HOKKAIDO UNIVERSITY

| | |
|---|---|
| Title | アルブミン溶液の凍結乾燥による亀裂生成 |
| Author(s) | 根井, 外喜男; 浅田, 実 |
| Citation | 低温科學. 生物篇, 27, 1-10 |
| Issue Date | 1970-02-20 |
| Doc URL | https://hdl.handle.net/2115/17745 |
| Type | departmental bulletin paper |
| File Information | 27_p1-10.pdf |

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

Tokio NEI and Minoru ASADA 1969 Formation of Cracks in Albumin Solutions by Freeze-Drying. *Low Temperature Science, Ser. B, 27.* (With English Summary p. 10)

# アルブミン溶液の凍結乾燥による亀裂生成*

根井外喜男・浅田　実
(低温科学研究所)

(昭和44年9月受理)

## I. 緒　　言

さきに，著者等は，蛋白溶液などを薄層試料にして顕微鏡で観察すると，凍結や乾燥の条件によって，試料中に特有の亀裂の生ずることをみとめ，ごく低い温度まで冷却することによって生ずるものを凍結亀裂 (freezing crack)，乾燥によって生ずるものを乾燥亀裂 (desiccation crack) と名づけた[1,2]。

その後，更にアルブミン溶液について，乾燥亀裂の生成過程を観察して報告した[3,4]。

今回は，近年当研究室に備えつけられた特殊低温顕微鏡を用い，特に亀裂生成にあたっての冷却と乾燥の条件について吟味したのでその結果について報告したい。

## II. 材料と方法

**試料**：卵白アルブミン（カメレオン印・キシダ化学製）の10% 及び1% の溶液 (W/V) を用いた。

**装置**：温度制御付冷却装置及び真空装置を備えた倒立型特殊顕微鏡[5]を使用した。

**凍結並びに乾燥法**：アルブミン溶液を0.01～0.02 ml，試料台の鏡面にとり，そのまま薄く伸展するか，特殊カバー・グラスをかぶせて薄層とする。試料の厚さは部位にもよるが，凡そ数十$\mu$と考えられる。これを顕微鏡にとりつけ，カバー・グラスをかけたものでは乾燥窒素ガスを送って試料室内を除湿し，かけないものではそのままで，冷却を開始する。

緩慢凍結では，−2°C 又は −3°C 附近で予め冷却した針を試料の辺縁にふれさせて植氷する。急速凍結は毎分数十度くらいの冷却速度で行なう。この場合は大体 −10°C 前後で自然に過冷却が破れる。

所要の温度まで冷却して，先ず対照としての形態的な凍結の様式（以下凍結像とよぶ）を観察した後，試料室を減圧して乾燥を開始する。カバーのある場合は，乾燥状態をみながら次第に温度を上げ，各温度での凍結部分，乾燥部分の形態的変化を観察することができる。カバーのない場合は，乾燥が速かであるから，途中で温度を変えて観察するということはできない。従って，最初所要温度まで上げて，その温度のままで乾燥する。

乾燥条件の吟味は，コックの開閉で排気速度を変えること，ロータリー・ポンプと拡散ポンプの使い分け，コールド・トラップの温度を変えること，などによって行なった。

* 北海道大学低温科学研究所業績　第997号

## III. 結 果

### 1. 試料にカバーのない場合

**10 % 溶液**： 最初試料をとる時，操作中に乾燥しない範囲でなるべく薄く一様に伸ばすが，周辺と中心部で多少厚さに差のできることは避けられない。

急速凍結試料の凍結像は，Luyet らのいういわゆる花弁状の irregular dendrite[6] の様式を示す。周縁部の薄い部分では，正常光でも凍結像がわかるが，中心部では偏光でないと何も見えないことが多い。このような凍結状態は，温度を上げても，−20°C までは全然変化がみとめられない。それより温度が上がると，像は正常光でも見えるようになり，花弁状の各片の境界から粒子状のものが現われてきて，次第に全体の凍結像が崩れ，−5°C 前後で完全な大きな氷晶群に変わる。

