



Title	凍結乾燥に於ける乾燥の機構 X II : 二次乾燥過程に於ける大腸菌の脱水と細胞活性について
Author(s)	根井, 外喜男; NEI, Tokio; 荒木, 忠 他
Citation	低温科学. 生物篇, 23, 77-83
Issue Date	1965-12-01
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17698
Type	departmental bulletin paper
File Information	23_p77-83.pdf



凍結乾燥に於ける乾燥の機構 XII*

二次乾燥過程に於ける大腸菌の脱水と細胞活性について

根井外喜男・荒木 忠

僧 都 博・小島 義夫

(低温科学研究所 医学部門)

(昭和40年7月受理)

I. 緒 言

微生物の凍結乾燥を行なう場合、細胞からどのような機構で水がとれて行くか。また、この水が細胞の活性にどのような影響を与えるかについて、われわれは一連の研究を行なってきた^{1,2)}。その結果、大体次のことがいえると思う。

細胞のもつ水分は、最初の凍結の段階で凍る凍結水分と、凍らない不凍水分とに分けられるが、いわゆる一次乾燥の過程では、そのうちの凍結水分が氷の形から昇華によって奪われてゆき、次に二次乾燥に移って、残りの不凍水分が脱水されるものと思われた。更に細胞活性は一次乾燥の段階では殆んど低下しないが、二次乾燥に移ってから不凍水分が除かれるに依り、それと平行して低下するものと考えられた。

即ち、乾燥過程の条件の如何に拘らず、乾燥直後の細胞活性はすべて残水量の多寡に比例し、水が奪われるほど生残率が低下するものと考えられる結果を示していた。

しかし果して細胞活性は残水量だけに依存するものかどうかについて、特に二次乾燥過程の脱水に関与する条件を吟味する目的で今回の実験を行なったのである。

われわれがこれまで実験に用いてきた大腸菌では、その細胞水分中の不凍水分量は、乾燥量基準にして凡そ18%に当るが、通常用いる凍結乾燥法では、1%くらいまで脱水されてしまうし、たとえ乾燥終末に達しない前にとめたとしても、試料内の部分によって乾燥の過不足のところがあるので、18%くらいの多量の残水量をもった均一な乾燥試料を得ることは容易ではない。従って、不凍水分量の脱水し始める時期から、殆んど脱水しきってしまうまでの二次乾燥の全過程に亘って、細胞の脱水と活性との関係をしらべることは困難であったし、事実、こうした立場で検討を加えた研究は皆無であった。

そこで、今回は先ず高残水量の試料を得る方法を第一に工夫し、次いで、その得られた試料について、いわゆる二次乾燥過程での温度、乾燥速度が細胞活性にどのように影響するかをしらべた。

* 北海道大学低温科学研究所業績 第737号

II. 方 法

実験方法はすべて前報¹⁾と同じなので、詳細はそれに譲る。

試 料： *E. coli.* の蒸溜水浮遊液（菌濃度約 400 mg/ml）を用いた。

凍結乾燥法： 特殊な肉薄の球形アンプルを用い、これに菌液 0.25 ml を入れ、薄層にして -25°C で凍結させる。それを乾燥容器に納め、多岐管に接続して乾燥する。この際、同一又は連結容器に氷を入れたり、乾燥温度や乾燥径路を加減して、所期の終末含水量を得るようにした。

