



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	凍結及び乾燥による試料の亀裂 : 特に溶液の薄層標本についての顕微鏡的観察
Author(s)	根井, 外喜男; NEI, Tokio
Citation	低温科学. 生物篇, 22, 133-138
Issue Date	1964-10-20
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17688
Type	departmental bulletin paper
File Information	22_p133-138.pdf



凍結及び乾燥による試料の亀裂*

特に溶液の薄層標本についての顕微鏡的観察

根井外喜男

(低温科学研究所 医学部門)

(昭和39年7月受理)

I. 緒言

凍結乾燥法は、種々の生物学的材料を、機能的ばかりでなく、形態的にも、できるだけ生に近い状態で保持する方法として広く用いられている。今日最も理想に近いとされているこの凍結乾燥法であっても、なおかつ乾燥の終末点に於いて試料の多少の収縮は免れないものと思われる。例えば、Luyet¹⁾はいわゆる pseudo-freeze-drying と称して、不凍水分の脱水に際しての試料の収縮をみとめ、Nei²⁾もまた、電子顕微鏡的観察から、細菌細胞の収縮像をみとめ、これが乾燥の終末期における不凍水分の脱水に基づくものであらうと推論している。

一方、種々の試料を種々の条件で凍結乾燥した場合、試料中に肉眼的、顕微鏡的な亀裂をみとめることが多い。特に超低温まで急速に冷却した場合に著明である。このような亀裂ができるとすれば、乾燥表面の変化に伴って、試料の乾燥速度に影響を及ぼすであらうことは当然想像される³⁾。ところが、このような亀裂が凍結乾燥のどの段階で、どのような機構でできるかについては、これまでに何らの検討も行なわれていない。

一般に凍結乾燥に於いて、乾燥は三次元の立体構造をもった試料の表面から内部に向って進行するので、部位によって乾燥度に勾配ができる。従って乾燥過程の分析的研究を行なう場合、その勾配のできるだけ少ない薄層について検討する必要がおきてくる。また凍結状態或は乾燥状態の顕微鏡的観察を行なう場合には、どうしても薄層の標本によらねばならない。特に高倍率で仔細な観察を行なうときに必要である。

本実験はこのような立場から、薄層試料について凍結乾燥による亀裂生成の機構を検討したものである。

II. 材料及び方法

試料

試料には、5%ゼラチン溶液及びウサギ血漿を用い、また対照として脱イオン水を用いた。

凍結

凍結状態の観察には、上記試料の0.01~0.02 mlを35×25 mmのカバー・グラス上にとり、

* 北海道大学低温科学研究所業績 第688号

もう1枚のカバー・ガラスを重ねて均一な厚さの薄層標本とし、そのまま Rapatz and Luyet⁴⁾ にならって作った冷凍顕微鏡の凍結槽に挿入して凍結させ、凍結状態を普通光及び偏光顕微鏡で観察した。

凍結の条件としては、 -25° 、 -50° 、 -80° C のアルコール槽への直接挿入、 -25° C の低温槽での空気冷却、液体窒素への直接挿入など、冷却温度及び冷却速度をいろいろ変えて検討した。 -196° C まで冷却したものは -50° C で観察した。これはゼラチンや血漿の再結晶温度からみても、 -50° C までの加温では凍結状態に変化をきたさないことがわかっているからである⁵⁾。なお冷却速度の正確な測定は困難であるが、この種の薄層試料では、 -25° C のアルコール槽への直接投入で $2\sim 5^{\circ}$ C/sec, 液体窒素中で $10\sim 50^{\circ}$ C/sec であった。

乾 燥

乾燥標本を作るには、凍結したまま2枚のカバー・ガラスをはがして、それぞれ乾燥容器に移し、種々の環境温度(室温露出或は -50° C 乃至 -70° C 冷却)で凍結状態からの乾燥を行なった。

しかし一般には、凍結試料はカバー・ガラスを剥がしにくいので、一方のカバー・ガラスの代りにアルミ箔を重ねたり、或いは試料を薄くひろげて(時には厚さによる凍結のパターンや亀裂のパターンの違いを調べるため、均一ではなく特に部位によって厚みに差をつけるようにした)凍結させたものを、それぞれ乾燥した。試料の厚みは、液状の時、或は乾燥後顕微鏡で観察して、上面及び下面に焦点を合わせた時の微動装置の読みから知ることができる。乾燥装置は多岐管、冷却トラップ(液体窒素を冷媒とする)及び油ロータリー・ポンプから成り、真空度は凡そ 10^{-3} mmHg であった。この条件で、試料を納めた乾燥容器を室温に露出して乾燥すると、前記薄層試料では凡そ数分で乾燥するようであるが、乾燥を十分に完了させる意味で、室温露出の場合で1時間、 -50° C 冷却で24時間の乾燥を行なった。