乾燥過程の観察では，凍結試料は，減圧を開始すると間もなく，視野が一旦暗くボケてきて細部がわからなくなる。この変化は，温度が高く乾燥速度が大きいほど急激におこるが，やがてまたはっきりと見えてくるので，それを対照の凍結像と比較した。乾燥後の試料には，凍結時の像がそのまま残っており，その中に，各温度での凍結像に応じて，大小さまざまの亀裂ができる。例えば，いま −50°C に試料を保持したまま，コールド・トラップを使わずに，油回転ポンプだけで $10^{-2}$ mmHg くらいの真空度で乾燥を続けると，花弁状の irregular dendrites の境界線にそって散発的に非常に細い亀裂ができる。このままでは乾燥を数時間続けても，殆んど変わりはないが，液体窒素のトラップを用い，拡散ポンプで $10^{-5}$ mmHg くらいの高真空にして乾燥を続けると，亀裂の幅は大きくなる。この状態で乾燥を続けながら，温度を上げて行くと，−20°C くらいまでは亀裂は拡がるが，それより高温では，もう余り変わらない (第 1 図)。−20°C 以下で乾燥したものでも，乾燥窒素ガスを入れて常圧に戻した状態で温度を上げたのでは，亀裂の幅は変わらない。

凍結試料を最初に種々の温度まで加温し，そこで乾燥を開始すると，温度が高いほど，早くからかなり大きな亀裂ができ始める。−20°C より高い温度になると，凍結像は次第に変化するが，それを乾燥にうつすと，それぞれの凍結像に応じて最初から小さな亀裂が数多くできる。

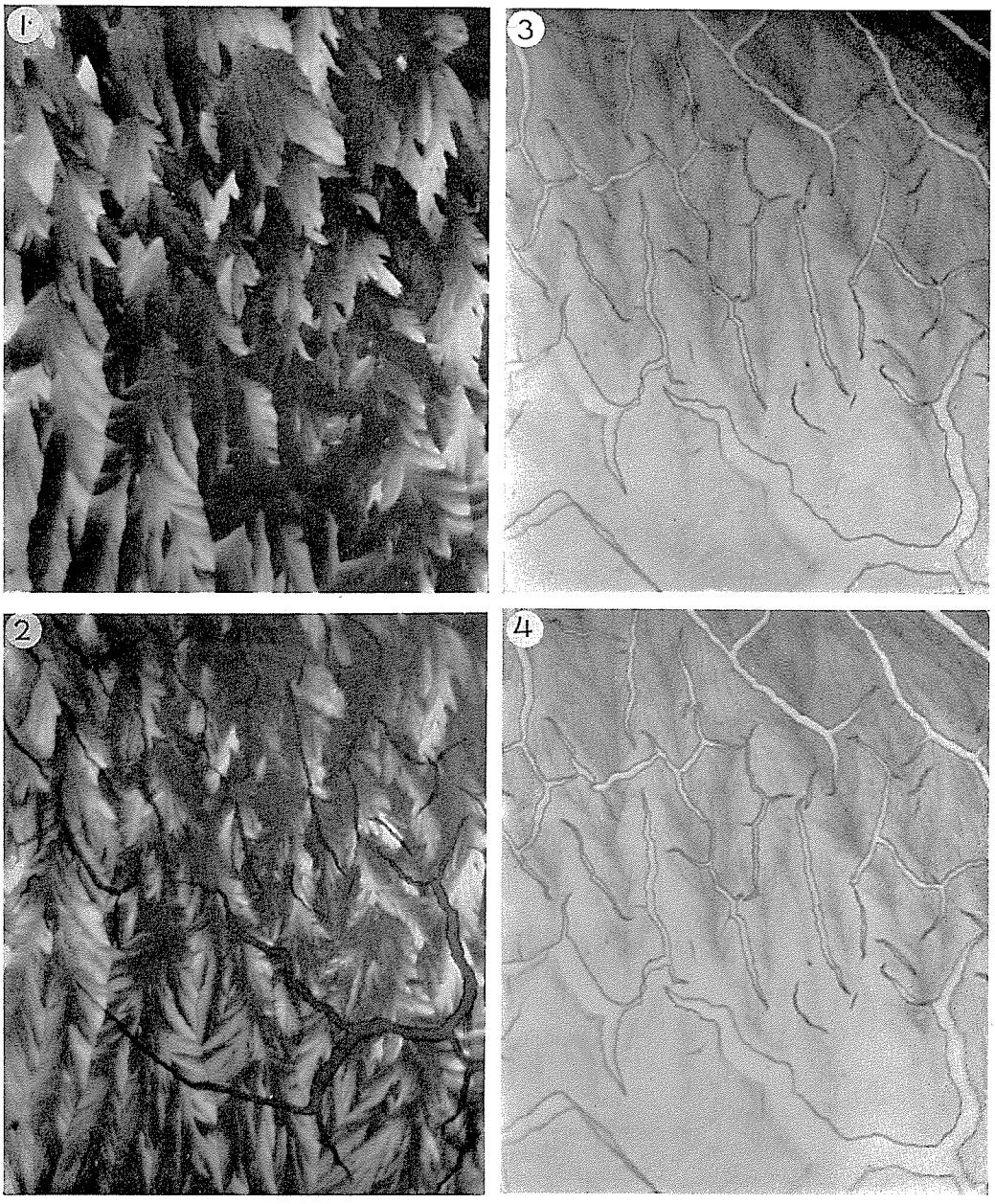
次に，植氷して緩慢凍結を行なったもの，或は一旦 −2～−3°C まで加温した後再冷却したものでは，急速凍結の時の不規則な花弁状の像と違って，かなり規則性のある樹枝状結晶，或は大きな個々の氷晶を作っており，このようなものは乾燥しても，氷晶が抜けるだけで亀裂はできない (第 2 図)。

