凍結乾燥に関する基礎的研究

乾燥過程の分析 (I)

佐 原 幸 雄

九州大学医学部細菌学教室 (主任 戸田教授)

[受付: 5 月 9 日 1953 年]

I. 緒 言

BCG 乾燥ワクチンを比較, 研究するに当つて, 現在一般に行われている条件の記述は, 極めて煩雑であるばかりでなく, 具体的に乾燥の過程を描き出すのに不十分である。乾燥時間, 到達真空度, 真空度の追跡等々の記述は, 確かに, 乾燥過程を知る一つの手段とはなり得る。然し, 乾燥過程を明らかにするのに, これら二三の条件では, 必要にして充分であるとは云い難い。最近, 試料の温度追跡も行われてきた。これも時間による推移を記録するだけに止まれば, 実際の, アンプレ中に行われている乾燥の状態を映し出さないことに於ては, 前述の条件記述と差異はないと考えられる。

若し, 条件を統一出来て, 一つの曲線で, しかも, 乾燥状態を具体的に表現することが可能となれば, BCG の乾燥に関する研究は容易となり, 生残率の比較研究に着実な前進がもたらされることが考えられる。

このためには, 凍結乾燥そのものの機構を解明して行くことが, 何ものにもまして重要な先決問題である。

一般的な乾燥に於ての, 定型的な乾燥過程は, 乾燥速度—自由含水率の曲線を描くとき, 恒率, 減率乾燥の二過程に分れ, 減率乾燥過程は亦, 第一, 第二段階に分離する。血清等の凍結乾燥機構については, 既に, 二三の報告がある。特に, 内藤²⁾によれば, 凍結乾燥とは, 減率乾燥第一段階のみをとる特殊な乾燥であると報告されている。若し, 内藤の云うことが妥当であるとすれば, BCG の場合にも同様なことが云えていゝであろうし, 単に「内藤係数」(a) によつて乾燥条件を記述出来る筈である。

研究室用乾燥装置を組み, この問題の解明に着手し, BCG の凍結乾燥機構に関して, 二三の知見を得たのでここに報告する。

II. 実験方法

1) 菌液: ソートン培地 2 代, 10 日培養菌を滅菌漏斗上に集め, 濾紙 40 枚の間にはさみ, 吸湿する等々は大凡慣例 (第 8 回日本 BCG 研究協議会, 第 1 次研究課題規定) に従つた。径約 7 mm の水晶球 150 箇入りの 1 l コルペンに, 700~900 mg の脱水菌体を入れ, そのまゝ 4 分回轉後, 0.2 cc の 1% (W/V%) サッカロース溶液を入れ, 2 分回轉し, 0.8 cc を加え, 1 分回轉後 100 mg/cc—1% サッカロース菌液とした。これを 4 本合せて実験に供した。振盪には回轉振盪機 (Ca. 200 r.p.m.) を用いている。

2) 分注: 1 cc メスビペットの先端を切り落し, 摺り合せを行い, 腰椎穿刺用針を取りつけ, 分注誤差を最小限に止める様に工夫して, 1 cc 宛分注した。

3) アンプレ: 真空コック附アンプレを用いた。

4) 予備凍結: 略々水平にして, ドライアイス・エーテル中に 20 秒つけて凍結せしめた。

5) 乾燥: トラップはドライアイス・エーテル管 2 本塩化カルシウム管 1 本である。この実験に於ては, 蒸気圧勾配を出来るだけ小さくする如く設計された 20 本多岐管中の, 1 本を指定して使用した。真空度を重ね合せ極端にずれる場合は, そのアンプレを捨てた。

6) 脱水量測定: 任意時間乾燥後のアンプレ重量を秤量して, 分注時のアンプレ重量からの差を求めて測定した。この場合アンプレ中の空気重量を, 予め測定して補正を行つた。

III. 実験成績

A) アンプレ中の試料の表面積, その他

SAHARA, Yukio: Basic studies on drying by sublimation, analysis of drying process (I). Department of Bacteriology, Medical Faculty of Kyushu University. —Jap. J. of Bact., 8(5): 611-615, 1953.