III. 結 果

1. 5%ゼラチン溶液

1) -25° C での凍結

この条件で凍結させたものを、凍結状態のまま観察すると、不規則に散らばった花卉状のいわゆる irregular dendrites のパターンを示し、時には規則正しい縞模様を画くいわゆる periodicity⁶⁾ のみられることもある。緩慢凍結のものでは、樹枝状の結晶がみられる。しかし、いずれにしても、後で述べるような亀裂は全然認められない。

このような凍結材料をそのまま乾燥して観察しても、以上のような凍結のパターンは少しも変わらず、亀裂もできない。乾燥の時の環境温度を室温(20° C)にしても、 -50° C にしても、これらのパターンに差はみとめられない。

2) -25° C 凍結後、 -196° C まで冷却した場合

二次的に -196° C まで冷却しても、最初の -25° C の時の凍結のパターンと殆んど変りないが、ただその試料の中に、一定の幅をもった亀裂が縦横に走り、それらの亀裂によって囲ま

れた部分は、三角、四角、多角形或は全然不規則な形を示す。この亀裂は、凍結乾燥したものでは一層はつきりとみとめられる。全体として亀裂のパターンは、一見不規則なようであるが仔細に観察すると、基盤になる樹枝状或は花卉状の凍結の氷晶のパターンとある種の関係があるようにみえる。即ち樹枝状結晶のところでは亀裂は直線的に走り、花模様のところでは曲線をなしている。

また、試料の厚さによっても亀裂の性質は多少異なり、厚いところでは、網目は粗で亀裂の幅は広いが、薄いところでは、反対に網目は密で幅は狭い。

3) -196°C での凍結

この場合の凍結の氷晶パターンは、殆んど *irregular dendrites* である。そこに現われる亀裂は、前記の二次冷却で -196°C まで凍結させたものと同じで、種々の形のものがみられる。網状構造がベースの氷晶のパターンに応じていろいろの形をとることも同様である。

乾燥後のものも、凍結状態のものと本質的に違いはない。

2. ウサギ血漿

1) -25°C での凍結

凍結状態の標本では、ゼラチンの場合と同様、いろいろの形の樹枝状或は花卉状の氷晶のパターンを示すが、その中に亀裂は全然認められない。

しかし、このような試料も、乾燥すると、試料全面に不規則な亀裂が多数現われる。ゼラチンでは、 -25°C 凍結のものは、乾燥しても亀裂を生じなかったから、この点がゼラチンと血漿の異なるところである。しかも、この血漿の乾燥で現われる亀裂は、これまでに述べた亀裂とはかなり異なったパターンを示し、それぞれ短かく断裂しているので、網目を作らない。ただ、基盤の凍結の氷晶のパターンとはやはり多少の関連があるらしく、例えば、*periodicity zone* によって亀裂の走る方向が異なる。また高倍率で観察すると、凍結による亀裂のように溝の辺縁が滑らかでなく、細かな網目がひきちぎられたように、両側の乾燥成分が不規則に凹凸している。溝の幅も均一ではない。

特に2枚のカバー・ガラスに挟んで凍結し、凍結したままはがして乾燥した試料について、左右対称の位置で比較してみると、亀裂の走り方が殆んど一致していないことがわかる。このことは、この種の亀裂は、試料を2枚に剝がす前、即ち凍結によってできたものではなく、剝がした後、即ち乾燥によってできたものであることを思わせる。この乾燥による亀裂も試料の厚みに左右され、厚いところでは太く、薄いところでは細くなることは、凍結による亀裂の場合とほぼ同様である。

2) -25°C 凍結後、 -196°C まで冷却した場合

この条件のものは、凍結状態では、ゼラチンの同条件のものと同様の亀裂があり、種々の形の網目を作っている。

しかし、これを乾燥すると、これらの凍結時にできた亀裂の間に、前記のような乾燥時にできる短かく切れた亀裂が入り交っているのがわかる。この両種の亀裂は性質が違うので、よく区別ができる。

3) -196°C での凍結

2)の二段冷却の場合とほぼ同様で、凍結状態では網目状の亀裂だけであるが、乾燥試料では2種の亀裂がみられた。

3. 純水(脱イオン水)