**1% 溶液**： 急速凍結のものでも，樹枝状氷晶を作るので，乾燥の後，凍結像が大体そのまま残り，目立った亀裂はできない。

### 2. 試料にカバーのある場合

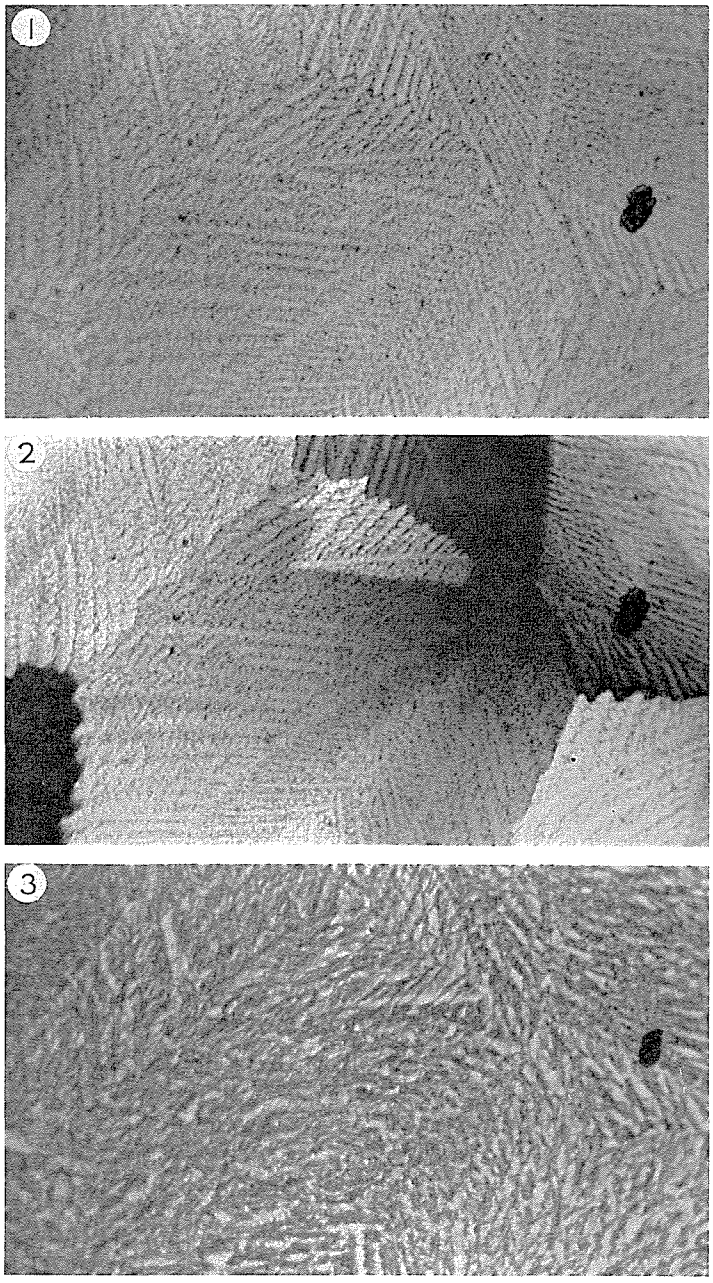
**10% 溶液**： 急速凍結のものの凍結像は，カバー・グラスのない場合と同様で，花弁状である。

