



Title	凍結乾燥による試料の亀裂 : 特にアルブミン溶液についての乾燥過程の観察
Author(s)	根井, 外喜男; NEI, Tokio; 浅田, 実 他
Citation	低温科学. 生物篇, 23, 173-178
Issue Date	1965-12-01
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17707
Type	departmental bulletin paper
File Information	23_p173-178.pdf



凍結乾燥による試料の亀裂*

特にアルブミン溶液についての乾燥過程の観察

根井外喜男・浅田 実

(低温科学研究所 医学部門)

(昭和40年7月受理)

I. 緒 言

従来、凍結乾燥法は、種々の生物学的材料の生の状態をできるだけそのまま保つ方法として推奨されており、特に形態学的観察のための光学乃至電子顕微鏡標本作製法として広く利用されてきた。しかし、この凍結乾燥法によっても、なおかつ乾燥終末点に於いて試料の収縮することは免れない。このことは、既に Luyet¹⁾ 及び Nei²⁾ によってみとめられているが、特に、Nei^{3,4)} はさきに、その収縮の1つの現象として、溶液の薄層試料で特有の亀裂の生ずることをみとめて報告した。即ちその実験では、ゼラチン溶液と血漿とを用い、ガラスにのせた薄膜にして凍結及び乾燥をすると、 -196°C までの凍結で生ずる亀裂と、乾燥によって生ずる亀裂(血漿のみ)の2種のあることがわかった。

しかし、当時は装置が未完成であったため、同一試料について、凍結状態から乾燥終了までの全過程を連続して観察することができず、別々の試料で得られた凍結状態と乾燥状態の所見を示したにすぎなかった。その後、装置をやや改良し、凍結乾燥の過程を顕微鏡下で観察することができるようにしたので、改めてこの問題をとり上げた。特に乾燥過程に於ける試料温度を厳密にコントロールすることにより、脱水に伴う試料の形態学的な変化を詳しく検討したものである。

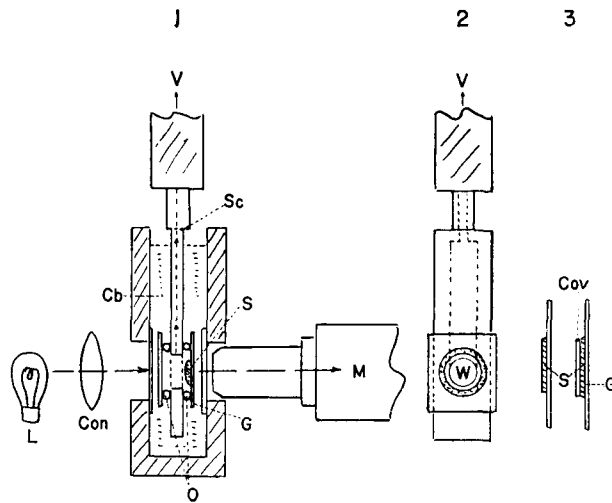
本実験の目的は、1つには最初に述べたように、組織標本作製法として凍結乾燥法を用いるに当り、乾燥温度や乾燥速度がどのように試料の形態に影響するかをしらべることにあるが更に他方には、広く機能的な立場から、凍結乾燥過程の温度或いは脱水の程度がいかに試料の活性に作用するものであるかについて知りたいということにもある。

II. 材料及び方法

試 料：試料には、10% 卵白アルブミン (W/V) 溶液を用いた。

* 北海道大学低温科学研究所業績 第743号

装 置: MacKenzie⁵⁾ の装置に倣い、しかもそれを簡易化したものを自製して用いた。即ち、第1図に示すように、真鍮板で作った試料容器には、2枚の板を通して円い窓があいており、真空に堪えるように、それぞれシリコンのOリングを挟んで2枚のガラス板で覆うようになっている。顕微鏡のレンズの側のガラスに試料を載せるのであるが、これには2つの方法をとった。1つは試料をそのまま伸展して薄層にしたものであり、他は更にカバーガラスを載せて2枚のガラスの間に試料が挟まれた状態にしたものである。いずれも、顕微鏡の微小スクリーンの読みから測定して、試料の厚さは10~50 μ であった。



第1図 凍結乾燥過程観察用装置模式図

1. 装置全体の側面図. L: 光源, Con: コンデンサー, M: 顕微鏡, S: 試料, G: ガラス, O: Oリング, Sc: 試料室, Cb: 冷却槽, V: 真空
2. 試料室の正面図. W: 窓
3. 試料の側面図. カバー・ガラスをのせた場合とのせない場合を示す. Cov: カバー・ガラス

この試料容器を挿入して、試料を凍結させる冷却槽は、既に報告したように Luyet 等の装置⁶⁾ に倣ったものであり、pneumo-controller を通して送られる空気は液体窒素で冷され、それが槽中のアルコールを常に一定温度になるように調節している。冷却槽及び試料容器の窓を通し、試料の凍結状態及び乾燥状態は、顕微鏡で観察される。氷晶の観察には特に正常光のほか、偏光も用いられた。但しこの場合、必ずしも直交ニコルを用いず、氷晶のパターンをわかり易くする程度に、検光子と偏光子の角度を加減した。

