



Title	凍結乾燥に於ける乾燥の機構 X I : 大腸菌での脱水と細胞活性の関係について
Author(s)	根井, 外喜男; NEI, Tokio; 僧都, 博 他
Citation	低温科学. 生物篇, 22, 91-100
Issue Date	1964-10-20
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17684
Type	departmental bulletin paper
File Information	22_p91-100.pdf



凍結乾燥に於ける乾燥の機構 XI*

大腸菌での脱水と細胞活性との関係について

根井外喜男 僧 都 博 荒木 忠

(低温科学研究所 医学部門)

(昭和39年7月受理)

I. 緒 言

生細胞の凍結乾燥に於いて、その細胞の含水度と細胞活性との関係を調べることは、細胞からの脱水の機構及び脱水による細胞の障害の機構を知るために重要であると考えられる。

このような問題を解明する意図のもとに、前報¹⁾では、乾燥過程での試料中の部位による残水度と細胞活性との関係を調べて報告した。その結果、乾燥の終末点近くで、試料中の大部分を占める氷が昇華した後、僅かに残っている細胞水分の脱水される過程での水分の脱着が細胞の生死と重要な関係をもつことが推測された。この水分量は、また、細胞を凍結したとき -20°C 以下の低温においても、凍らないで残っている水分²⁾に相当することもわかった。しかし、従来のような相当厚みのある試料では、乾燥の進行に伴い昇華表面が試料の表層から深層へ向って移行するため部位によって蒸気拡散速度・温度・昇華面積等の差による含水度の勾配を生ずるので、試料全体を1つのものとして扱うことには問題があった。そこで今回は1つには試料全体として均一な含水度をもつように、また他方、含水率測定のための秤量に最も便宜なように、試料のとり方、乾燥のし方を工夫して実験を行なった。具体的には、特殊なアンプルを用いて、薄層の試料を作り、これで任意の含水度をもった試料が得られるように工夫した。

一方、従来の生細胞の凍結乾燥実験に於いては、単に経時的な生残率の推移が調べられていただけで、脱水との関係は明らかでなく、しかも、種々の媒質が用いられているため、細胞自身の脱水の状況は全く不明であった。吾々がかねてから凍結乾燥に於ける細胞水分の意義に注目してきたが、本実験に於いても、特に細胞自身の微量水分の測定のために、媒質を加えない細胞の蒸溜水浮遊液を用い、その残存細胞水分と生物学的活性との関係を検討したものである。更に乾燥終了後の細胞に於いて、細胞中にごく僅かに残っている水分がどのような状態で存在し、しかも、細胞活性にどのように影響するかを明らかにすることも、本実験での大きな目的の1つであった。

* 北海道大学低温科学研究所業績 第684号

本研究は文部省科学研究費(総合研究)によって行なわれた。

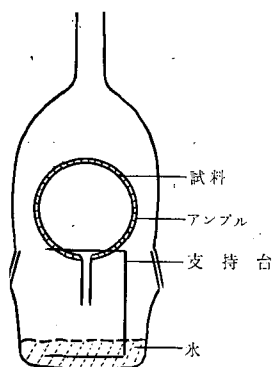
II. 材料及び方法

1. 材 料

大腸菌 *Escherichia coli* を普通寒天培地で 37°C, 24 時間培養したものを蒸溜水で 3 回遠沈洗滌した後, 菌濃度 400 mg/ml の蒸溜水浮遊液 (以下菌液と略称) を調整し実験に供した。

