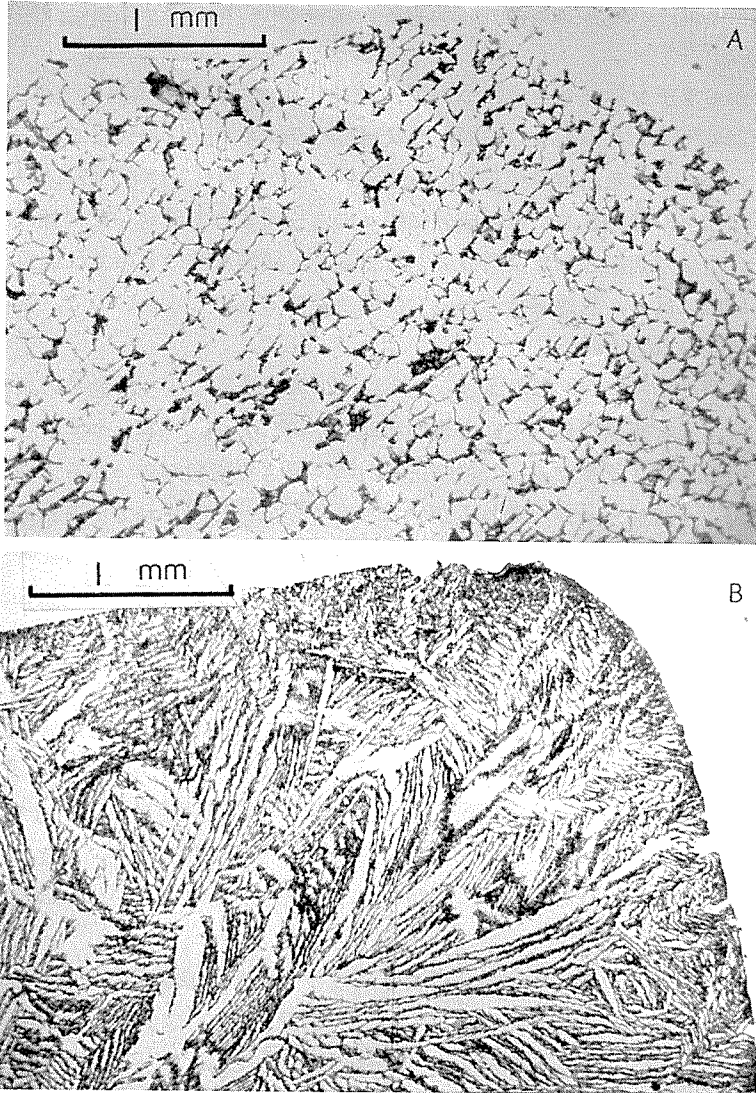
第2表 乾燥時間と乾燥後の含水度の関係

試料	凍結条件	8時間乾燥 (10^{-3} mm Hg)		14時間乾燥 (10^{-3} mm Hg)	
		含水度 (%)	急速と緩慢の比	含水度 (%)	急速と緩慢の比
10%ゼラチン 0.5 ml	急速	0.2	1:10.5	0.2	1:4.5
	緩慢	2.1		0.9	
ウサギ血清 1.0 ml	急速	0.1	1:7	0.1	1:3
	緩慢	0.7		0.3	

数値は各々6例の平均値

第5実験

後で考察の頃で述べるように, 以上のような冷却速度による凍乾過程の差を説明するためには, 試料の乾燥状態, 特に微視的な乾燥試料の内部構造を考える必要があると思われたので, さきの実験の aniline 法を使い凍結状態及び乾燥過程の試料の切片を作って観察した結果を参考にした外に, 今回は乾燥後の試料のパラフィン包埋切片標本を作った。この顕微鏡による観察結果は, 前回の所見と同様で, 緩慢凍結のものは, 乾燥後の氷の抜けがらから考えて, 個々の氷晶が大きいばかりでなく, 相互に接続して表層から内部まで続いているのに反して, 急速凍結のものでは, 個々の氷晶は非常に小さく, しかも残った試料成分に囲りをとりかまされてそれぞれ孤立した状態になっている。特に後者の急速凍結のものでは, 内部の処々に比較的長い大きな空隙がみられるが, これは乾燥の終末時に現われる収縮によるものと思われる。このことは, 凍結時の標本ではみられないこと, 他の形態的な観察で屢々収縮のみみられることから, 確かな事実であろうと考えられる。



第 5 図 ウサギ血清の凍結乾燥後の顕微鏡像

A: 緩慢凍結 B: 急速凍結

IV. 考 察

以上の実験結果から、凍結乾燥に於ける乾燥過程に対し、試料の最初の凍結の条件、特に冷却速度が影響し、試料中の氷が昇華するまでの段階では、緩慢凍結のものが急速凍結のものより速やかに乾燥するが、その後の脱水の段階では逆になって、急速凍結のものの乾燥が早く進むことがわかった。しかし乾燥の度が進むにつれて、両者の差は次第に小さくなって、最終的には同一乾燥量を示した。