凍結及び乾燥法: 前述のように、2枚のうちの1枚に試料をのせたガラスをOリングを介して窓にとりつけ、更にその上から留金で押えておく。このように準備した試料容器を、真空乾燥装置にゴム管で接続した後、予め一定温度にしてあるアルコール槽に急激に浸して試料を凍結させる。試料自身の冷却速度は測定できないが、本実験で用いた $-20\sim-50^{\circ}\text{C}$ の範囲では、数秒乃至十数秒くらいで凍結する。低温、特に液体窒素温度まで冷却する場合は、Oリン

グが固くなって、アルコールが浸みこんだり真空洩れがするおそれがあるので、予め僅かに減圧してガラスを密着させておいてから凍結させる。

このようにして、所定の温度で凍結した後、試料を冷却槽に浸したまま、まず凍結状態を顕微鏡で観察する。次いで減圧を開始し、乾燥過程を連続観察する。

このような実験条件では、試料はガラス1枚を介して直接周囲のアルコールに接しておりしかも全ガラス面に対して試料の量は極めて僅かであって、昇華の潜熱による冷却は殆んどないから、アルコール槽の温度はそのまま試料温度とみなしてさしつかえない。従って試料温度は所要温度に厳密且つ自由に調節することができる。

III. 結 果

1. 2枚のガラスに挟んだ試料

-20~-50°Cで凍結した試料の最初の凍結のパターンは、前報のゼラチンや血漿に似たいわゆる *irregular dendrites* を示す。またこの温度範囲内では凍結のパターンに本質的な差異はない。

次に乾燥が始まると、試料の周辺部から中心部に向って乾燥の前線（乾燥部分と未乾燥凍結部分との境界線）の移動するのが、はっきりとみとめられる。特に偏光を用いると、乾燥部分と凍結部分の違いがよくわかる。

この前線の移動速度、即ち乾燥速度は試料温度によってきまり、温度が高ければ速度は大きい。

ここで注目すべきことは、乾燥部分につきつぎと現われる形態的变化である。しかも、それが温度によってかなり明瞭に異なるのである。例えば、-20°Cでは、前線の過ぎた直後の乾燥部分に、前線に平行して断続した裂目ができる。ところが試料を-30°Cまで冷すと、もはやこのような裂目はできず、最初の凍結の時にできたパターンがそのままの形で残される。再び温度を-20°Cまで上げると、前回と全く同じに、平行した断続亀裂ができる。これらの過程は図版 I-1 に示す通りである。

しかし、乾燥部分に一旦できてしまった亀裂は、その後温度を0°C 或いは室温まで上げても、その長さや幅はあまり変らない。

次に液体窒素に浸して-190°C近くまで冷却した試料の乾燥状態について述べる。前報^{3,4)}にも記載したように、種々の溶液を液体窒素温度まで冷却すると、-50°C くらいまでの凍結状態では現われない特有の亀裂ができる。著者はこれを凍結亀裂と名づけた。この試料を乾燥すると、-20°C 以上では、前述の条件の場合と同様、乾燥の前線に平行する断続した裂目ができる。凍結時にできた凍結亀裂は、それらの大きな裂目の間に僅かに残っているようにみえるがあまりはつきりしない。ところが-30°C 以下になると、今度は逆に、この乾燥による亀裂は現われず、最初の凍結亀裂がそのまま残る。

2. 1枚のガラス板の上の試料

1枚のガラスの上ののばした試料は、2枚のガラスに挟んだ場合とちがって、乾燥前線な

どは現われないので、乾燥の進行状況がわかりにくい。とにかく、試料の全面から同時に昇華が起るので、乾燥終了までの時間は非常に短い。乾燥が始まると間もなく視野全体がぼけた感じになるが、やがて凍結状態の時よりももつとパターンコントラストがはっきりするようになる。これがほぼ乾燥の終了した時であるらしい。この頃から細かな亀裂が次第に見えてくる。それは最初の凍結のパターンに相応したもので、いろいろの形を画いている。このような亀裂は -50°C に冷却した場合でもでき、しかも一旦できた亀裂は、乾燥後温度を上げると更にその幅が広がる。

液体窒素に浸して凍結亀裂のできた試料を乾燥した場合は、 -20°C でも -50°C でも凍結亀裂がそのまま残り、乾燥速度がちがうだけで、パターンには殆んど差がないようである。

IV. 考 察

凍結乾燥によって試料中にできる亀裂の生成条件を詳しく検討した結果、乾燥時の条件によって亀裂のでき方の違うことがわかった。

それらのいろいろな条件の違いと、亀裂の状況との関係を一括表示すれば第1表の通りである。

第1表 試料及び凍結乾燥の条件と亀裂の状況

凍 結 温 度	乾燥温度	試 料 条 件	
		2枚のガラスに挟んだ場合	1枚のガラスにのせた場合
$-20^{\circ}\text{C} \sim -50^{\circ}\text{C}$	-20°C	乾燥前線に平行した乾燥亀裂	乾燥亀裂(最初の凍結パターンに対応)
	-30°C	亀裂できず	同 上
	-50°C	同 上	同 上
上のものをさらに -196°C まで冷却 (凍結亀裂生ず)	-20°C	乾燥前線に平行した乾燥亀裂	凍結亀裂が残る
	-30°C	凍結亀裂が残る	同 上
	-50°C	同 上	同 上