2. 凍結乾燥法

緒言で述べた理由から, 径凡そ 3 cm の球状の肉の薄い特殊な硝子アンプル (首は内径約 1 mm でやや肉厚のもの) を用いた。このアンプルに菌液 0.25 ml を注射器 (1 ml) で気泡を生じないように静かに注入し秤量後, アンプルを適当にまわしながら内壁全体にできるだけ均一な液層として付着させ, 直ちに -25°C のアルコール槽に浸して凍結させた。これを予め -25°C に冷却しておいた硝子製磨り合せ乾燥容器の支持台の上に, アンプルの口を下に向けておき (第 1 図), 多岐管式凍結乾燥機にとりつけて種々の条件で乾燥を開始した。乾燥過程では次のような条件を用いた。環境温度を 30°C から -20°C までいろいろ変え, それぞれについて, アンプルを納める乾燥容器の中に水を入れる場合と入れない場合とを用いた。また, 真空度は 10^{-3} ~ 10^{-1} mmHg の範囲内で, コールド・トラップの温度は -40°C~-196°C の範囲内でいろいろ変えてみた。これらをいろいろ組み合わせて乾燥を行ない, 適当な含水度の試料が得られるように多くの予備実験を試みた。その結果, 後述のような条件で, ほぼ希望の試料をうる事ができた。



第 1 図

乾燥用アンプルと乾燥容器

3. 含水率測定

既知重量のアンプルに菌液を注入して秤量し, この値を a とした。これを上記のように凍結乾燥し, 乾燥終了後真空を破ってアンプルを取り出してデシケーターの中に納め, 室温で温度平衡に達するまで放置した後秤量し, この値を b とした。次いでこのアンプルをそのまま磨り合せ乾燥容器に入れ, 60°C の温浴槽に浸して真空度 10^{-5} mmHg で 2 時間乾燥した。乾燥終了後乾いた空気で常圧に戻して再び秤量し, この値を c とした。この値は更に恒温乾燥機で 105°C, 2 時間加熱乾燥しても全く変わらず, その含水率は $\frac{b-c}{c} \times 100$ を以て表わした。生菌数測定のための試料では, c 値を測定できないので, 同じ時の試料について数個を対照として c 値を求め, その菌液全体の乾量比 d ($d = \frac{c}{a}$) をこれから算出し, $\frac{b-ad}{ad} \times 100$ を以て含水率とした。

4. 生菌数測定

最初に乾燥用アンプルに入れたそれぞれの試料の秤量から, 加えるべき液量を正確に算定して, 同一濃度になるように希釈を行なって菌液を作り, 更にそれを適当な濃度まで希釈して plate count 法で発育集落数を数え, 無処理の対照を 100 とする百分率で生残率を表わした。処理後の試料から菌液を作るに当っては, 原菌液の 20 倍量の蒸溜水 (室温) 中に, 乾燥した試

料をアンプルのまま投入し、アンプル全体を砕いて十分に水と混和することで、急速且つ完全に溶解復水させた。

5. 保存方法

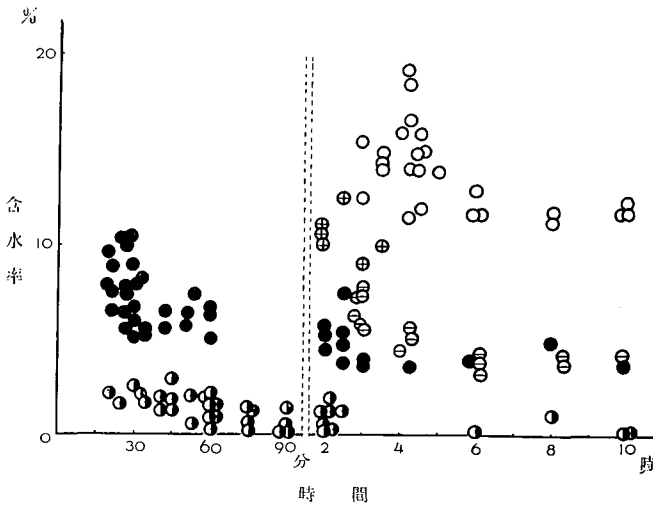
乾燥した試料を種々の条件で保存する場合、常圧におくものは、保存している間に含水率が変らないように、乾燥後直ちにアンプルの口を熔封した。また、真空のまま保存するものはアンプルの入っている乾燥容器を密封した。これらを所定の温度の恒温槽に入れて保存した。