アンプルが完全な球と円筒から成っていると仮定して、近似計算を行つた結果は次の通りである。

表面積 $Se: 3.9 \text{ (cm}^2\text{)}$, 側面積 $Ss: 5.0 \text{ (cm}^2\text{)}$

試料の体積を $V \text{ cm}^3$ として, Flosdorf & Mudd³⁾ の提唱した $\frac{Ss}{Se}$, $\frac{Se}{V}$ を計算して見ると, 次のようである

$$\frac{Ss}{Se}=1.3, \quad \frac{Se}{V}=3.9$$

B) 分注誤差及びアンプル内空気重量

第1図は分注試料重量及びアンプル内空気重量の動揺の一例を示した。

第 1 図

サンプル重量 (—○—○—) : 比較的均一なもののみを実験に用い, (---×---) で示される如きアンプルは捨てた。従つて $1021 \pm 0.6 \text{ mg}$ となり, mg まで取れば, 実験に用いたアンプルは同等に見做してよい。

空気重量 (—×—×—) : 理想気体と見做し, アンプル容積を 8.5 cc とすれば, アンプル中の空気重量は次式

$$\text{で計算される。} \quad w = V \cdot \frac{0.001293}{1 + 0.00367t} \cdot \frac{H}{760} \text{ (g)}^{4)}$$

こゝに, V : 容積 (8.5 cc), t : 室温 (12°C)

H : 大気圧 (766.8 mm Hg)

よつて, $w = 10.6 \text{ mmg}$

測定には対照として, $1/100 \sim 2/100 \text{ mmHg}$ の真空度のアンプルを用いれば, 上式から w は mg 以下で押えられて, この実験には安全であつた。

測定値は $11 \pm 0.6 \text{ mg}$ でよく上の計算値に合う。

C) 真空度

第2図は油拡散ポンプー段の場合。第3図はロータリーポンプ (排気速度 400 l/min) のみを使用した場合の, 時間による真空度の変化を辿つたものである。実験は, この真空度の動揺内に於て, 乾燥条件を一定したと云うことが出来よう。

実験は第2図及び, 第3図に示された如き真空度に於て, 乾燥過程の分析を試みたので, 便宜上, 前者をA実験, 後者をB実験と名付け, 曲線A, 曲線Bと呼ぶことにする。

第 2 図

第 3 図

D) 脱水量と乾燥時間

先ず, 乾燥時間の経過と共に, アンプルより蒸発する水量の変化を描いた。第4図が之である。

第 4 図

図から明らかなように, 真空度が一桁違う A, B は乾燥の過程に相当のずれがあり, 3時間後には, 大凡・両曲線とも 960 mg の値に近づき, 脱水量 = 960 mg の漸近線をもつようである。従つて, この 960 mg を乾燥し得る自由水の⁵⁾全量として, 以後の分析を進める。こゝに注目すべきことは, A, B 曲線とも, 直線部分と曲線部分とから成っていることである。

E) 残水率と乾燥時間

試料の全自由水を Wg , 任意時間乾燥後の試料の自由水を yg とすれば, 内藤⁶⁾の y/W で以つて乾燥度を定義し, 之を残水率と呼んでいる。この方法は, BCG の場

合にも好都合である上に,

$$y/W = y/G_0 / W/G_0$$

と, 完全に乾燥されたと考えられる標準の値 G_0 で, 分母, 分子を割れば, W/G_0 がその乾燥条件について常数となるから, $y/W \propto y/G_0$. 即ち, 所謂残水率は自由含水率⁷⁾に比例するものであることが判る。

第5図は, 残水率—乾燥時間をプロットしたもので, 第4図から求められた。

第5図

内藤は乾燥の進行式として, 若月, 野口等協同研究者と共に, 次式を提案し, 実験的に確認したと報告している。

$$y/W = e^{-a\theta}$$

ここに, θ : 時間, a : 内藤係数

曲線A及びBに近いもので, 上式で與えられる内藤の曲線を, $a=2.20$, $a=1.51$ として描いて見た。A及びB曲線は, 指数曲線に乗らない。

F) 乾燥速度と乾燥時間

第4図のA, B両曲線上で微分を行つて見た。BCG等の凍結乾燥の場合に於ては, 一般に多孔質となり, 蒸発表面積は嚴密には規定出来ないから, 止むを得ず, 化学工学方面の慣例⁹⁾に従い, 単位時間に自由水の何%がとび出るか, 即ち, %/hr で以つて乾燥速度を定義して見たのである。第6図が之である。

第6図

内藤の式, $y = We^{-a\theta}$ の両辺を θ で微分すれば,

$$\frac{dy}{d\theta} = -aWe^{-a\theta}$$

$$\therefore -\frac{dy}{Wd\theta} = ae^{-a\theta}$$

これから, $a=2.20$, $a=1.51$ の場合が求められた。

時間の経過と共に, 乾燥速度の変化は三様式に分れ, 過程は従つて三段階に分類出来るのではないかと考えられた。これに反し, 内藤の式は單調な曲線である。

G) 乾燥速度と残水率

第5図と第6図を組合して, 第7図が得られた。之が乾燥速度曲線¹⁰⁾と云われるものに相当して, 一般乾燥の場合と比較出来る曲線である。

前述の実験条件の下に於て, 乾燥過程に臨界点 P_A 及び P_B が存在して, 恒率乾燥過程と減率乾燥過程に明らかに分離出来るようである。試みに, 内藤の式の微分形を書き直すと,

$$-\frac{dy}{Wd\theta} = a \frac{y}{W}$$

となり, 乾燥速度は残水率に比例し, 比例常数が a となる。これから, $a=2.20$, $a=1.51$ の場合を描けば, 図の如く, 原点を通る直線となり, 今回の成績と内藤の実験との間には, 本質的な相違があるようである。