先ず最初に、試料の条件の如何に拘らず、乾燥の結果として亀裂のできることの機構について考えてみる。このような亀裂は、試料の収縮によっておきるものと考えてさしつかえないであろうが、それでは、その収縮はなぜ起るかということになると、はっきりした実証を知らない。敢えて、想像が許されるならば、蛋白溶液などについて、分子レベルで考えて、蛋白分子と水と水とで作られた網状構造の一部で、乾燥によって、水と蛋白との結合が弱くなったり切れたりする時に、分子間の力の均衡が破れて収縮が起るとでもいってよいのであろうか。

尤も、このような分子レベルでの変化を今回の実験でみられたような顕微鏡レベルの変化と、どこまで直接結びつけて説明できるかはわからない。いずれにせよ、実験的には、溶液から出発してガラスに密着した状態の試料であるから、収縮による形態的变化といっても、実験条件によっておのずから差が出るであろう。

その意味からも、まず2枚のガラスに挟まれた場合の亀裂生成の状況について考えてみ

る。 -20°C では、乾燥前線に平行して走るかなり規則性のある亀裂がみられる。これは、試料が上下の面でガラスに密着し、一定方向にのみ昇華が進行することによるのであろう。ところが、同じ試料条件でも、温度を下げて -30°C にすると、こうした乾燥亀裂は殆んどできず、最初の凍結のパターンがそのまま残るということについては、どう考えたらよいのか。ただ温度が低いために乾燥速度が遅いからということだけで説明できるのだろうか。或いは、温度が低くなるほど、試料内部の引張り応力は大きくなり、しかも乾燥速度は小さいから、収縮は起りにくいのだといってよいのだろうか。この辺の解釈は、今後の検討に俟たねばならない。

また本実験結果にみられた -20°C と -30°C の間の亀裂生成の限界温度については、これが試料の性質や種類によって変わるものかどうか、更によくしらべてみる必要がある。

次に、1枚のガラスにのせた場合に、2枚に挟んだ場合とは全く違った亀裂ができるは、昇華の進行方向が異なることにもあろうが、両者の実験条件の差として、試料全体としての乾燥速度の差、試料とガラスとの接触面の違いなどがあげられよう。

2枚の場合に、乾燥後温度を上げても、亀裂の幅は殆んど変わらないことから、始めは、亀裂は要するに乾燥の過程(特に大部分の氷の飛ぶ昇華の過程)によって左右されるもので、終末含湿度(つまり最終的な微量水分の脱水)には余り影響されないものと考えた。ところが、1枚ガラスの時には、乾燥終了後、温度が上るほど亀裂が大きくなるので、この場合は終末含湿度によって変わるものと思われる。こうした違いは、試料のガラスとの固着状態の差異だけで説明できるかどうかはわからない。

いずれにせよ、 -50°C まで冷却しながら乾燥しても、なおかつ、脱水に伴なって亀裂を生ずるということは、この程度の冷却では、まだ乾燥によって試料の変形収縮のおこるのを防止できないことを示すものである。しかも、従来一部には、一旦凍結乾燥が終了してしまえば、温度を上げて変形がないもののように考えられていたが、本実験の結果からもわかるように凍結乾燥に於ける乾燥の方法、特に乾燥時の冷却温度については充分の注意を払わねばならぬこと、とりわけ組織学的標本作製法として凍結乾燥法を用いる場合に、一層の注意の必要であることが示唆されているものと思われる。

V. 要 約

卵白アルブミン溶液を試料として、凍結乾燥過程の形態的变化を顕微鏡的に観察し、特に脱水に伴う亀裂生成の条件を吟味した結果、乾燥の条件によって亀裂の形はかなり異なり、しかも -50°C の乾燥温度でも亀裂のできることがみとめられた。