1) -25°C での凍結

種々の形の氷晶からできていることは、偏光でよくみとめられる。それらの境界線はジグザグで滑らかでない。亀裂は全然みとめられない。

2) -25°C 凍結後、 -196°C まで冷却した場合

上記の氷晶の中に、亀裂のできているのがよくみとめられる。この亀裂はすべて直線から成り、従って網目構造は三角形か四角形、稀に多角形で、ゼラチンや血漿の場合のように、曲線で囲まれた不規則な形を作ることはない。しかも、偏光でよく区別がつく基盤の氷晶の差異によって、この亀裂のパターンも明らかに異なる。例えば、隣り合せの氷晶でも結晶軸が違っていると、一方には三角形、一方には四角形の亀裂のパターンができて、はっきりと区別される。

3) -196°C での凍結

2)の二段冷却の場合と全く同様の所見である。

4. 実験結果の総括

本実験で用いた3種の試料、即ち純水(脱イオン水)、5%ゼラチン溶液、ウサギ血漿の凍結温度を変えて凍結させた場合、及び凍結乾燥させた場合にできる亀裂を一括表示すると第1表の如くである。

第1表 各種試料を各種凍結条件で凍結させた場合の凍結状態及び乾燥状態でみられる亀裂

試料	凍結条件		
	-25°C 凍結	-25°C 凍結後 -196°C 冷却	-196°C 凍結
純水(脱イオン水)	—	+	+
5%ゼラチン溶液	—	+	+
ウサギ血漿	○	⊕	⊕

—: 亀裂の生じないことを示す +: 凍結によってできる亀裂

○: 凍結乾燥によってできる亀裂

IV. 考 察

以上の実験結果から、試料の種類により、また凍結や乾燥の条件によって、2種の亀裂のことがわかった。しかも、これら2種の亀裂は、その成因や性質の異なることから、互にはっきりと区別ができた。

まず、第一の亀裂は凍結状態で既に観察されることから、凍結によってできるものであり、しかも、試料の如何を問わず、 -25°C ではみられず、 -196°C に冷却したもので始めて認められるという点から考えると、超低温までの急激な冷却による thermal shock、或いはガラスと

氷との収縮率の差違によって生ずる亀裂と思われる。既に Gold²⁾ は、純氷について、thermal shock による亀裂を観察し、それが氷晶の結晶軸方向によって左右され、C 軸が試料面に直角の場合には三角形 (又は六角形)、平行する場合には四角形のパターンを形成することを報告している。この点については、本実験に於いても、純氷で同様な所見を得た。更にゼラチンや血漿でも、冷却速度が小さく、比較的完全結晶に近い樹枝状氷晶では、純水のものとはほぼ同様の直線に囲まれた三角形や四角形の亀裂のパターンをみとめた。しかし、それより冷却速度が大きく、irregular dendrites で不完全氷晶に近いものほど、亀裂のパターンは不規則な形になるように思われた。結局、凍結によってできる亀裂は、基盤になる氷晶の性質によって、そのパターンが規制されるということができよう。従って、乾燥後の亀裂のパターンを観察することによって、逆に最初の凍結のパターン、特に氷晶の完全、不完全さのある程度推察することができるかもしれない。

第二の亀裂は、凍結時にはみられず、乾燥の結果始めて現われるものである。しかも、血漿のように乾燥すると脆い感じになるものではできないが、ゼラチンのように固い性質のものではできないこと、更に前述の凍結による亀裂のように規則的な網状構造を作らずに、不規則に断裂した短い亀裂からできていることなどを考え合せると、この種の亀裂は、乾燥の終末におきる試料の収縮によるものと思われる。筆者が曾って確認した凍結乾燥細菌細胞の電子顕微鏡的収縮像²⁾ に比較すれば、はるかにマクロの変化ではあるが、乾燥過程を肉眼的に観察していてもわかるように、やや厚い試料で乾燥の終末に近く始めて亀裂の現われることから、乾燥末期の特に試料中の不凍水分の脱水に基づく収縮であろうと想像される。

このような乾燥の結果、試料が収縮し、亀裂が生ずることについては、粘土その他の含水性の物質についての報告がある³⁾。それらはいずれも液状の水分の脱水に伴う収縮についてであるが、凍結乾燥に於いて、乾燥時の環境温度を室温にしても -50°C にしても、同じ所見の亀裂像がみられることから、やはり同じような機序によって収縮がおき亀裂が生ずるものと思われる。

さて、凍結及び乾燥の過程でこのような亀裂が生ずるものであれば、当然乾燥過程での乾燥速度に影響を及ぼすであろうから、扱う試料の種類により、或いは乾燥の目的によって、凍結や乾燥の条件を充分吟味する必要がある。またある場合には、乾燥速度を増すための方法として利用できるかもしれない。