水分量測定法： アンプルのまま乾燥前後の重量を化学天秤ではかり、乾燥量 (60°C , 10^{-5} mmHg, 3 時間乾燥) 基準で残水率を表わした。

生残率測定法： 乾燥後、室温で蒸溜水を加えて適宜の菌濃度とし、平板に培養して発育コロニー数を数え無処置対照に対する百分率で表わした。

III. 結 果

1. 高残水量の乾燥試料を得る方法

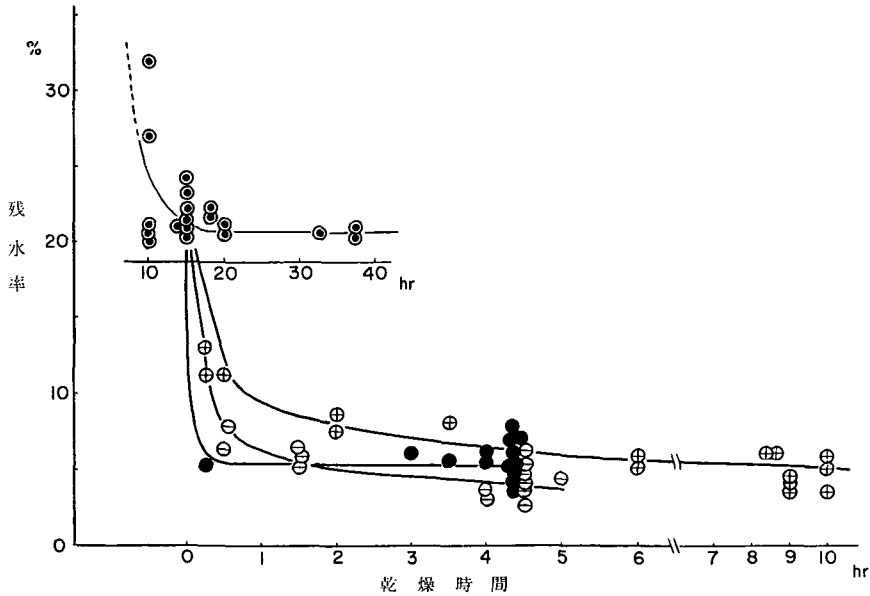
既に前報¹⁾に於いても述べたように、高残水量の試料を得るためには、いろいろの方法が工夫された。特に注意すべき点は、試料中に部分的に未乾燥部分が残っていて、それが取り出した後で融けてくることのないよう、できるだけ試料全体を均一に乾燥することが肝要である。

試料温度： 以上の目的のためには、乾燥時の試料温度を下げるのが最も手近な方法のように思われるが、温度が低くなるほど、乾燥速度は急激に低下して、乾燥には非常に長い時間がかかることになる。例えば -20°C では数時間で乾くものも、 -30°C では数日を要することになる。これでは、多くの実験をくりかえすための材料を得る方法としては不便なので、温度は -20°C に止めた。

氷の共存： 試料の環境の水蒸気圧を大きく保つために、試料の入った容器の底、或いは別なアンプル（この時は特別な枝付の試料容器を使い、アンプルを試料容器に連結する）に大量の氷をおいた。

試料の外部条件： 昇華或いは蒸発を左右する条件として、真空度、試料とコールド・トラップとの径路の内径・距離、トラップの温度等いろいろな因子が考えられるが、一般に最終の蒸発量を押えるような条件では、同時にそれまでの乾燥速度を押えることが多いので、結局長時間を要することになる。そのうち、比較的一定条件に保ちやすいところの試料とトラップ間の距離を長くする方法を採用した。

本実験で採用した条件： 以上の検討の結果、乾燥温度は -20°C 、容器の底に氷をおき、トラップとの距離は 1 m とすると、約 15 時間でほぼ 20% 前後の残水量をもった乾燥菌体を得られた。この条件での乾燥曲線は第 1 図に示す通りで、40 時間までおいても、残水率は殆んど変らない。



第1図 一次乾燥並びに二次乾燥過程に於ける乾燥条件と残水率との関係(乾燥曲線)。図の上半は一次乾燥過程, 下半はその試料より出発した二次乾燥過程での3条件の経過を示す

2. 二次乾燥過程の乾燥条件と生残率

A. 乾燥温度並びに速度の吟味

前記のようにして得られた約20%の残水率の試料を出発材料として、二次乾燥過程の乾燥条件を吟味するのであるが、乾燥温度や速度を変えるといたっても、生残率を比較するためにはほぼ同一の残水量をもった試料について行なうことが必要であるから、あまり極端にちがった条件で乾燥するわけにはいかない。

そこで大体次のような方法を採用してみた。

1) 5% 前後の残水率の試料をうる条件

- (1) 試料は 20°C にし、連結した別の容器の水を 0°C にする。5 時間乾燥。
- (2) 試料は -20°C とし、水を入れず、トラップまでの距離を 10 cm とする。5 時間乾燥。
- (3) 同じ条件で 1 m の長管を用いる。10 時間乾燥。