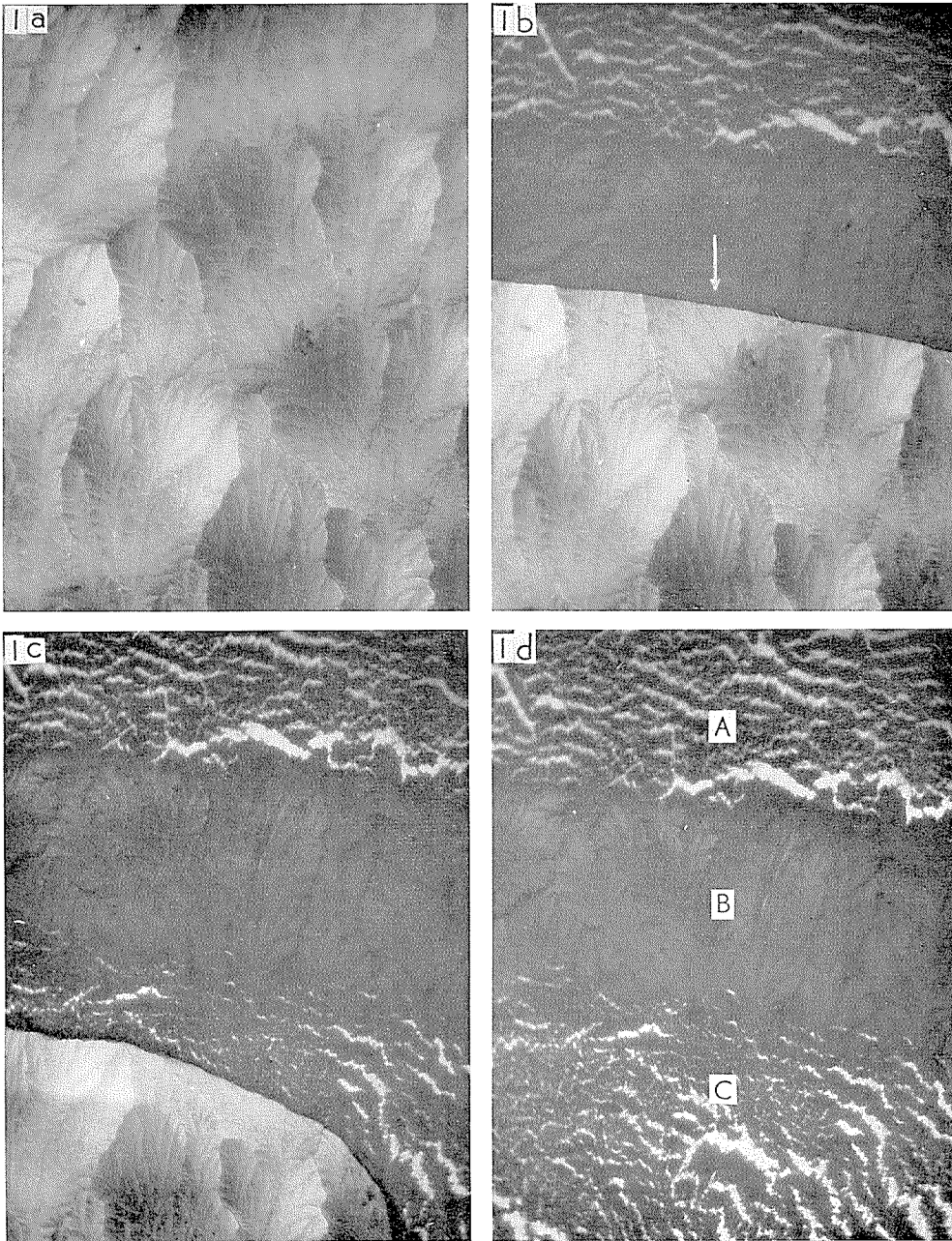
文 献

- 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 1964 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. 低温科学, 生物篇, **22**, 133-138.
- 4) Nei, T. 1964 Formation of cracks in the freezing and freeze-drying of some biological preparations. *Biodynamica*, **9**, 247-255.
- 5) MacKenzie, A. P. 1964 Apparatus for microscopic observations during freeze-drying. *Biodynamica*, **9**, 213-222.
- 6) Rapatz, G. and Luyet, B. 1957 Apparatus for cinemicrography during rapid freezing. *Biodynamica*, **7**, 346-354.