更に、乾燥過程での温度から考えて、たとえ -50°C 位まで冷却しても、乾燥終末期での試料の収縮が免れないものとすれば、いわゆる生の状態を保持する方法として、これまでに組織学、細胞学領域で広く用いられてきた凍結乾燥法に対して、1つの問題点を提起することになり、既に Luyet 並に著者が強調しているように、凍結乾燥に於ける不凍水分の脱水に関する問題を今後更によく検討しなければならないであろう。

摘 要

ゼラチン、血漿を試料とし、純水を対照として、種々の条件で凍結及び乾燥をした場合に

できる亀裂の成因及び性質をしらべた結果、2種の亀裂のあることがわかった。

1つは、ごく低い温度までの凍結によってできるもので、どの試料でもみられ、いろいろの形の網状構造を作る。

他は乾燥によってできるもので、短く断裂していて網状構造を作らない。血漿でみられるが、ゼラチンではみられない。

2種の亀裂とも、凍結による氷晶のパターンに対応して、直線や曲線から成る特有のパターンを示す。

文 献

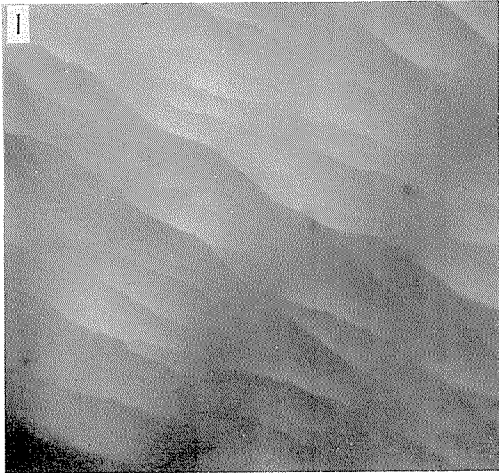
- 1) Luyet, B. 1962 Effect of freezing rates on the structure of freeze-dried materials and on the mechanisms of rehydration. *In Freeze-Drying of Foods*, (F. R. Fisher, ed.) Nat. Acad. Sci., Washington, D. C., 194-211.
- 2) Nei, T. 1962 Freeze-drying in the electron microscopy of microorganisms. *J. Electron-microscopy*, **11**, 185-189.
- 3) 根井外喜男・僧部 博・花房尙史 1963 凍結乾燥に於ける乾燥の機構 V. 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. *低温科学, 生物篇*, **21**, 71-79.
- 4) Rapatz, G. and Luyet, B. 1957 Apparatus for cinemicrography during rapid freezing. *Biodynamica*, **7**, 346-354.
- 5) 根井外喜男 1963 溶液の凍結と再結晶, 血漿及びブドウ糖についての顕微鏡的観察. 第7回凍結及び乾燥研究会記録, 4-8.
- 6) Persidsky, M. D. and Luyet, B. 1960 Periodicity in the freezing of aqueous solutions. *Biodynamica*, **8**, 165-180.
- 7) Gold, L. W. 1961 Formation of cracks in ice plates by thermal shock. *Nature*, **192**, 130-131.
- 8) Corte, A. and Higashi, A. 1960 Experimental research on desiccation cracks in soil. *U.S. Army SIPRE Report*, **66**, 1-48.

Summary

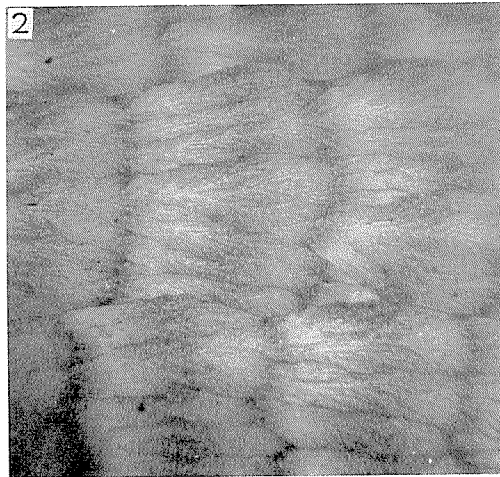
The crack patterns in the frozen and dried state of 5% gelatin solution and rabbit blood plasma were observed with ordinary and polarized light in order to investigate the cause and nature of crack formations found in freeze-dried specimens. Pure water was used as a freezing control.

Two types of cracks were observed. One type, observed both in the frozen and in the dried state, is formed by cooling to very low temperatures. The other type is observed following the drying of some fragile materials such as plasma and is formed by shrinkage caused by dehydration in the final stage of freeze-drying.

The crack pattern is characteristic in each type; freezing cracks make distinct networks, while desiccation cracks show a variety of shapes without making networks.