第7図

IV. 吟 味

凍結乾燥機構に関しては, 今日迄, 殆んど見るべき研究もないのが現状であるが, 僅かに, Greaves¹¹⁾, 内藤根井¹²⁾等の血清の乾燥についての解析が, 比較的定量的な意味をもっている。根井は, Greaves が試みた試料温度の追跡¹²⁾を行つているが, Greaves が熱計算から乾燥機構の解明に進んだ方向とは別に, 独得な装置¹²⁾で, 内藤の追試を試み, 内藤の報告を妥当なものとして結んでいる。

Greaves は熱から解析を試みたのであつたが, 結果は満足すべきものではないようで, 熱の漏洩を如何にして

防ぐか否問題であると思う。

一方内藤は、組織的研究を行い、乾燥過程の分析を試み、大量生産化を目的として、血清学領域の應用面で劃期的な業績を残している。然しながら、その解析的方法その結果の吟味に於ては、尙お議論すべき点があるように考えられる。粘土、木材等の一般乾燥に於ては、一般に、恒率乾燥、減率乾燥第一、第二段階の三つの段階が知られ、物質と条件によつては第一段階が直線の場合、曲線の場合、或いは全く欠く場合さえも起り得るのである。石鹼¹³⁾の場合は、恒率、減率第一段階を共に欠き、減率第二段階のみをとる。これに対比してか、内藤は、凍結乾燥とは減率第一段階（而も直線）²⁾のみをとる独特な機構をもつ乾燥であるとするのである。従つて、之を積分することにより、内藤の式 $y = We^{-at}$ を導き得たのである。本実験の条件の下では、第7図の如く、凍結乾燥機構には、明らかに臨界点 P_A , P_B が存在し、恒率乾燥、減率乾燥一、二段階が現われ、形の上では一般の乾燥と何等異つた所はないようであつて、内藤との相違は、“BCGの如き菌体を試料として用いたためではないか”と云う疑いが起る。

第7図の $a=2.20$, $a=1.51$ の直線は、遙か下方にある。内藤の報告によれば、 a の値は小さく、一つの例として、 $a=0.29$ ²⁾ 程度のものであり、上の a の値は、第5図に得られた曲線に出来るだけ形を似せた場合に、逆算して求められたものであつた。今、 $a=0.29$ の直線を描いて見ると、横軸に極めて接近してくる。これは極端に乾燥速度の遅いことを意味する。この場合の内藤の実験条件は、 $1/10 \sim 2/10$ mm Hg 程度の低真空である上に、20 cc の血清を用い、24 hr 乾燥している。

第7図から明らかなように、真空度が落ちると、水平な恒率乾燥過程は短くなり、位置が平行移動して、速度の低い方向へ落ち、減率乾燥第二段階は短くなつてくる傾向がうかがわれ、それにつれて減率乾燥第一段階は延びると同時に直線に近づくものゝようである。一般に乾燥速度を低下させる原因一例えば、試料の体積の増大、又は表面積の減少等一が現われる場合。上述の傾向を辿り、遂には、恒率乾燥、減率乾燥第二段階の二つは、高次の微量となつて、而も減率乾燥第一段階は延びて直線に近づくであろうと、解釈を拡張しても誤りは大きくはないであろう。乾燥条件がこの場合、大きい要因をなし、試料の相違は凍結乾燥機構に本質的な差異をもたらす第一義的な要素とはならないと考える。このように考えると、直線的に速度の減少する内藤の式の意味するものが

乾燥速度の極めて低い条件下の乾燥であり、BCG の大量生産に當つては、乾燥過程が内藤の直線に近づくことが予想され、内藤係数 a の吟味⁶⁾ が必要となるであろう。従つて、研究室の小規模乾燥と、大量生産用多岐管装置での乾燥とでは、その過程に大きな相違があり、後者に於ては又、收容箱式装置での乾燥を或る程度推測させて興味深いと考える。乾燥過程の分析的研究は乾燥一生残率の問題を解明しうる直接的な方法であると思う。

乾燥速度を記述する際に、乾燥速度—残水率の曲線を描くことが、一つには条件を統一し、一つには乾燥過程を具体的に、且つ忠実に表現するものであることは云うまでもない。

若し、更に、試料の温度追跡を加うるならば、予備凍結、試料の加温のための影響を知るのみならず、上記速度曲線との相関が知られ、このために温度測定の意味が積極的となるであろう。