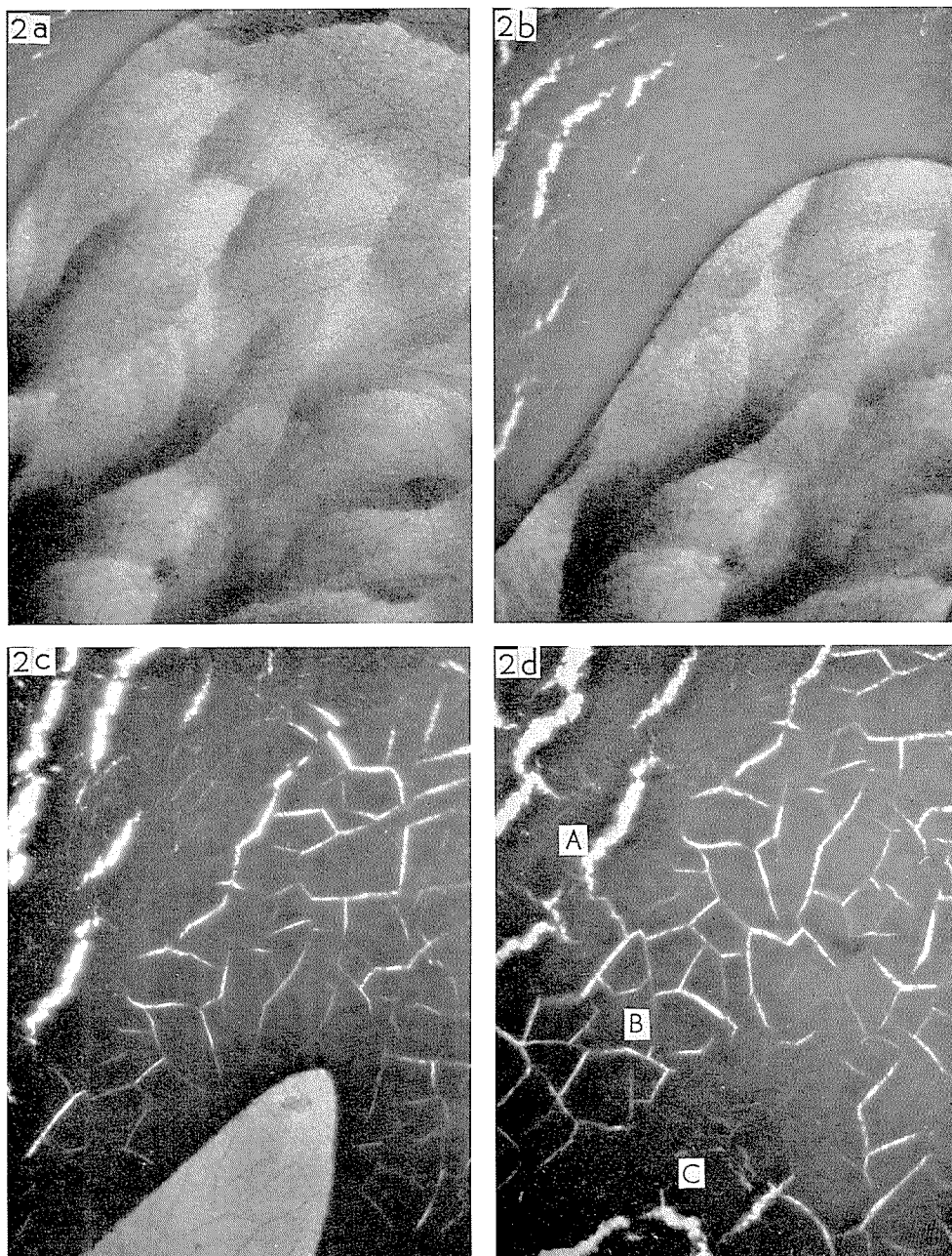
Summary

Morphological changes produced by freeze-drying in a thin layer of 10% egg albumin solution were studied with a specially designed equipment incorporated in a microscope.

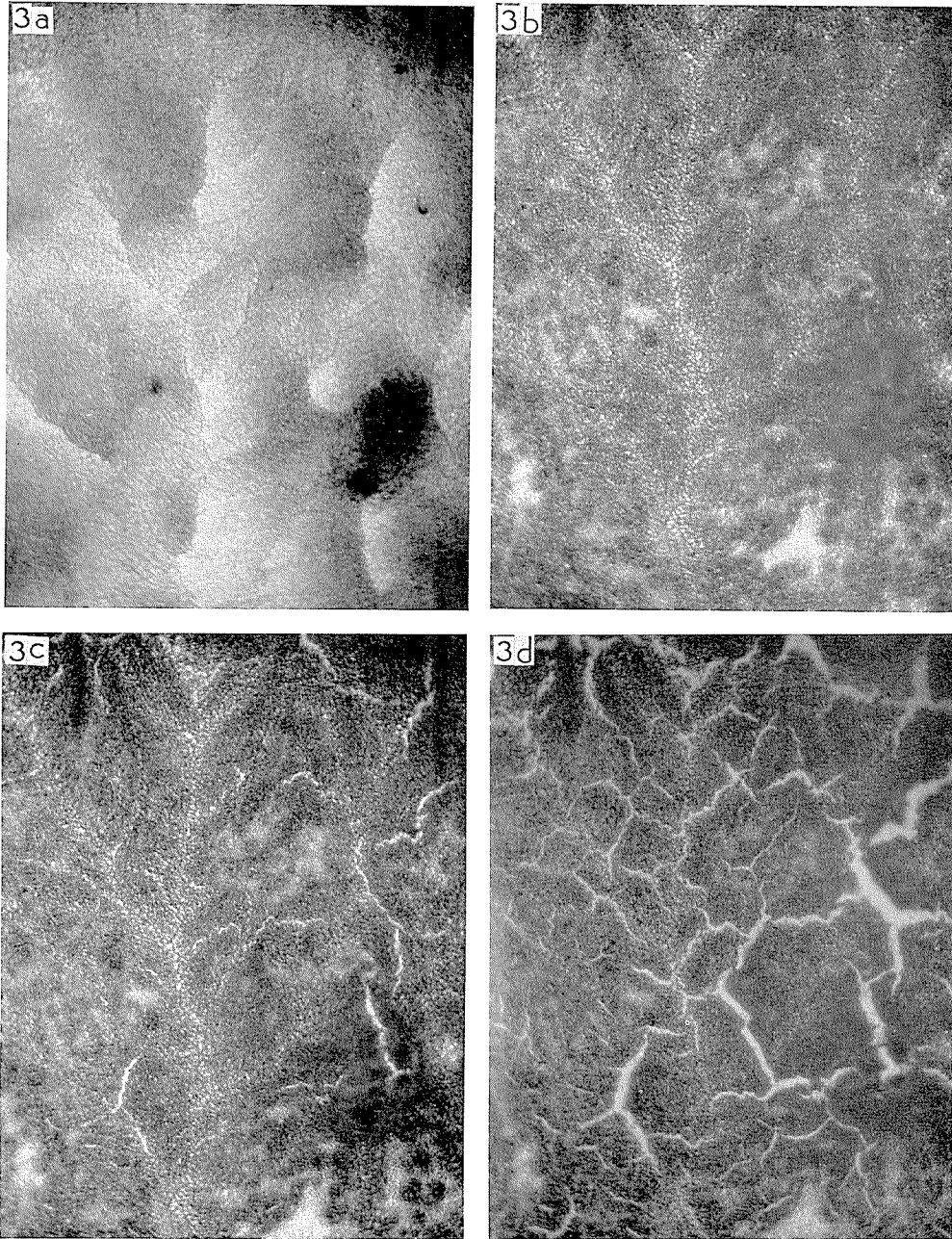
Crack formation was observed in the specimens as dehydration proceeded during the drying process. Such crack formation depended upon the drying conditions, particularly the temperature: specimens between two glass plates cracked when dried at temperatures above -20°C , while those on single glass plates cracked even when dried at lower temperatures such as -50°C .