III. 結 果

1. 乾燥過程での乾燥条件と含水率との関係

含水率と生残率との関係を調べるためには、先ず、試料全体としてできるだけ均一な残水度をもった試料を得なければならない。そこで、実験方法の項で述べたように、乾燥過程での環境温度を 20° 、 -10° 、 -20°C に変えて、乾燥容器の中に氷を入れた場合と入れない場合とで、真空度 10^{-3} mmHg, コールド・トラップの温度を -196°C にして凍結乾燥を行なった結果を図示すれば、第2図の通りである。

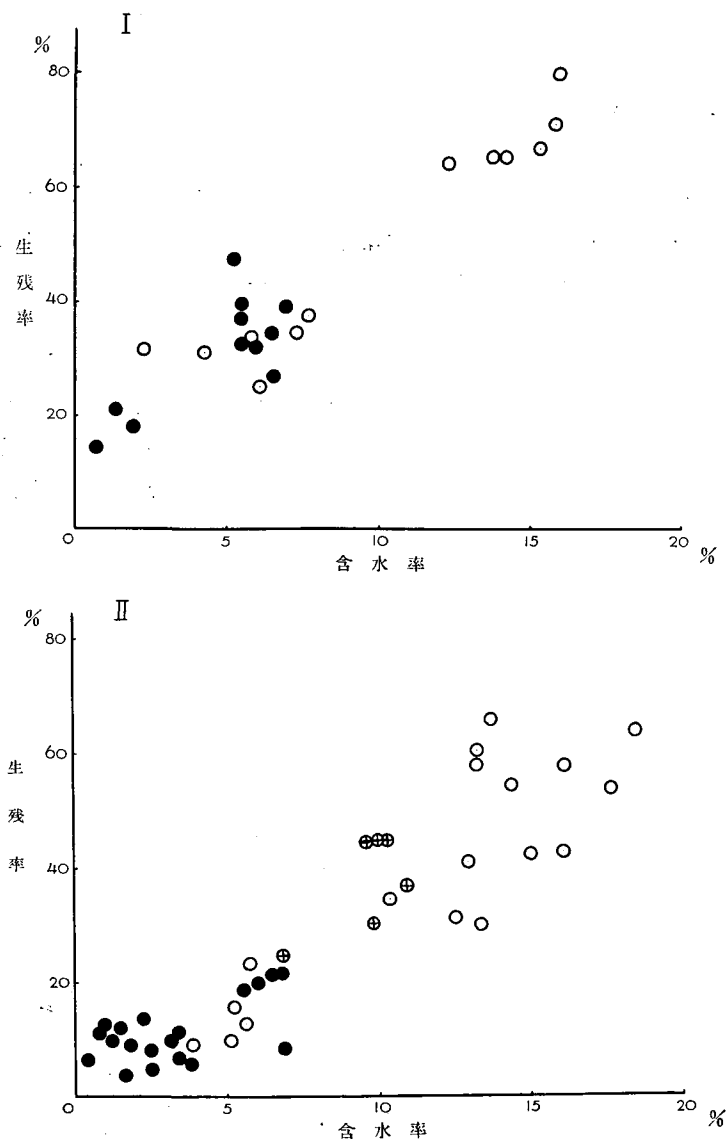
この図からわかるように、時間の経過につれて脱水が進み含水率が低下し、それぞれの乾燥条件に相応した含水率に達すると、更に乾燥時間が延びても、それ以上の脱水がみられず、含水率は殆んど変らない。この時の乾燥条件と乾燥時間及び最終含水率の関係を第1表に示す。この最終含水率は環境温度が低いほど高く、また、同じ温度でも、氷を入れた場合では入



第2図 乾燥過程での乾燥条件と含水率の時間的推移

- ：環境温度 -20°C で乾燥容器中に氷を入れた場合
- ⊖：環境温度 -20°C で乾燥容器中に氷を入れなかった場合
- ⊕：環境温度 -10°C で乾燥容器中に氷を入れた場合
- ：環境温度 20°C で乾燥容器中に氷を入れた場合
- ：環境温度 20°C で乾燥容器中に氷を入れなかった場合