1. 5% ゼラチン溶液. -25°C 凍結.
凍結状態. $\times 50$
花卉状のいわゆる irregular dendrites のパター
ンがみられる。亀裂は全然みえぬ



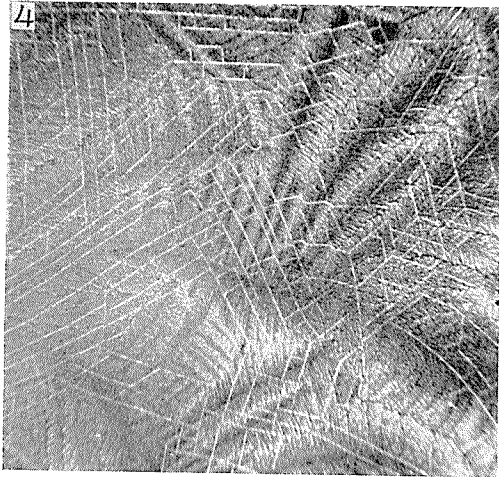
2. 1 と同条件のもの. 乾燥状態.
 $\times 25$
花卉状又は羽毛状の irregular dendrites, 特
に periodicity がよくみられる。亀裂はない



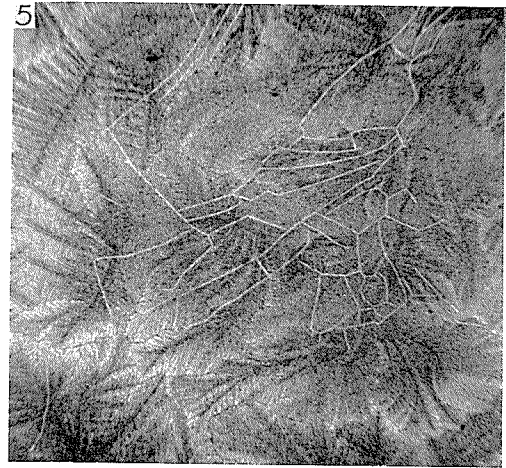
3a. 5% ゼラチン溶液. -25°C 凍結後
 -196°C まで冷却. 凍結状態.
普通光. $\times 50$
直線又は曲線からなる亀裂が縦横に走り網目
を作る



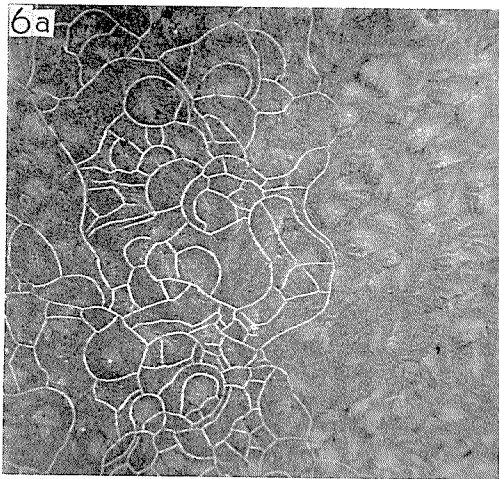
3b. a と同一視野. 偏光. $\times 50$
亀裂のパターンが氷晶の periodicity とある
関連を示す



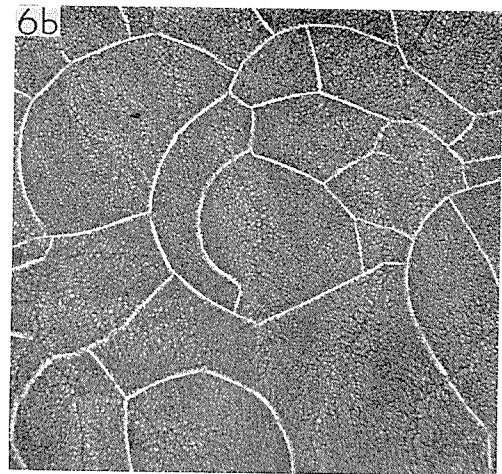
4. 5% ゼラチン溶液. -25°C 凍結後
 -196°C まで冷却. 乾燥. $\times 25$
 樹枝状の氷晶パターンの上に直線状の亀裂か
 らなる四角形の網目構造



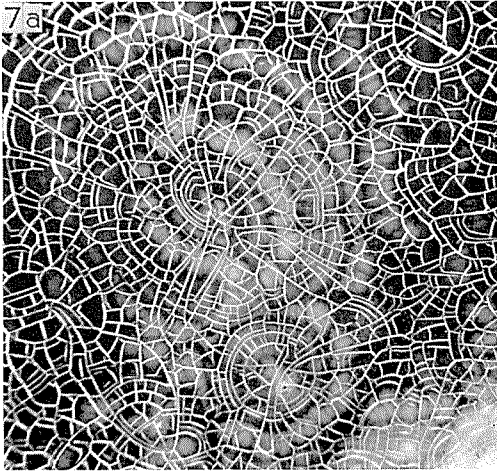
5. 4と同条件の試料. $\times 25$
 樹枝状又は花卉状氷晶の上にてきた主として
 直線からなる不規則な形の亀裂のパターン