これを乾燥すると，脱水は試料の周縁から中心に向って進行するので，凍結部分と乾燥部分との境界線，つまり乾燥の前線の漸次移動するようすがよくわかる。しかも 1 つの試料で，



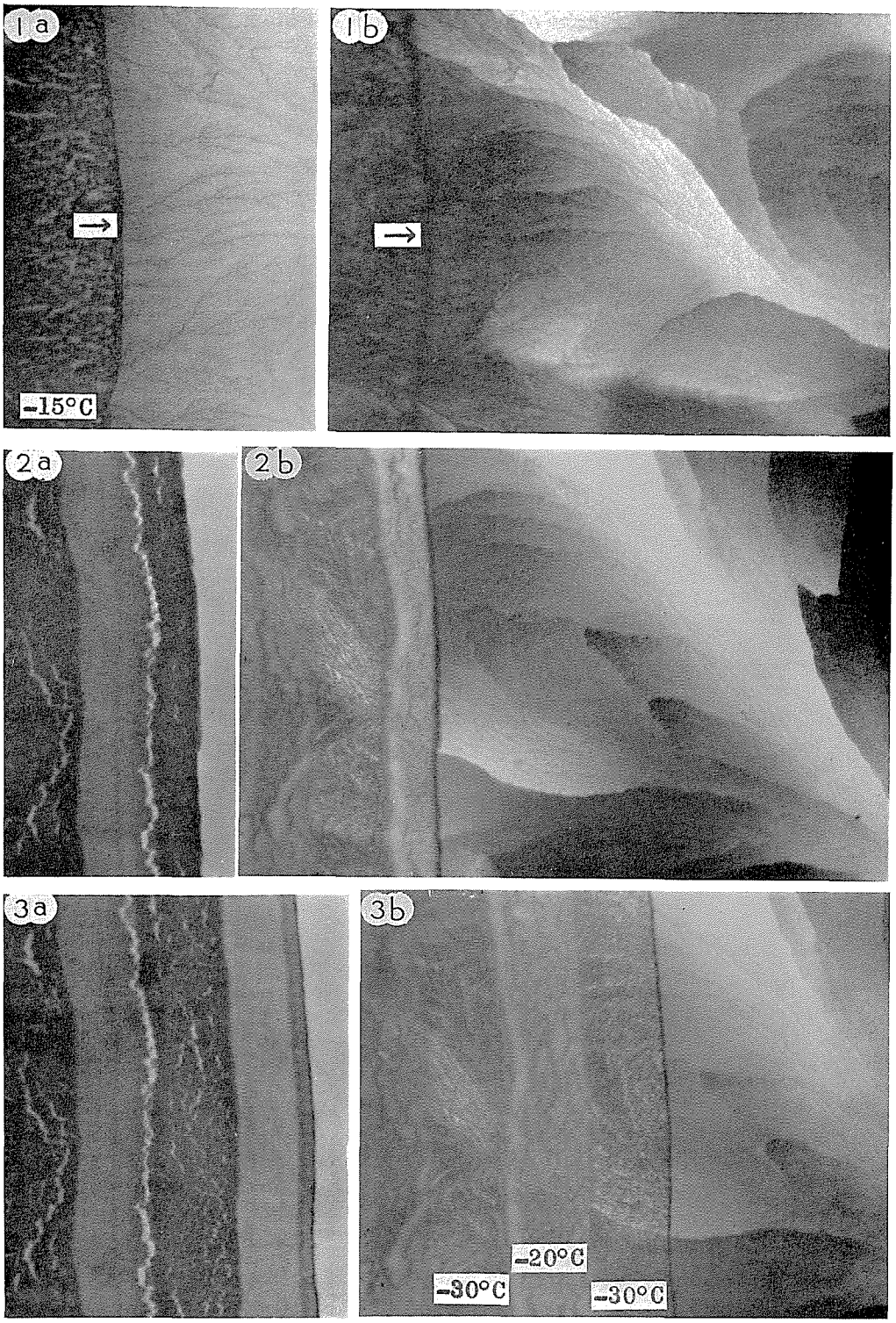

**第1図**　10% 卵白アルブミン溶液のカバーのない場合の乾燥。×200

1. −50°C，凍結状態，偏光
2. −50°C，液体窒素トラップ，高真空乾燥1時間，偏光
3. −20°C，同上条件乾燥，正常光
4. +15°C，同上条件乾燥，正常光