れない場合に比べて常に高くとどまることがみられる。また、環境温度を低くすることによって、乾燥速度は小さくなるので、各種の含水率の試料を得る確率が大きくなり、例えば -20°C の環境温度で乾燥容器の中に氷を入れた場合では約18~13%の含水率のものが得られる。このように環境温度と氷の有無を組み合わせることによって、約18%から殆んど0%に亘る含水率の試料を得ることができる。しかし、更に高い含水率20%以上の試料を得るために、真空



第3図 乾燥条件による含水率と生残率との関係

- : 環境温度 -20°C
- ⊕: 環境温度 -10°C
- : 環境温度 $+20^{\circ}\text{C}$

第 1 表 乾燥条件と含水率との関係

乾燥条件		乾燥時間	含水率
環境温度	容器中の水		
20°C	-	約 30 分	約 1 %*
	+	約 30 分	約 5 %*
-10°C	+	約 2 時間	約 10 %
-20°C	-	約 5 時間	約 5 %*
	+	約 5 時間	約 12 %*
	+	約 4 時間	約 15 %

* 各乾燥条件での最終含水率

度を $10^{-3} \sim 10^{-1}$ mmHg の範囲内で、コールド・トラップの温度を $-40^{\circ} \sim -196^{\circ} \text{C}$ の範囲内でいろいろ変えてみたが、高い含水率のものは得られなかった。

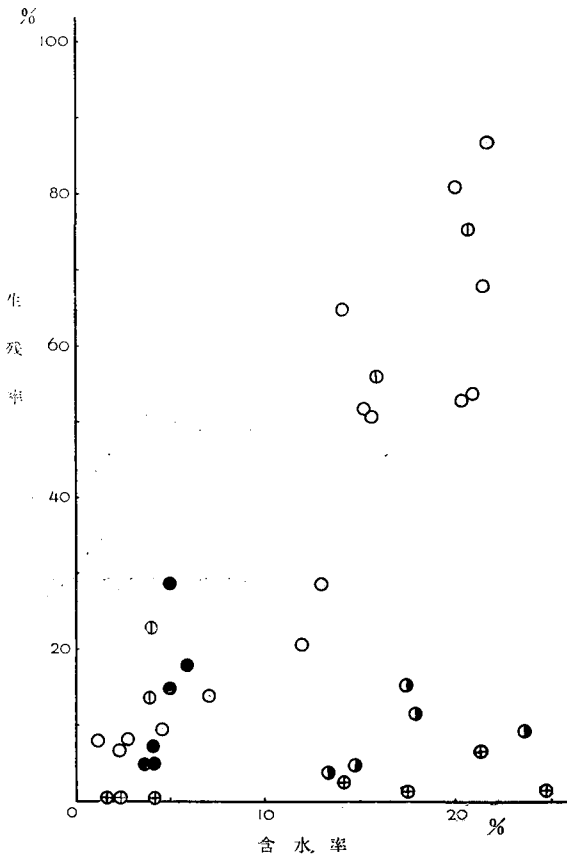
2. 含水率と生残率との関係

試料全体としてできるだけ均一な含水率の約 18% から殆んど 0% までの範囲の試料で、含水率と生残率との関係を調べてみた。その結果、第 3 図の I, II に示すように、試料による多少の差はみられるが、いずれの場合でも、含水率の低下、即ち、脱水が進むにつれて、生残率がほぼ直線的に低下する傾向が認められる。更に、これを乾燥時の環境温度の点に注目してみると、同じ温度でも乾燥容器の中に水を入れた含水率の高い試料では生残率は高く、また、乾燥時の温度は異なっても、含水率が同じものでは生残率は等しい。これらの点から考えて、生残率は脱水過程の温度には余り影響されず、含水率に支配されるものと考えられる。