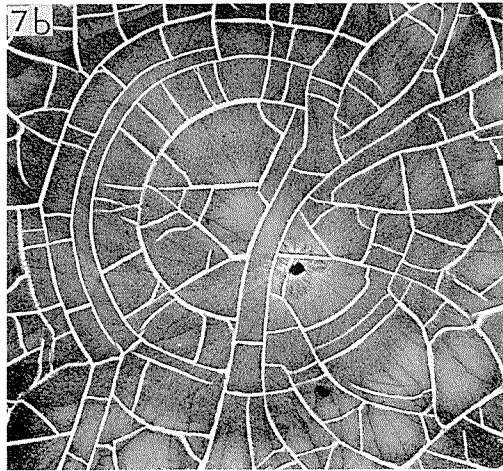
6a. 4と同条件の試料. $\times 25$
 irregular dendritesの上にてきた主として曲
 線からなる不規則な形の亀裂の網状構造



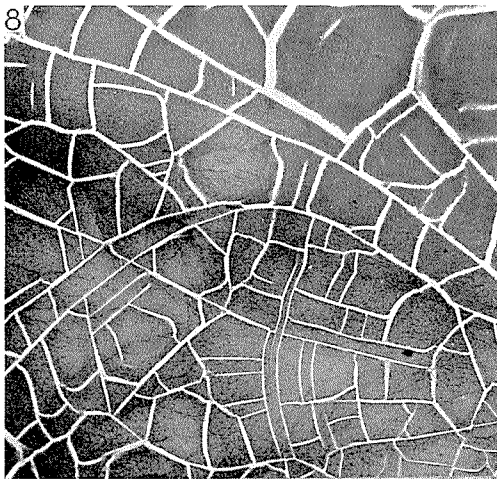
6b. 6aの一部を拡大したもの. $\times 100$
 亀裂の幅はほぼ均一



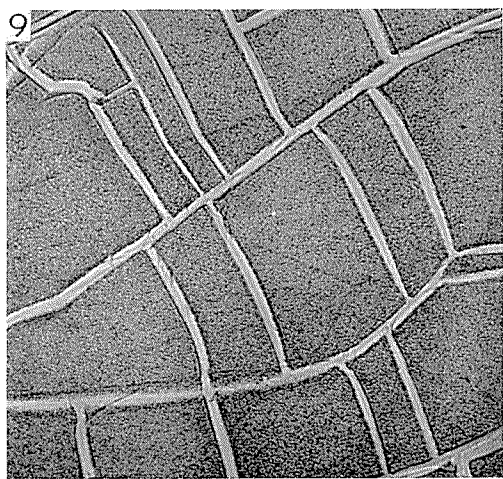
7a. 5%ゼラチン溶液. 液体窒素凍結.
乾燥. $\times 25$
氷晶のパターン特に periodicity に対応して
できた放射状或は同心円状の特異な亀裂のパ
ターン



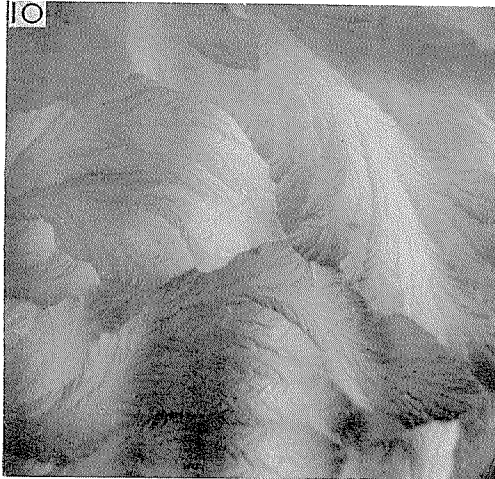
7b. 7a の一部を拡大したもの. $\times 100$
氷晶の核と同心円の中心との一致 periodicity
と亀裂のパターンとの関連性もうかがわれる