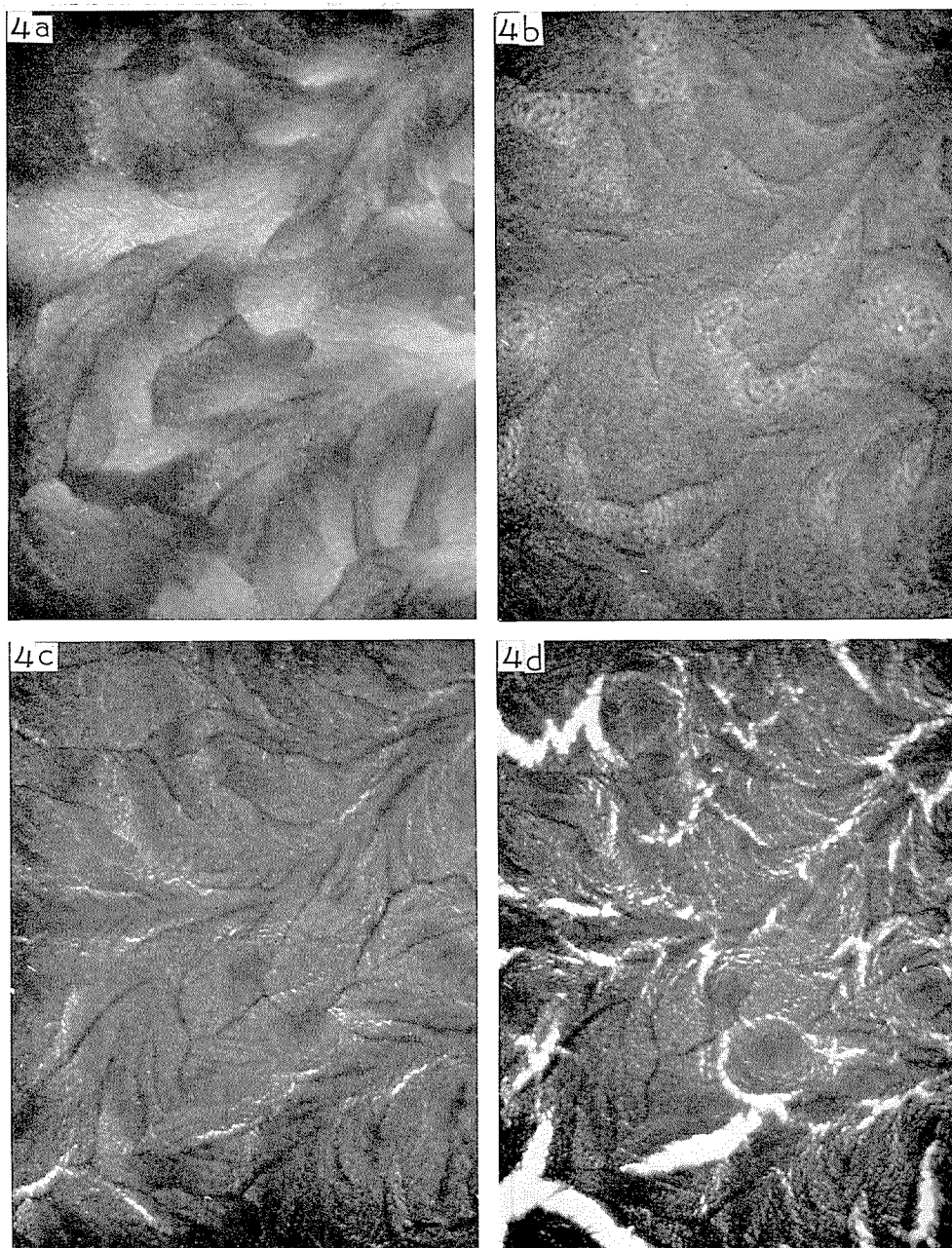
1. 2枚のガラスに挟んだ試料 ×70
 - a. -20°C での凍結状態。irregular dendrites がみられる
 - b, c. 種々の温度での乾燥過程。矢印は乾燥の進行方向と乾燥の前線を示す
 - d. 乾燥終了後。Aは -20°C 、Bは -30°C 、Cは -20°C で乾燥した部分を示し、AとCでは亀裂を生じているが、Bでは最初の凍結のパターンがそのまま残っている