いま、このような乾燥過程で乾燥の進み方に差のできることの原因を考えて見るのに、先

ずあげられることは、最初の凍結の際の試料の凍結の pattern、即ち試料の内部構造の差であろう。

既に我々がゼラチン溶液や血清について、凍結状態或いは乾燥過程の試料の aniline 法による切片の観察で³⁾、また本実験の乾燥後の試料のパラフィン切片の観察でみとめたように、緩慢凍結のものは大きな氷晶が接続している(多くの場合並列している)のに反し、急速凍結のものは小さな氷晶が濃縮された試料成分に個々にとり囲まれて孤立した状態にある。従って氷以外の部分、つまり濃縮された試料成分から見ると、緩慢凍結のものでは網目になった各層の厚みが大きいのに反し、急速凍結のものでは網目がはるかにこまかいので、個々の層は非常に薄いものと考えられる。

このような凍結の pattern の差異から考えれば、乾燥過程のうち、始めの氷晶が昇華する間は、連続して大きな氷晶を作っている緩慢凍結のものの方が、昇華しやすいことになり、反対に急速凍結のものは、個々の氷晶だけで考えれば、小さくて数が多いから表面積が大きくなって昇華が速いように見えるが、それらがいずれも濃縮成分に囲まれているため、かえって昇華が阻害されて遅くなるものと思われる。

しかし、この氷の昇華の段階を終って、次の濃縮成分中の水分の蒸発の時期に移ると、今度は濃縮成分で作られた層の厚さを考えなければならない。即ち各層の内部から拡散によって行なわれる水分の蒸発は、層の薄い急速凍結の方が層の厚い緩慢凍結のものより容易であろう。しかも急速凍結のものは、乾燥終末時に試料の収縮による内部ひび割れができやすいので、一層脱水蒸発が促進されると思われる。

この転換点、換言すれば2本の乾燥曲線の交点は、既に実験結果の項で述べたように、肉眼的観察で大體水がなくなるところであり、また試料の種類は異なるが、さきに我々が微生物の細胞内水分を測定した⁴⁾時に得られた凍結水分と不凍結水分の割合いにほぼ似た値を示すところである。

従って、この交点より前の過程は氷の昇華、後の過程は濃縮成分中の主として不凍水分の蒸発と考えてさしつかえないであろう。

さて以上のように、乾燥過程では異なった経過を辿っても、同一成分の試料である限り、脱水し得る水分の限界は同一であって、乾燥の終末点では等しい乾燥量に達するものと思われる。

一方、同一乾燥条件であっても、試料によって含水度に差ができるのは、物質によって水和力が異なるからであろうし、また含水度の比に差ができることも、物質による凍結の pattern の違いなどで説明されるであろう。

摘 要

種々の溶液の凍結乾燥を行なう場合、最初の凍結時の速度によって、乾燥過程が異なり、始めは緩慢凍結のものが、後には急速凍結のものが、それぞれ先行して乾燥の進むということ、しかし最終的には乾燥量の一致するという事実がみとめられた。

そして、このような冷却速度によって乾燥過程が異なるということは、凍結の pattern の差異によって比較的容易に説明し得るものと考えられた。

文 献

- 1) 根井外喜男・林喬義・佐藤徹・大原吉輝・中川勇・前川静枝 1954 生物学的材料の凍結乾燥法. 第9報 予備凍結条件の検討. 低温科学, 生物篇, **12**, 63-70.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 僧都博・根井外喜男・尾藤方通 1961 微生物の水分とその凍結. 特に酵母並びに大腸菌の菌体水分量と生死との関係について. 低温科学, 生物篇, **19**, 49-57.

Summary

Materials such as serum, gelatin-, pepton- and glucose-added skim milk-solutions, rapidly frozen at a rate of about 100°C/min or slowly frozen at a rate of about 1°C/min, were examined on rates of drying with a self-recording vacuum torsion balance and on a residual moisture content by Abderhalden's method with an analytical balance during and after drying.

Experimental results showed that the two drying curves obtained from the materials frozen at different rates of cooling crossed each other at a certain point. During the process from the start of drying to that point, dehydration of the slowly frozen materials proceeded faster than that of the rapidly frozen ones. After that point, the curves were reversed; the rapidly frozen materials showed a lower residual water content than the slowly frozen ones did. As drying time was prolonged, however, the difference in the residual moisture content became gradually less. When the materials were extremely dehydrated at 60°C under vacuum of 10^{-5} mm Hg for 3 hours after primary drying, their dry weights finally coincided.

The mechanism of such drying process seems to be explained by the initial freezing patterns from the morphological point of view; it is supposed that drying proceeds faster on large, connected ice particles in the slowly frozen materials than on small, disconnected ice particles in the rapidly frozen materials during the sublimation of ice, but, the comparative rate of drying in each material becomes reversed during the removal of water contained in the concentrated constituents at the next stage, due to hindrance in diffusion through the thicker layers of the concentrated solute phase.