8. 7と同条件のもの. $\times 100$
視野の上部は試料が厚いので, 亀裂の幅が広
く網目が粗

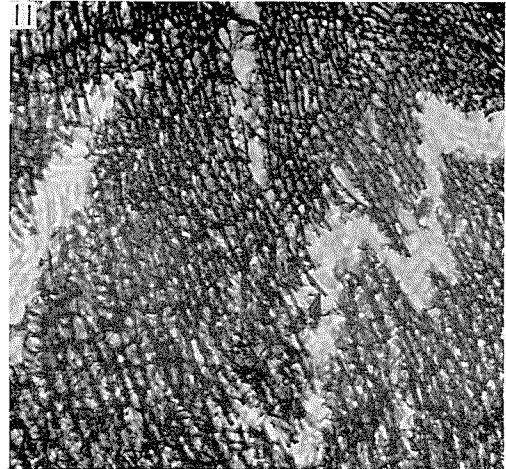


9. 7と同条件のもの. $\times 280$
比較的薄い部分, 亀裂の辺縁は滑かで殆ど凹
凸がない



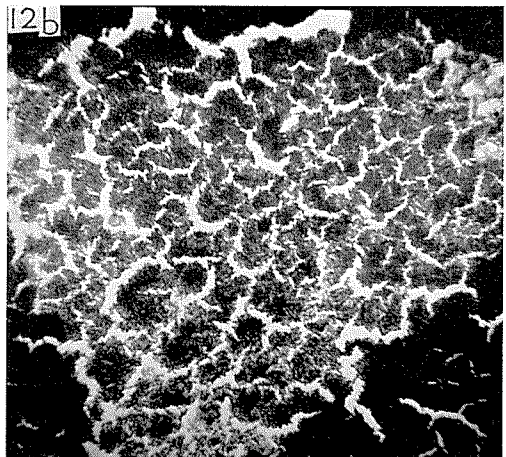
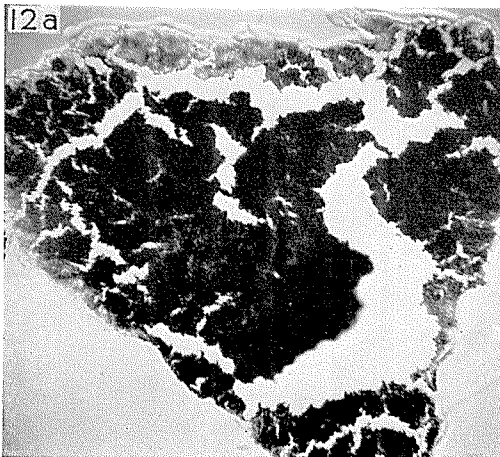
10. 血漿. -25°C 凍結. 凍結状態.
× 50

花弁状の irregular dendrites がみられるが、
亀裂は全然ない



11. 10 と同条件のもの. 乾燥状態.
× 100

不規則に屈曲した亀裂は、幅は不定で辺縁も
凹凸がはげしい。9 の凍結亀裂とは性質が全
く異なる

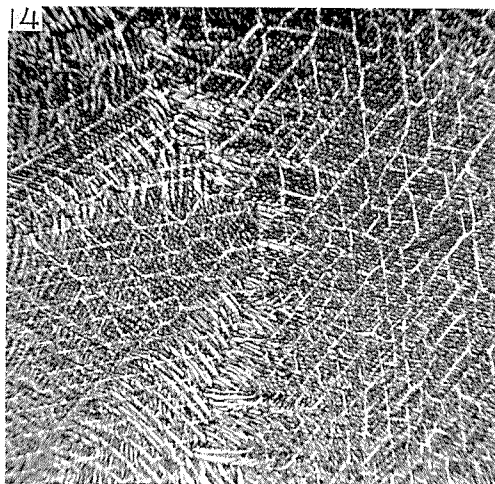


12a. 及び 12b. 血漿. -25°C 凍結. 乾燥. × 15

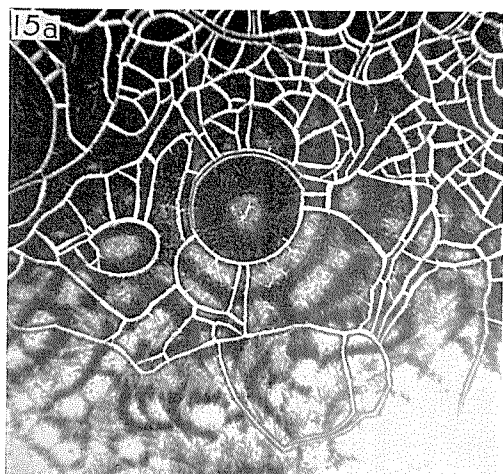
2 枚のカバー・ガラスに挟んだ血漿を -25°C 凍結後、2 つに剝してそのまま乾燥したもの、a と b とは左右対称の位置にあるので、もし凍結の時にできた亀裂ならば、左右のパターンが一致する筈である。しかし、図のように左右全く異なることは、剝した後、即ち乾燥によってできた亀裂であることがわかる。特に a は試料が厚いので亀裂の幅が広い、b にみられるように、この種の亀裂は断続していて、完全な網目を作らない