2. 2枚のガラスに挟んだ試料 ×70
- a. -20°C で凍結後, -196°C まで冷却し, 再び -20°C まで上げたもの。
irregular dendrites の中に凍結亀裂がみられる
 - b, c. 種々の温度での乾燥過程
 - d. 乾燥終了後。A は -20°C , B は -30°C , C は -20°C で乾燥した部分を示し, A と C では乾燥亀裂を生ずるが, B では凍結亀裂が残る

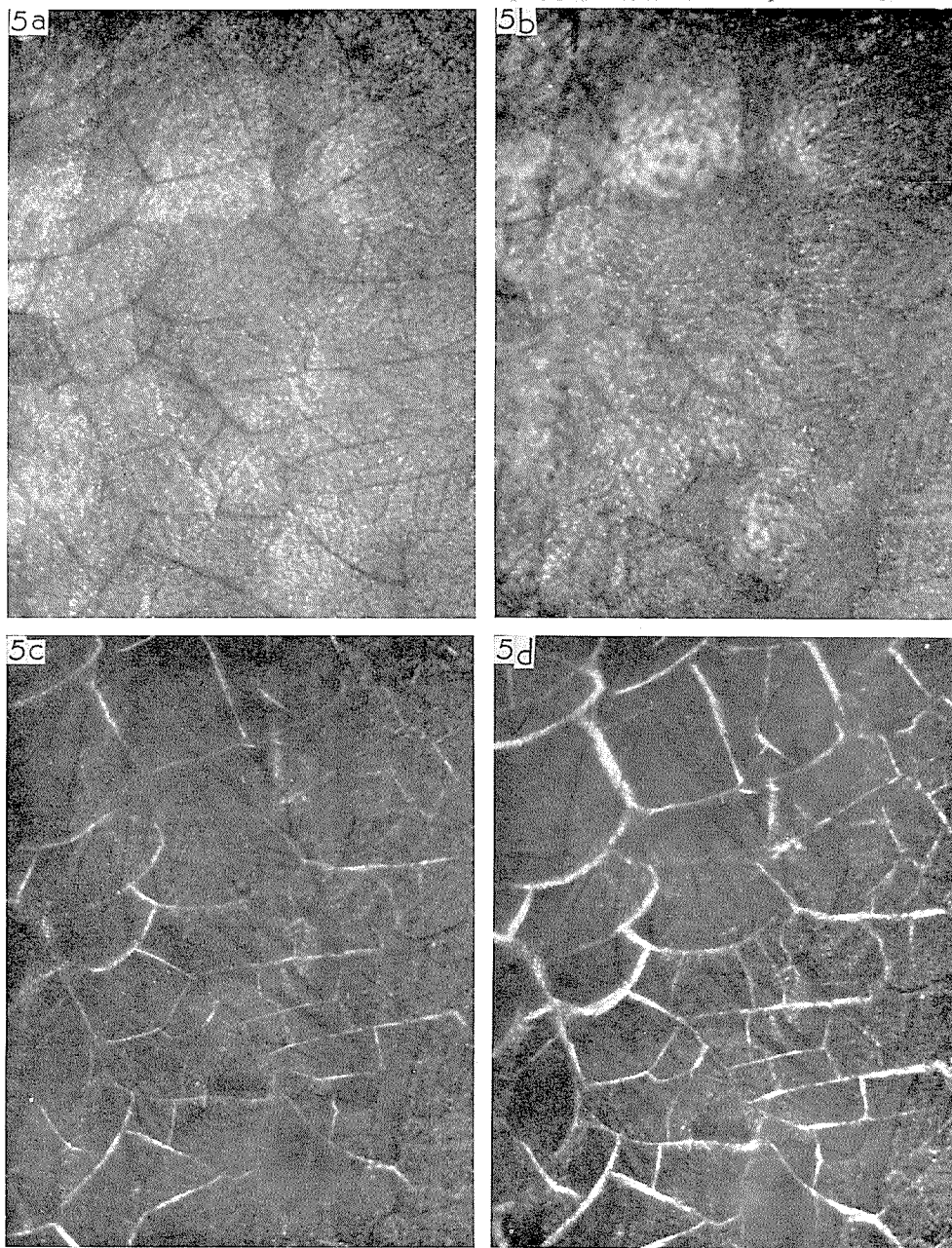


3. 1枚のガラスにのせた試料 ×70
- a. -20°C での凍結状態
 - b, c. -20°C での乾燥過程。irregular dendritesに相応したパターンが次第にはっきりとみえてくる
 - d. -20°C での乾燥終了後