2) 1% 前後の残水率の試料をうる条件

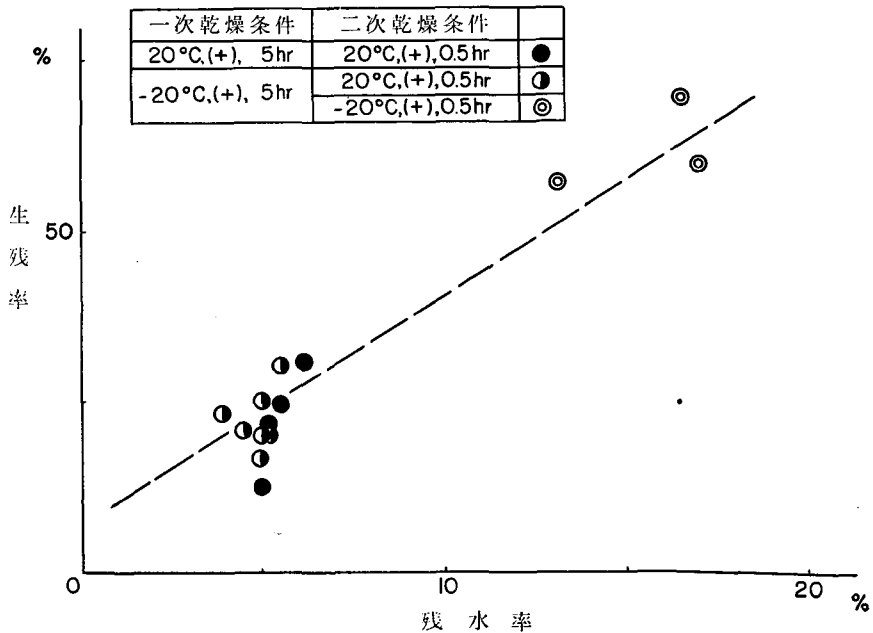
- (1) 試料を 20°C とし、連結容器の水を -40°C とする。5 時間乾燥。
- (2) 試料を -10°C とし、水を入れず、短管で 5 時間乾燥。
- (3) 同じく長管で 10 時間乾燥。

これらの条件での乾燥曲線は、その一部(5% 残水率のものだけ)を第1図に示した。5% とか 1% とか正確にその残水率のものを得ることは難かしいが、大体それに近い値のものを得た。

B. 乾燥条件と生残率

1) 一次乾燥条件の異なるものの比較

前報では、一次及び二次乾燥過程を通じて、終始異なった条件で乾燥したものの比較しか行なっていなかった。今回は先ず、一次乾燥は異なるが、二次乾燥の同一なもの比較を行なってみた。即ち 20°C (同一容器内水), 5 時間後, 更に 0.5 時間同じ条件においたものと, -20°C (同一容器内水, 短管), 5 時間後, 20°C に上げて 0.5 時間おいたものとの比較では、いずれもほぼ 5% 前後の残水率を示し、しかも一次乾燥の条件が異なるに拘らず、生残率はほぼ等しい値であった。その結果は第 2 図に示す通りである。



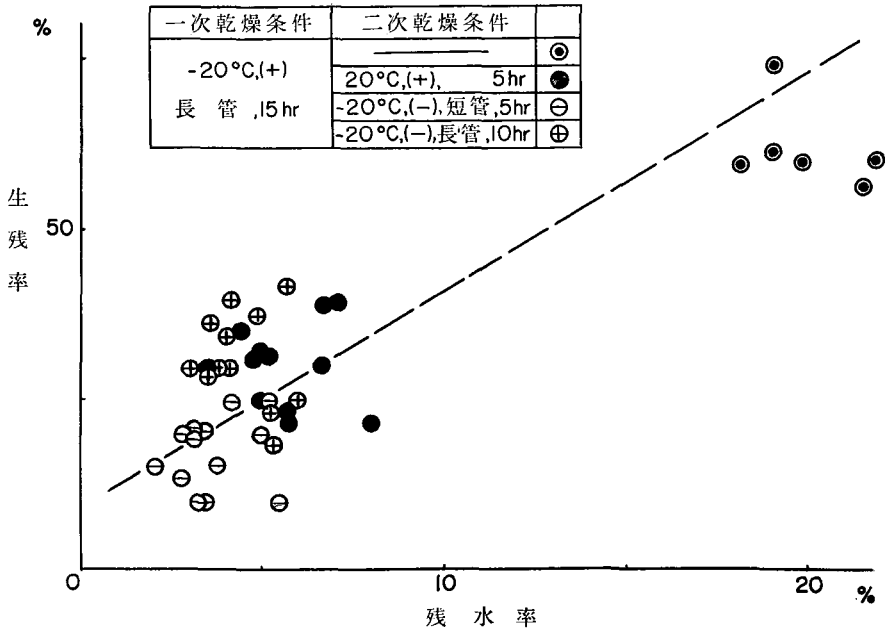
第 2 図 一次乾燥が異なり、二次乾燥が等しい条件での乾燥後の生残率の比較 (残水率はほぼ 5% 前後の場合)
破線は前報の各種条件下で得られた残水率と生残率との関係を示す傾向