3. 乾燥終了後の保存条件と含水率及び生残率との関係

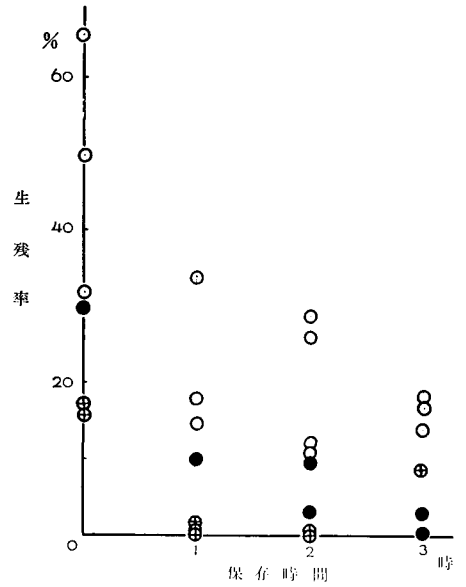
凍結乾燥で脱水した試料の、含水率で表わして 20% 以下の水分が、どのような状態で存在しているか、また、どのように細胞活性に寄与しているかを調べる一端として、各含水率の試料を種々の条件で一夜放置し、そのような細胞が保存時の外部条件によって、どのように二次的な影響を受けるかを調べてみた。その結果、第 4 図に示すように、いずれの含水率の試料でも、真空のまま放置した場合及び常圧に戻して -25°C の低温で放置した場合では、乾燥後直ちに培養した場合の生残率と殆んど変りなく、時間経過による生残率の低下は認められない。なお、含水率 5% 以上の試料で真空で放置した場合の結果が図示されていないのは、乾燥条件の制約によるものである。また、乾燥の際環境温度を低くすることによって得られた試料でも多少含水度は不均一であるが、含水率 10~15% のもので、同様に真空に放置してみた結果、含水率の低い試料と同じように、やはり一夜おいても、生残率は低下せず、乾燥直後の場合と同じ生残率を示す。これに反して、常圧に戻して 30°C 及び 15°C の温度に放置した場合では、生残率は著しく低下することが認められる。

次に細胞の残水度と時間経過による生残率の低下との間の関係を検討するために、含水率約 15, 10, 5% の 3 種の異なる試料を、前述の条件のうち変化の認められた条件、即ち常圧で



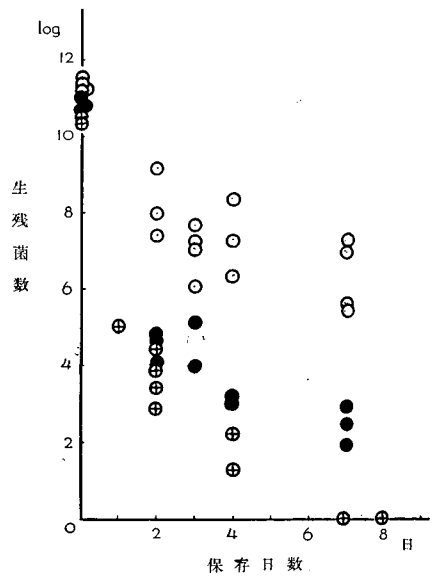
第4図 含水率の異なる試料での保存条件と生残率との関係

- : 乾燥直後
- ⊙: 常圧で低温(-25°C)に放置した場合
- ⊕: 常圧で30°Cに放置した場合
- ⊖: 常圧で15°Cに放置した場合
- : 真空で30°Cに放置した場合