**第2図**　1% 卵白アルブミン溶液のカバーのない場合の乾燥。×200

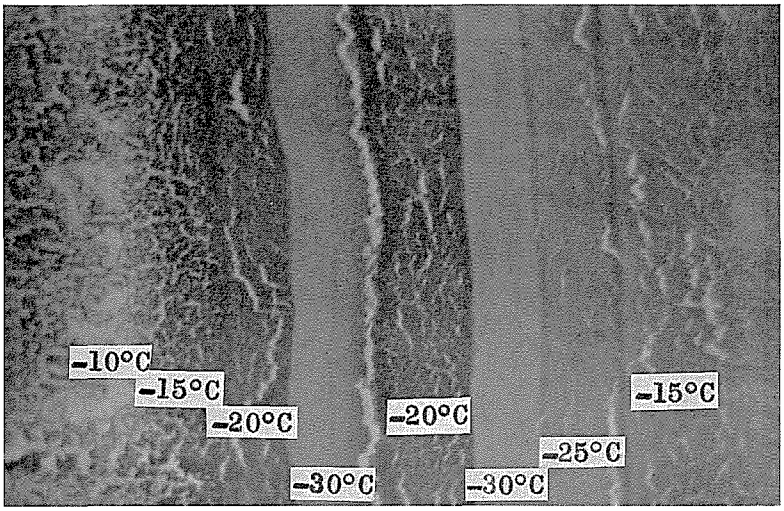
1. −20°C 凍結状態，正常光
2. 同上，偏光
3. −20°C 乾燥後，＋30°C まで加温乾燥



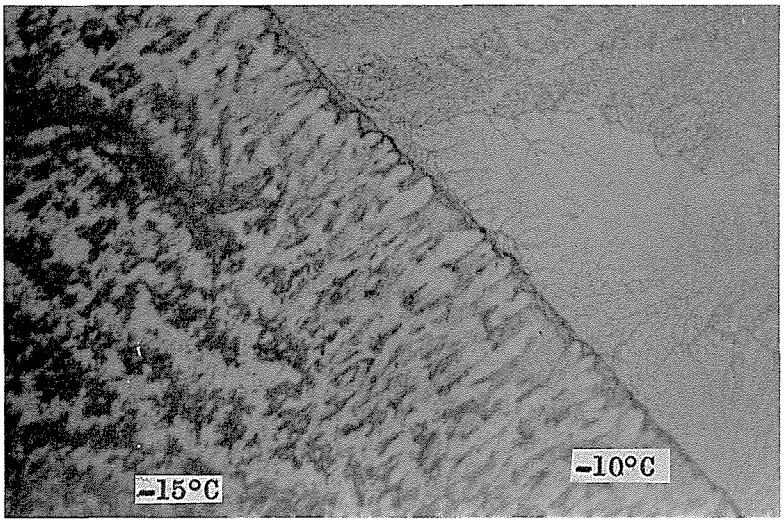

**第3図**　10% 卵白アルブミン溶液のカバーのある場合の乾燥。×200

温度を変えながら乾燥した場合の凍結部分と乾燥部分の形態を示す。a は正常光，b は偏光による。矢印は乾燥前線の進行方向を示す。2b, 3b でわかるように，−20°C より高い温度では，偏光を用いても乾燥部分に凍結時の像をみとめることができない

いろいろ温度を変えての乾燥を，くりかえし行なうことができる。まず −30°C での乾燥では，乾燥後の形態は凍結時の凍結像をそのまま残し，しかも亀裂はできない。また偏光でだけその残った像の見える場合が多い。−25°C では，やや透過度が変わるが，亀裂はできない。これが −20°C になると，かなりはっきりした変化がみられるようになる。即ち，凍結部の形態は殆んど変わらないのに，乾燥部分ではそれが全く崩れ，乾燥前線に平行した多数の直線状だが断裂した亀裂ができる。更に温度を上げて，−15°C に達すると，凍結部の形態は僅かな変化をおこすにすぎないのに，乾燥部分は全く形が崩れて，あとに前線に直角な縦に走る無数の亀裂