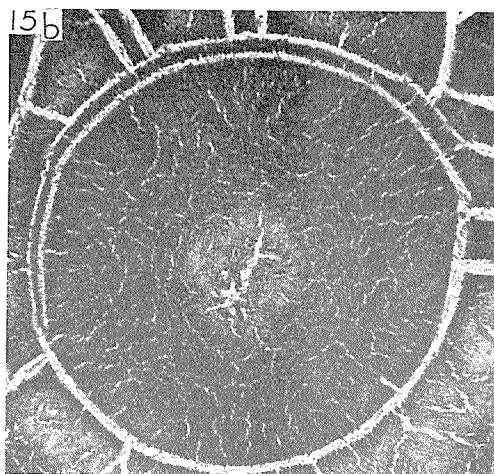
13. 血漿. -25°C 凍結後 -196°C まで冷却.
凍結状態. $\times 50$
亀裂のパターンがみられる



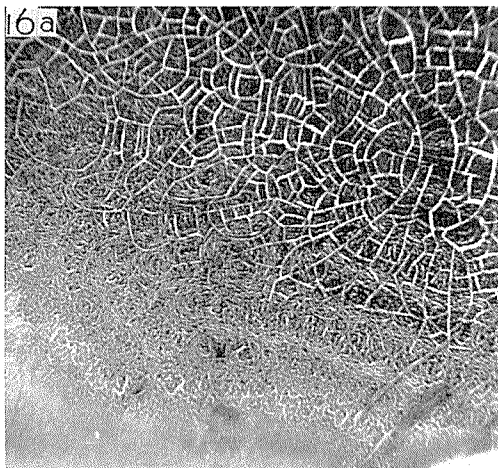
14. 13 と同一条件のものの乾燥状態. $\times 25$
樹枝状の氷晶の上に直線からなる三角, 四角
及び多角形の亀裂のパターンがみられる
氷晶と亀裂との関係もよくわかる



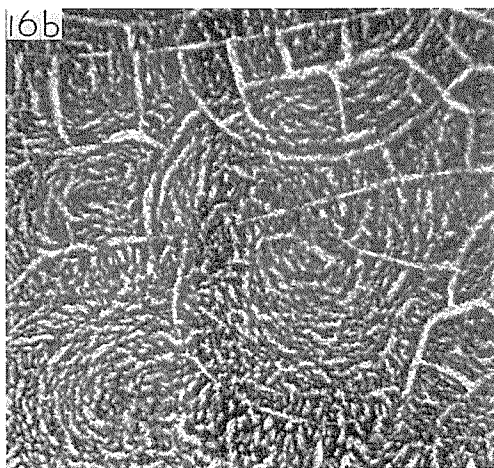
15a. 血漿. 液体窒素凍結. 乾燥状態.
 $\times 25$



15b. 15a の一部を拡大したもの. $\times 100$
2 種の亀裂, 即ち円形とその周囲のほぼ同じ
幅をもってはっきりみえる凍結亀裂と, その
間に散らばる細い不規則に切れた乾燥亀裂と
がみられる



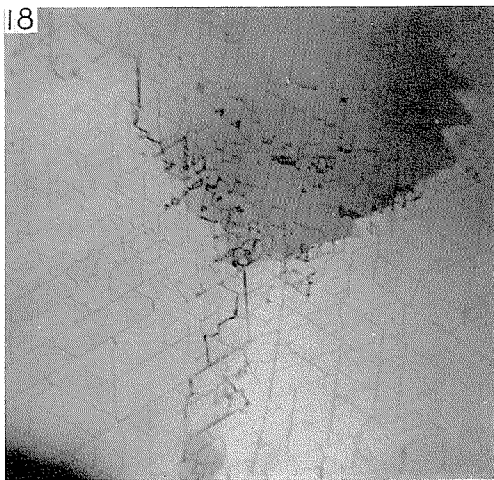
16a. 血漿. 液体窒素凍結. 乾燥状態.
× 25
視野の上部は試料が厚く, 下部は薄い, 薄い
ところでは, 乾燥亀裂だけがみられる



16b. 16a の一部を拡大したもの, × 100
凍結亀裂と乾燥亀裂が混在し, しかも, 氷晶
のパターン, 特に periodicity に対応して (a
でよくわかる), 乾燥亀裂の走る方向に規則性
がみられる



17. 脱イオン水. -25°C 凍結. 凍結状態.
× 50
偏光で氷晶のパターンがよくみとめられる



18. 脱イオン水. 液体窒素凍結.
凍結状態. × 50
3本の border line で区切られた3つの氷晶
がみられ, それぞれに対応して, 三角, 四角,
多角形の亀裂のパターンがみられる