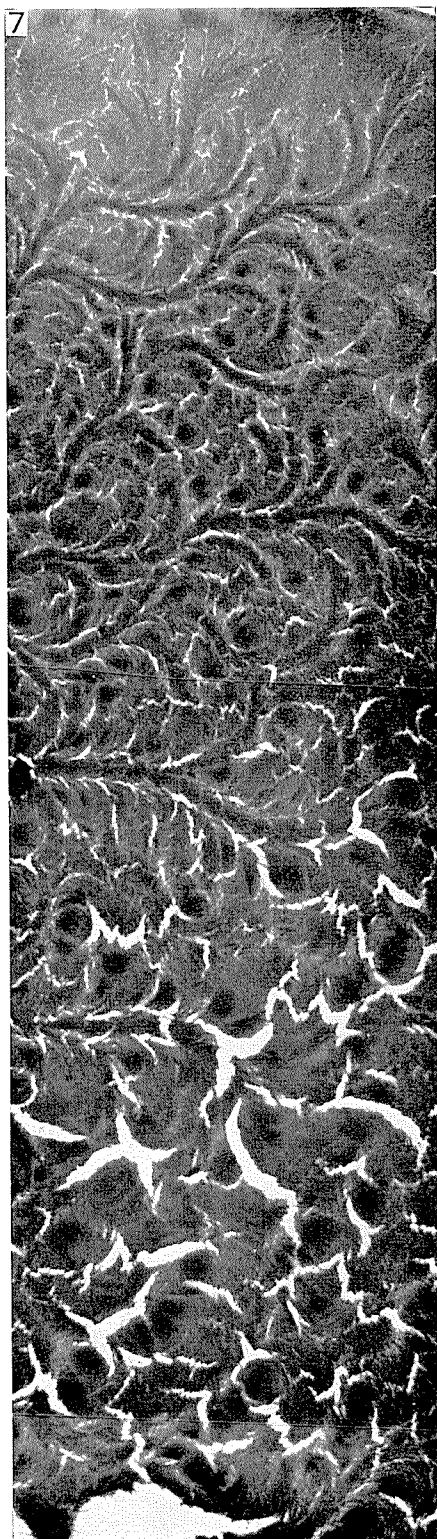
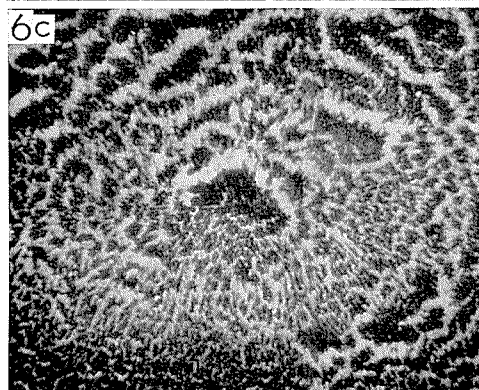
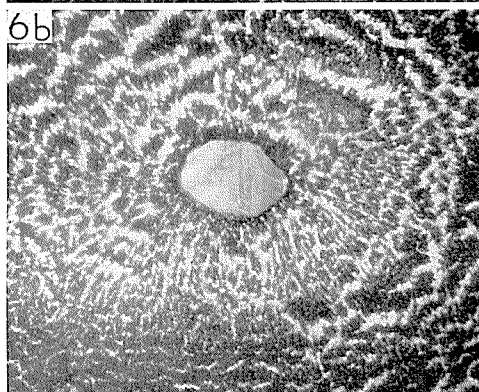
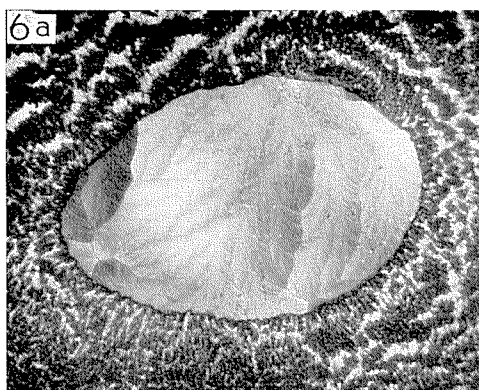


4. 1枚のガラスにのせた試料 ×70

- a. -50°C での凍結状態
- b, c. -50°C での乾燥過程。視野全体がほけた感じになった後、小さな亀裂がみえてくる
- d. -50°C での乾燥終了後、 -10°C まで上げたもの。亀裂がはるかに大きくなる



5. 1枚のガラスにのせた試料 ×70
- a. -20°C 凍結後, -196°C まで冷却し, 再び -40°C まで上げたもの。凍結亀裂がみえる
 - b, c. -40°C での乾燥過程。凍結亀裂がそのまま残る
 - d. -15°C まで上げたもの。亀裂の幅が広くなる



6. a, b, c. 1と同じ試料。中心部の乾燥過程。-13°C, ×70
7. 4と同じ試料。厚さによる亀裂の差違を示す。上部は薄く下部は厚い。×28