2) 5% 前後の残水率の試料についての比較

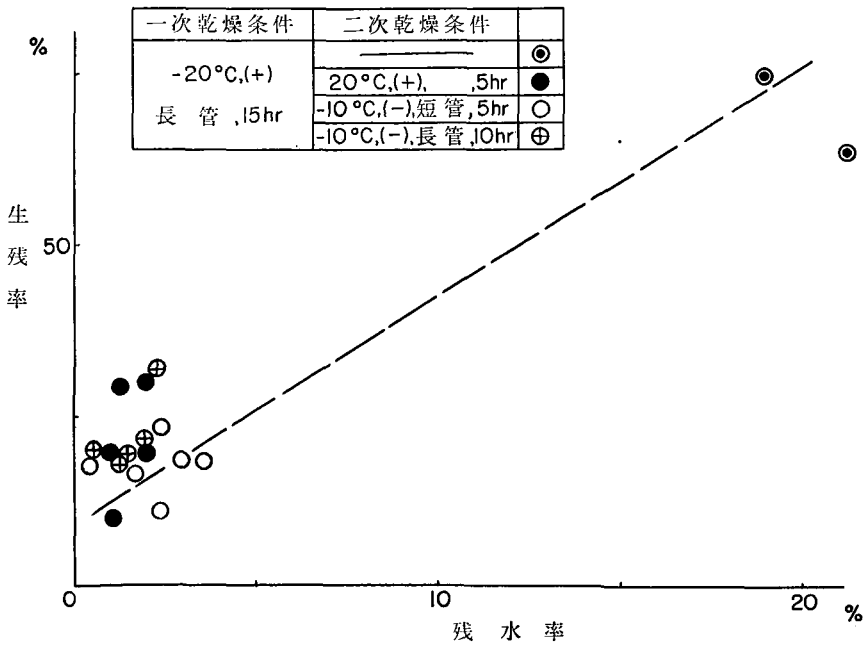
前記の二次乾燥過程の乾燥条件の項に述べた 3 種の方法で得られた試料の生残率は、第 3 図に示すように、この範囲の温度と速度の違いでは、生残率の上で差を見いだせなかった。

特にこれら条件下の生残率を比較するに当って、十分な推計学的検討を試みた結果、この図に示された成績からだけでは、-20°C 短管のものは他の 2 者より低い値を示すという有意の差がみとめられた。

しかし、既に前報¹⁾にも述べたように、残水率と生残率との間の直線関係には、かなりの幅がみられるので、前報中の第 3 図を基準として、それから統計処理を行なったのでは、これら 3 者間には有意の差はみとめられなかった。



第3図 二次乾燥過程での異なった乾燥条件による生残率の比較 (残水率はほぼ5%前後の場合)



第4図 二次乾燥過程での異なった乾燥条件による生残率の比較 (残水率はほぼ1%前後の場合)

3) 1% 前後の残水率の試料についての比較

第4図に示すような結果で、この場合にも生残率については、3つの条件の間で有意の差をみとめることはできなかった。

IV. 考 察

前にも述べたように、従来の凍結乾燥に関する研究では、細胞水分のとれ方と生残率との関係を追究したものはない。我々が行なっている一連の研究に於いても、前実験ではまだ全過程を通じて異なった条件で乾燥し、その結果の残水率と生残率との関係を論じたに過ぎなかった。