**第4図** 10% 卵白アルブミン溶液のカバーのある場合の乾燥。×200
各温度で乾燥したものの乾燥終了後の状態を示す。これらの亀裂は +30°C までの加温乾燥でも殆んど変わらない




**第5図** 10% 卵白アルブミン溶液のカバーのある場合の乾燥。×200
−15°, −10°C 等，比較的高い温度での乾燥状況を示す。形が全く崩れている

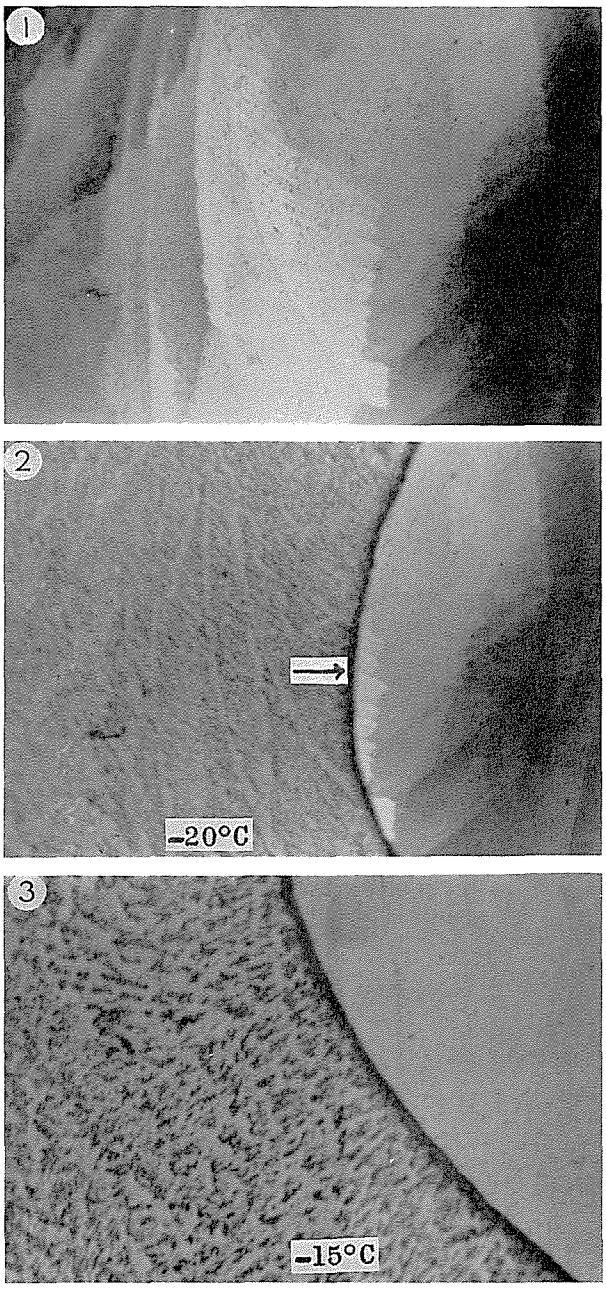
を残すようになる。このような場合には前線での試料状態は恰も融けているかのような感じである。つまり亀裂ができるというよりも，軟かく或は融けた試料の中の水だけがとれて，溶質が間隔をおいて残されたというような所見である。更に −10°C くらいになると，凍結部分は凍結像がやや崩れるだけで，まだ氷の移動などはみられないのに，乾燥部分との間は完全に離れ，いかにも融けたという状態になる。

−20°C で乾燥し，平行して並んだ亀裂のできたものを，乾燥終了後，常圧に戻して温度を上げても，真空のまま昇温しても，亀裂の程度は殆んど変わらない（第 3, 4, 5 図）。

緩慢凍結で比較的大きな樹枝状結晶を作ったものは，−10°C くらいまで温度を上げないと，凍結像の変化は現われない。特に再凍結によって大きな氷晶を作らせたものでは，−15°C においても，乾燥による亀裂はできない。