本実験で見られた如き三段階を経て、BCG の凍結乾燥が行われるならば、三段階をとる機構そのものは、どのように解釈されるであろうか。この点は極めて困難であり、現在の所、一應上述の実験事実から次のような考察を加えて見た。

第7図A曲線には恒率乾燥があるが、この間は蒸発表面積が一定と考えられる。而も、約77%の自由水が蒸発していることから、一般固体の恒率乾燥に於ては表面蒸発が主要素¹⁴⁾であり、表面積には変化がないと云う説明は直ちに適用し難い。若し、菌液中で菌が均等な分布をしていたと仮定し、菌液の表面に平行な断面について見れば、菌以外の平面の面積は略々同一となるであろう。恒率乾燥では、菌の周囲に水の塊を残し、試料が次第に多孔質となるために殆んど抵抗をうけず、容器の底に至るまで水が昇華すると考えられる。この間、菌の周囲に存在する水は、菌に束縛されて蒸発を妨げられ、恒率乾燥期間が終つて後、はじめて昇華を開始する。次に減率第一段階では、菌の極く近傍までの水を昇華し、最後、第二段階では、この菌の極く近傍、或いは菌膜、菌体内の水が蒸発するのであらうと考えられる。乾燥速度を弱める原因がある場合、恒率乾燥のとき、菌の周囲に比較的大きい水の塊を残して乾燥するものであらうと推察すれば、恒率乾燥が縮み、減率第一段階が延びる理由が判り、減率第二段階の縮む原因が、菌体内水分の内部拡散と乾燥条件との相関関係にあるとすれば、一應系統的な意味づけが出来る。然るに、Sherwood¹⁴⁾ は、固体乾燥の第一段階は表面積の変化が特徴的なものであつ

て、水は内部から拡散し、表面で蒸発するもので、第三段階は内部から直接に水が蒸発するのであると説明している。これは、前述の解釈と根本的に異っている。(菌体内の微視的乾燥機構を除いて) 巨視的に眺むれば、試料が海綿状多孔質となつて行くために、水の拡散途中の抵抗は殆んど受けず、直接に自由な昇華が行われ、所謂液状拡散は考えられないとするためである。

以上の乾燥機構の解釈は、本実験より得た一考察であつて、本問題については更に分析を進める計画である。

V. 結 論

1) BCG の凍結乾燥過程には、臨界点が存在し、過程は三段階に分れるもののようである。

2) 真空度の桁が落ちると、恒率乾燥過程は、乾燥速度の低い方向に平行移動して落ち、この長さは短くなる。減率第二段階は縮み、第一段階は延びて直線に近づいて行く傾向がある。

3) 乾燥条件に、乾燥速度—残水率の曲線を描けば、具体的に乾燥状態を映し出し、且つ多くの煩雑な条件を統一出来る。

終りに臨み、御校閲、御助言を賜つた戸田教授、武谷助教授、並びに西海枝教授 (九大、医、薬)、篠原助教授 (九大、工、應化) に深謝する。

(本研究は、日本 BCG 接種研究協議会研究費、文部省科学研究費 (総合研究結核研究委員会) によつたものである)。

文 献

- 1) Perry, J. H.: Chemical Engineers' Handbook, 802-807, 1950. (McGraw-Hill Book Company, N. Y.)
- 2) 内藤良一: 陸軍軍医学校防疫報告, 715: 21, 昭 18
- 3) Flosdorf, E. W. & Mudd, S.: J. Imm. 34: 569: 1938.
- 4) 藤本英二雄, 佐原幸雄: 福岡医学雑誌, 42: 15, 昭 26.
- 5) 内田俊一, 亀井三郎, 八田四郎次: 化学工学, 482 昭 22 (丸善)
- 6) 内藤良一: 陸軍軍医学校防疫報告, 715: 104-105, 昭 18.
- 7) Perry, J. H.: Chemical Engineers' Handbook, 800, 1950. (McGraw-Hill Book Company, N. Y.)
- 8) 内藤良一: 陸軍軍医学校防疫報告, 715: 101, 昭 18
- 9) 亀井三郎: 化学機械技術, 13-15, 昭 24 (工業通信)
- 10) 葛岡常雄: 化学工学実験法, 180, 昭 25 (丸善)
- 11) Greaves, R. I. N. & Adair, M. E.: J. Hyg. 36: 507, 1936.
- 12) 根井外喜男, 田村浩一: 北海道医学雑誌, 25: 1~6, 昭 25
- 13) 亀井三郎, 水野成二, 塩見四郎: 工学化学雑誌, 38: 1079, 昭 10
- 14) Sherwood, T. K.: Ind. Eng. Chem. 21: 976, 1929.