これまでのいろいろな立場からの検討によって、凍結乾燥過程では、細胞水分のうち凍結水分が氷の形で昇華するいわゆる一次乾燥過程は、細胞活性にあまり影響はないが、残りの不凍水分の脱水されるいわゆる二次乾燥が、細胞活性に影響を与えるものであるとの見解に達したので、今回は、特に二次乾燥過程での条件の吟味を主体としたのである。

その結果、本実験で行なった範囲では、乾燥の温度や速度を変えても、残水率が等しい試料は、ほぼ同一の生残率を示した。従って前にも述べたように、乾燥条件の如何に拘らず、乾燥菌体の生残率は、ほぼ残水率によって規制されるものであるとみてさしつかえないであろう。

従来、凍結乾燥に於いて、乾燥過程の温度が生残率にどのような影響を及ぼすかについては多少の議論^{3)~7)}はあったが、いずれも乾燥の全過程を通じて、試料の環境をある一定温度に保っておいて、乾燥後の生残率を比較したにすぎず、細胞よりの脱水の経過或いは脱水の程度との関係については、殆んど考慮されていなかった。従っていろいろの因子が複雑にからみあつて関与する乾燥過程では、一体、乾燥温度という因子が、どれだけ直接に生残率に影響するかについては、解析が不可能であつたものと思われる。そのような意味から考えると、本研究では、細胞水分を基準とし、乾燥過程もできるだけ条件をしばつて吟味することによって、乾燥温度なり乾燥速度なりの生残率に対する影響は、かなり明らかにされたものと思う。

即ち、本実験の結果として、これらの因子が多少変動しても、生残率に差をもたらすものではなく、生残率はやはり残水率に左右されるものであることが確認された。

V. 要 約

凍結乾燥に於ける細胞の脱水と細胞活性の関係をしらべるために、先ず残水率20% くらいの乾燥菌体をうる方法を工夫した。

次に、その試料の二次乾燥に於ける条件として、乾燥温度や乾燥速度について吟味し、これらの条件の生残率に対する影響をしらべた結果、生残率は、乾燥温度や速度によるよりも、残水量によって大きく左右されるものであることが確認された。

文 献

- 1) 根井外喜男・僧都 博・荒木 忠 1964 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. 低温科学, 生物篇, **22**, 91-100.
- 2) Nei, T., Souzu, H. and Araki, T. 1964 Studies of dehydration of cellular water in the freeze-drying of microorganisms, with special reference to changes in cell viability. Contrib. from Inst. Low Temp. Sci., Ser. B, No. 13, 14-26.
- 3) Greiff, D., Blumenthal, H., Chiga, M. and Pinkerton, H. 1954 The effects on biological materials of freezing and drying by vacuum sublimation. II. Effect on influenza virus. J. exp. Med., **100**, 89-101.
- 4) Otayashi, Y. 1955 Dried BCG Vaccine. World Health Organization, Geneva, 220 pp.
- 5) Leach, R. H., Ohye, D. F. and Scott, W. J. 1959 The death of micro-organisms during drying in relation to solute concentration and drying temperature. J. gen. Microbiol., **21**, 658-665.
- 6) 佐藤和男 1959 生残率に関する 2, 3 の問題について. 第 2 回凍結及び乾燥研究会記録, 9-21.
- 7) 佐原幸雄 1960 微生物の凍結乾燥. 真空, **3**, 169-177, 214-227.

Summary

A series of studies were made to investigate the effect of the dehydration of cellular water upon cell viability during the drying process in freeze-drying of microorganisms.

Water suspensions of *E. coli* cells were used in these experiments and the drying conditions were controlled in order to determine how to obtain dried cells, which retained a high percentage of residual moisture.

The influence of the temperature and the drying rate upon the relationship between the residual moisture content and cell survival was investigated. From the results obtained, it was ascertained that the temperature and the drying rate in secondary drying did not greatly influence the survival rate of the dried cells.

In general, it was assumed that survival of the dried cells is primarily affected by dehydration of unfreezable cellular water and it therefore depends upon the residual moisture content.