**1% 溶液**：急速凍結によって樹枝状の凍結像を示すものは，加温しても，−10°C くらいまでは変化をおこさない。

乾燥過程で温度を上げる場合，−20°C でも，10% のときのような前線に平行した亀裂はできないが，−15°C になると，始めから前線に直角な亀裂ができてくる（第 6 図）。




**第 6 図**　1% 卵白アルブミン溶液のカバーのある場合の乾燥。×200

1. −20°C 凍結状態，偏光
2. −20°C 乾燥，偏光．凍結像を残している
3. −15°C 乾燥，正常光，亀裂は乾燥前線に直角に走る

## IV. 考　　察

以上のいろいろと実験条件を変えて吟味した結果は，これを整理し要約してみると次のようである。

同じ薄層試料の凍結乾燥でも，試料にカバーのない場合とある場合

とでは，結果がかなり違う。その相違点をあげると，

1) 乾燥時の試料温度： カバーのないものでは，−50°C でも亀裂はできるのに，あるものでは −20°C 以上でなければ現われない。

2) 真空度： 真空度が上がり乾燥度が大きくなるほど，カバーのないものでは亀裂が大きくなるが，あるものにはあまり影響はない。

3) 亀裂の形態： カバーのない試料では，最初の凍結像に対応した形の亀裂ができるが，カバーのある試料では，それと無関係に温度によって，乾燥方向に直角或は平行の亀裂ができる。

なおこのうち，2) の条件のものは，両者とも −20°C 以上では殆んど変化がみられないことからいえば，両者の相違点とはいえないかもしれぬ。いずれにせよ，カバーがあるのとないのでは，試料が一面だけで支持体に接するのと，両面から挟まれるのとの違いがあり，特に試料の厚みがうすいだけに，試料と支持体との接着がより大きく影響するものと思われる。その外にも両条件による相違点をあげるとすれば，乾燥速度や水蒸気分子移動の方向性などが考えられよう。

次に，試料濃度，冷却速度の差違による変化を考えてみよう。既に他の溶液の凍結実験[7]においても述べたように，試料の濃度や凍結速度が大きいほど，いわゆる不完全結晶[6]を作り易い。これを加温して融解に至るまでの過程を観察すると，それぞれの試料に対応したいわゆる再結晶温度で凍結像の変化がみとめられる。しかし，その温度は，Luyet の考える[8]ように濃度と無関係に一定であるというものではなく，不完全結晶に近いものほど低い温度で変化が現われ始めるようであった。乾燥による形態変化も，ややこれに平行した結果を示し，不完全結晶に近い試料ほど亀裂ができやすかった。

さて，凍結試料を乾燥すると，その過程で亀裂ができることの機序については，まだ明確な説明はないが，要するに水分がとられるために，試料中の溶質部分（この場合はアルブミン）が収縮するものと解釈される。乾燥度が進むほど，亀裂が大きくなるという実験事実は，この説明を裏付けているものと思われる。低温度での亀裂の小さいのは，温度が低いと物質の硬直性が強くなるからとも考えられたが，常圧に戻して温度を上げただけでは，亀裂は大きくならないことからすれば，やはり乾燥度が主役をなすものと思われる。その乾燥度も，−20°C までの真空乾燥で脱水されるくらいが限度で，それ以上の温度でとれる水分では本実験で観察できるほどの形態的変化はおこさないものと思われる。試料が2枚のガラスに挟まれた場合に，−20°C 以下の脱水では変化をおこさないのは，ガラスとの附着によって試料は両面から拘束されて動きにくい状態になっているからであろう。この場合でも，−20°C より高い温度になると特有の亀裂ができるのは，これは低温での亀裂とは質的に違った変化であって，恐らくは温度上昇に伴なう氷晶の状態変化によるものであろうと想像される。−20°C 或は −15°C で亀裂の生成に方向性があるのは，水蒸気分子の移動の方向性と氷晶の状態（ある意味では融解の初期段階とも云えよう）とのかねあいによるものと考えられるが，適切な説明は今後の検討に俟たねばならない。