第5図 含水率の異なる試料での保存による生残率の推移

- : 含水率約15%の試料
- : 含水率約10%の試料
- ⊕: 含水率約5%の試料



第6図 含水率の異なる試料での保存による生残菌数の推移

- : 含水率約15%の試料
- : 含水率約10%の試料
- ⊕: 含水率約5%の試料

30°Cにおいて、生残率の時間的推移を調べた。その結果を図示すれば、第5図の通りで、時間の経過とともに生残率が低下することがみられるが、このように短時間の結果では、生残率の分散がかなり大きく、3種の異なる含水率のものの中で、生残率の低下する傾向に違いがあるのかないのかはつきりしない。そこで、更に長時間おくことによって、異なる含水率の間での細胞の安定度の違いがはつきり表われ、保存によって減少する傾向が違うかどうかを調べてみた。その結果、第6図にみられるように、含水率が異なることによって、保存過程での生残菌数の減少の割合が違い、低い含水率の試料ほど死滅の速度は大きい。即ち、含水率約5%のものでは、1週間後には生残細胞は全く認められないのに対して、含水率約15%のものと同じ時期に於ける生残細胞は大體 $10^6 \sim 10^7$ である。

IV. 考 察

凍結乾燥処理によって微生物細胞が多かれ少なかれ障害を受けることは、これまで多数の報告があり、その障害の機序についてもいろいろの立場から多くの検討が加えられているが現在なお不明の点も少なくない。吾々の研究室に於いても、細胞水分と活性との関係についてここ数年来研究が続けられ、その実験結果から試料の大部分を占める氷の昇華した後、乾燥終末近くでの極めて僅かに残っている細胞水分の脱着が細胞の生死に重要な関係をもつことが推測されている。本実験では、乾燥過程、特に乾燥終末期での細胞からの脱水が細胞活性にどのような影響を与えるかを調べ、更に、この残存する微量水分がどのような状態で存在し、しかも、細胞活性にどのような役割をもっているかを検討することを目的とした。

このように微少な水分を対象とする実験の場合には試料全体が均一な状態にあることが必要である。ところが、従来行なわれてきた凍結乾燥の試料ではかなりの厚さを持ったものが多く、このような立体構造を持った試料では乾燥が進むにつれて、昇華表面が表層から深層へ移行し、部位によって残水度に勾配を生ずる¹⁾。

この部位による差異をなくすためには、菌体が一列に並ぶような薄い試料を作ることが望ましいが、一方、脱水の程度を正確に知るためには、或る程度の量が必要である。このような相反する条件をなるべく満たすために、最小必要量で最大表面積を得るよう、また、秤量に便宜なよう特殊なアンプル(第1図)を工夫し、その内壁に均一な極めて薄い層の試料を作った。しかし、いかに薄い層にしても、厚みがある以上通常の乾燥では試料の部位による差異はまぬがれない。そこで、乾燥の条件に種々の工夫をこらすことによって、最終的には試料全体として均一な、しかも、任意の残水度の試料が得られるようにした。具体的には、各種の環境温度と氷の有無を組み合わせた条件のもとで乾燥を行なった。環境温度を低くすることによって、その温度に於ける細胞水分の蒸気圧を低くすることができるので、最終的に高い含水率のものが得られるわけである。更に、温度の低下とともに乾燥速度は小さくなるので、各種の含水率のものを得る確率を大きくすることが可能となる。また、同一環境温度でも乾燥容器の中に試料以外の氷が存在することによって、氷が存在しない場合に比べて高い含水率のものが得られる。これは、入れた氷が盛んに昇華している間は、乾燥容器内はその温度の水蒸気の存在によ

って、より蒸発し難い細胞水分との間に拮抗が起るためと考えられる。これの別の説明として容器内で水が盛んに昇華することによって水の温度が下り、そのため試料温度が低下する結果最終含水率が高いのではないかとの考え方もあったが、実際には水の温度は試料温度に殆んど影響を及ぼさず、環境温度 20°C のとき氷の温度は -20°C であるが、試料近辺の温度は大体 10°C であることから、この説明は否定された。以上に述べた方法は、試料全体として均一な含水率をもつ乾燥菌体を得るための条件として、まだ理想的なものとは言えないかもしれぬが大体 1~18% の含水率のものが任意に得られるようになった。しかし、20% 以上の更に高い含水率の試料を得るために、真空度、コールド・トラップの温度をいろいろ変えて乾燥を行なったところでは、まだ成功していないが、恐らく環境温度を更に下げることによって、乾燥時間は極端に長くなるけれど、そのような含水率の高い試料を得ることは可能であろうと考えられる。