試料濃度が低いとか，冷却速度が小さいとかによる比較的完全結晶に近い凍結状態のもの

では，亀裂はできにくい。これは，凍結の過程で溶質が既に充分濃縮されていること，氷晶がかなり大きいため昇華後に多くの隙間を作ることなどのためと思われる。

最後に，本実験結果からみて，この種の実験の意義について少しふれておきたい。凍結乾燥過程の温度が，生物学的試料にどのような影響を及ぼすかということは，いろいろな意味において重要なことで，よく検討する必要がある。単に物理的に乾燥速度の促進ということにも関係はあるが，更に生物学的な意味で，形態的機能的な変化の防止をはかるというためにも重要なことである。形態的立場では，試料の乾燥後の外観をきれいにするのには，乾燥時の保持温度はどの程度でなければならぬか，特に組織学的標本作製法として凍結乾燥法を用いる場合，いかに低温に保持しなければならぬかということについて，本実験の結果は大きな示唆を与えている。また一方，細胞活性との関連について考えてみても，例えば，大腸菌の −20°C での凍結乾燥で（この場合はロータリー・ポンプだけ，但しコールド・トラップに液体窒素使用），残水度は 5% (乾燥基準)，生残率は 25% であった。これ以上温度を上げても，もはや蒸発水分量は極めて微量であり，生残率の低下も僅かであった[9]。これを直接本実験の結果と結びつけることはむりとしても，今後の参考資料となるものと考える。

これらの意味においても，本実験の線に沿った研究を今一歩進めて，基礎的問題の解明につとめるべきであろうと思う。

## 摘　要

溶液の凍結乾燥に際してみられるいわゆる乾燥亀裂 (dessication crack) の生成の機序について検討を試みた。

試料には卵白アルブミンを用い，種々の条件のもとでおこる薄層試料の凍結乾燥過程の変化を，顕微鏡で観察した。

試料にカバーをかけた場合とかけない場合で，所見はかなり異なり，かけない場合には −50°C でも既に凍結像に対応した亀裂ができ始め，乾燥度が進むほど亀裂は大きくなった。カバーをかけた場合には，−20°C より低い温度では亀裂はできないが，それより温度が高くなるとそれぞれの温度に相応して違った形の亀裂ができた。

試料濃度が低いか，冷却速度が小さい場合にみられる比較的大きな氷晶のものでは亀裂はできにくかった。

このように種々の条件のもとで検討した結果，亀裂の生成は，要するに試料の乾燥にもとづく収縮によるものであろうが，その形態は主として試料の凍結状態により，また亀裂の程度は乾燥度に左右されるものと思われた。

## 文　献

1) 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.

2) Nei, T. 1964 Formation of cracks in the freezing and freeze-drying of some biological preparations. *Biodynamica*, **9**, 247–255.

3) 根井外喜男・浅田　実 1965 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．低温科学，生物篇，**23**, 173–178.

4) Nei, T. 1965 Formation of cracks in the freeze-drying of albumin solutions. *Biodynamica*, **9**, 277–282.
5) 根井外喜男・岡田次郎 1967 低温顕微鏡の試作. 低温科学, 生物篇, **25**, 149–153.
6) Luyet, B. and Rapatz, G. 1958 Patterns of ice formation in some aqueous solutions. *Biodynamica*, **8**, 1–68.
7) 根井外喜男 1965 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. 低温科学, 生物篇, **22**, 149–156, 157–162, 163–172.
8) Luyet, B. 1960 On various phase transitions occurring in aqueous solutions at low temperatures. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **85**, 549–569.
9) 根井外喜男・荒木 忠・僧都 博・小島義夫 1965 凍結乾燥に於ける乾燥の機構 XII. 二次乾燥に於ける大腸菌の脱水と細胞活性について. 低温科学, 生物篇, **23**, 77–83.

## Summary

An investigation on the mechanism of crack formation in the freeze-drying process of ovalbumin solutions was made mainly from a morphological point of view using a specially designed cryomicroscope.

A distinct difference in morphological changes between covered and non-covered specimens was found, *i.e.* no cracks was formed in the covered specimens dried at temperatures below −20°C, above which characteristic cracks appeared in correspondence with temperatures, while cracks were formed in non-covered specimens by drying even at −50°C and widened by the elevation of temperature up to −20°C.

In the specimens composed of large hexagonal ice columns, numerous crevises corresponding to the original freezing patterns were left after drying instead of cracks.

From the results obtained, some discussions were attempted on the mechanism of crack formation.