以上に述べたような方法で得られた含水率大体 18% から殆んど 0% に亘る試料について、含水率と細胞活性との関係を見ると、含水率の低下に伴ってほぼ直線的に生残率が低下することがみられた(第3図)。このことは、乾燥過程で細胞が脱水されるほど、より死滅することを示しているものといえよう。この含水率約 18% という残存水分量は僧都ら²⁾が大腸菌を用いて細胞水分のうちの凍り得る水分と凍り得ない水分を測定したときの不凍水分量と量的に一致する。今回の実験条件では -25°C の比較的高い温度での緩慢凍結であるから、細胞水分は大部分脱水されて細胞外で凍結し、細胞内には不凍水分だけが残っていることが想像される。しかも、微生物細胞の凍結乾燥では周囲の水が昇華した後に細胞水分の脱水のおこることを電子顕微鏡による形態的観察³⁻⁵⁾でも認めているので、本実験条件では、ほぼ細胞外の水分が全部乾燥された後の細胞内不凍水分の脱水過程だけを観察したものと考えてよいであろう。

この推定が許されるならば、含水率 18% の不凍水分に相当する残水量をもつ試料での生残率が凍結融解だけを行なった対照実験の生残率の 90% にほぼ近いが、或いはそれより僅かに低い程度であることから、細胞周囲の水分、或いは細胞外に出た細胞の凍結しうる水分の脱水は殆んど細胞活性には影響しないか、或いは極めて僅かの影響しか与えないといえよう。換言すれば、細胞の不凍水分の脱水が細胞活性に大きく影響すること、ひいては、細胞の不凍水分こそ細胞活性に重要な役割を演ずるものであると想像される。しかし、この細胞活性を調べるのに、plate count 法を用いる限り、必ず復水という過程が伴うので、細胞の障害を脱水過程のみに限るわけにはいかない。この点から考えても、更に復水過程の検討及び乾燥状態での細胞活性の測定を行なうことが必要で、次の実験計画をすすめつつある。なお、上記の成績は前報の含水率：生残率曲線の含水率約 18% を境として急激に生残率が 40% から 10% 位まで低下するという結果と多少違う傾向が観察された。これは前報の実験に於いては、乾燥試料を復水するまでに常温常圧で相当時間を要したので、恐らくこのような操作上の原因に帰するものであろう。このことは、今回の常圧、15°C 保存の実験で短時間のうちに著しい生残率の低下がみられる結果(第4図)から想像される。

次に乾燥過程での温度の問題として、乾燥時の環境温度 20°C と -20°C との比較について

ふれてみたい。試料中から氷の昇華が盛んに起っている過程では、試料温度は両者とも $-20^{\circ}\sim-30^{\circ}\text{C}$ の間であって、 10°C 以内の温度差にすぎない。しかし、乾燥が終末に近づいて蒸発水分量が少なくなると、後者の場合は -20°C に保持されたままであるのに反して、前者の場合はまわりからの熱供給によって 20°C まで次第に上昇する⁶⁾。このように両者の間で温度や乾燥速度に差があるにもかかわらず、同じ傾向の含水率：生残率曲線を示すことから、この範囲の温度、乾燥速度の差、即ち脱水過程の影響よりも不凍水分の脱水の程度が大きく細胞活性に影響を及ぼすと考えられる。

この不凍水分だけが細胞に残っているような状態では、環境条件に対して非常に不安定で処理前の液状の生細胞であれば殆んど影響のない温度や常圧での空気等の環境条件で短時間のうちに著しく死滅する。乾燥細胞でも真空保存や -25°C の低温保存では、殆んど生残率の低下は認められないことから、このように脱水されて、いわば裸の状態におかれた細胞の死滅に温度、常圧での空気が重要な役割を果していると考えられる。この不凍水分の脱水の程度と細胞の不安定さとの関係を調べたところ、より脱水された細胞(含水率の低い細胞)ほど死滅しやすい傾向を示した。この傾向は、従来一般に認められている乾燥試料の含水率が低いほど安定であるという傾向と反するようであるが、本実験では媒質を用いない裸の菌であり、常圧での保存ということ、更に従来の実験例のものに比べて、非常に高い含水率のもの間での比較であることなど種々異なった条件にあることを考慮しなければならない。いずれにしても、細胞内でのこの微量水分の存在状態及び細胞活性への役割が、その細胞の保存性との関連に於いて重要な問題であるから、今後、更に検討を重ね、この点を明らかにしたいと考える。

摘 要

1) 大腸菌の蒸溜水浮遊液の薄層試料を用いて、凍結乾燥に於ける乾燥過程を環境温度と乾燥容器中の水の有無を組合せた種々の条件で行ない、含水率(乾量基準)約18~1%の試料全体としてより均一な試料が得られた。

2) 含水率約18~1%の範囲内では、脱水が進むにつれて生残率の低下がみられ、しかも乾燥時の環境温度が $20^{\circ}\sim-20^{\circ}\text{C}$ の範囲内では、同じ傾向を示し、温度、乾燥速度等の影響は認められなかった。

3) 含水率約18%以下の乾燥試料を常圧で -25°C の低温に、または、真空で 30°C の温度に一夜放置しても生残率の低下はみられないが、常圧で 15° 、 30°C の温度に一夜放置することによってかなり急激に生残率の低下がみられた。しかも、常圧で 30°C の温度に長時間放置することによって、含水率が低いほど著しく死滅することが認められた。

以上の実験結果から、凍結乾燥による細胞の生死には不凍水分(通常結合水といわれている)の脱着が重要な役割を果していると考えられる。しかも、この不凍水分の脱水が進んだ細胞ほど安定度が小さくなることが明らかになった。

文 献

- 1) 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). 低温科学, 生物篇, **19**, 59-72.
- 2) 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**, 49-58.
- 3) 根井外喜男 1961 微生物の凍結乾燥過程の電子顕微鏡的研究 I. 酵母細胞の 16 mm 映画撮影による動的観察. 低温科学, 生物篇, **19**, 79-93.
- 4) Nei, T. 1961 Electron microscopic study of yeast cells subjected to freezing and drying: Cinematographic observations. *Biochim. Biophys. Acta*, **49**, 426-428.
- 5) 根井外喜男 1962 微生物の凍結乾燥過程の電子顕微鏡的研究 II. 大腸菌の 16 mm 映画撮影による動的観察. 低温科学, 生物篇, **20**, 95-100.
- 6) 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.

Summary

Investigation of the dehydration of cellular water in freeze-drying of microorganisms and of its effect on cell survival, during and after the drying process, have been made using some newly devised technical methods. A thin layer of a highly concentrated cell suspension of *E. coli* in distilled water was frozen in a specially designed ampoule and dried at different temperature, with or without ice.

With such drying, homogeneous specimens showing various degrees of residual moisture contents, ranging from about 18 to 1%, were obtained.

During the dehydration process, in the final drying stage, cell survival was reduced as the residual moisture content decreased from 18 to 1%.

Between the drying temperatures of +20 and -20°C, the survival rate of the dried cells corresponded to the residual moisture content, independent of the ambient temperatures.

The survival rate of the freeze-dried cells markedly decreased when the cells were stored overnight at 15 or 30°C in air (atmospheric pressure), whereas no decrease in the survival rate was observed when the freeze-dried cells were stored at -25°C in air or 30°C in vacuo. Storage for several days at 30°C in air showed that the survival rate of cells with lower moisture contents decreased more rapidly than the rate of those with higher moisture contents.

The maximum residual moisture content just corresponds to the unfreezable water in the cells, i.e., 18%, and these results indicate that dehydration of this unfreezable water greatly influences cell viability in freeze-drying.