ワクチンの真空冷凍乾燥

太田 勇 夫

Vacuum Freeze Drying of Vactin

Isao Oota

生物学的材料の真空冷凍乾燥が 1909 年に, *Shackell* によつて行われた。*Pasteur* も *rabies virus* を凍結状態から乾燥してその性質の優れていることを認めたが、1930 年代も終り頃、不幸な第二次世界戦争の途中、乾燥血漿やペニンリンに対する巨大な需要を最大の刺激として、広い普及と速かな技術的完成へと向い始めた。乾燥方式の確立は略 1940 年代には一つの頂点を形成した。それらの結果は、*Flasdorff, E. W.* の本¹⁴⁾の中にまとめられている。

とはいえ、充分満足すべき乾燥の技術も、乾燥の判別基準もあるいは、また生物体に及ぼす乾燥の影響の機構も、よく知られていないといわねばならないであろう。これらの状況をワクチンの乾燥について報告したい。

§ 1. 乾燥ワクチンの効果

乾燥ワクチンが出来て、容易に保存、運送出来るようになって、どんな辺ぴな田舎でも容易にワクチン接種が出来るようになった。日本に於ける BCG の広汎な使用もこれによつて可能になったことはよく知られている。広汎な普及と共に質の向上もまたますます不可欠なものとなる。BCG についてはその有効寿命の延長のための真剣な最初の企てはソ連で行われた。(1937)。 *Leschinskaya*²³⁾の方法はフランスのパスツール研究所でも採用して、アフリカやフィリピンなどにまで BCG を供給している。⁴²⁾

ソ連におけるインフルエンザ・ワクチンの普及も真空冷凍乾燥の

(42)

結果である。Dubakina など⁴³⁾ はスターリングラド市における 1952 年の成績をとりまとめて、感染率が非接種者で 5% (11 区についての平均、各區別には 2.2 ~ 1.2%) 接種者で 2.6% (區別では 1.6 ~ 5%) となったことを報告している。

しかしながら、乾燥ワクチンの効果は今もなお疑われている状態である。例えば、BCG ではその *allergenic potency* は主として生残菌によるのであるが^{5), 11)} 真空冷凍乾燥による生残率の報告は極めて区々で *van Deijne*^{39), 40), 41)} のように殆ど 100% というものから、*Kaiser*²²⁾ のように生残を認めないものまである。ある人々は乾燥したものも新鮮な BCG と全く同様だと語り、^{30), 38), 39)} 他の人々はツベルクリン反応が減ること、また感染に対する予防効果の低下を認めている^{4), 5)}。これらの報告は乾燥ワクチン製造、保存の各段階にわたって、細胞の生残率に注目すべきことを示している。考察すべき要因は大体次のようなものである。乾燥材料の性質、懸吊媒体の種類、性質、予備凍結や乾燥過程の諸条件、乾燥製品の水率および貯蔵条件など。(以下特に断らないときは BCG についてのものである)

§ 2. 媒体

Zeschinskaya の試み以来 BCG ワクチンの寿命延長の試みの主な傾向は適当な媒体を使うことであつた。*glucose*^{4), 23), 39), 42)} *starch*²³⁾ *lactose*^{11), 23), 25), 29)} *gelatin*^{22), 37)} 変性ゼラチン²²⁾ 血清^{7), 37)} *sucrose*, アラビア・ゴム²³⁾ ヲフトン溶液¹¹⁾, *sodium ammonium peptate* およびグルタミン酸, マロン酸, ニハク酸, *Tweenalbumin*²⁶⁾ などが試みられ、特に Miller と Goodner²⁴⁾ は 62 種の媒体について実験を試みた。混合液については、Miller-Goodner (後述参照) のほか、*Rosenthal*³¹⁾ が *lactose*, *asparagin*, 緩衝塩と *glycerine* の混合液で良い結果を得た。

乾燥したワクチンを 0.9% *saline* によつて再生し、Youman 媒質で生えて来る最も稀な濃度を以て適定度とした。以下では生育適定度といおう。Miller-Goodner は 10 種の菌株から BC

G. フクチンを造り、各媒体について夫々生育適定度の負の対数を決定し、その乾燥前後の差を 10 種について合計したものを効率指数として、表 1 を得た。この指数の小さいものほど乾燥によって有効性の減少が小さいのである。この表から特に有用なものとして *galactose d*, *glucose*, *sucrose*, *lactose* の 4 種の炭化水素と *sodium glutamate*, *sodium asparate* の 2 種のアミノ酸塩とが選出される。

Table 1.

媒 体	最終濃度	効率指数
炭水化物		
<i>Manitol d</i>	5	38
<i>Fructose</i>	5	28
<i>Mannose d</i>	5	31
<i>Galactose d</i>	5	23
<i>Xylose l</i>	5	35
<i>Inulin</i>	5	33
<i>Dextrin</i>	5	30
<i>Raffinose</i>	5	41
<i>Dulcitol</i>	1	44
<i>Salicin</i>	1	29
<i>Inositol</i>	1	37
<i>Sorbitol d</i>	1	47
<i>Adonitol</i>	1	48
<i>Starch soluble</i>	0.5	50
<i>Xylose d</i>	1	38
<i>Maltose</i>	5	34
<i>Glucose</i>	5	14
<i>Sacrose</i>	5	22
<i>Lactose</i>	5	15

(50)

有機酸

Succinic acid	0.5	45
p-amino benzoic acid	0.15	40
Adipic acid	0.5	47
Malonic acid	0.5	43
Glutaric acid	0.5	34
Ascorbic acid	0.5	50
Sodium citrate	5	42
Azelais acid	0.1	50
Valeric acid	0.5	43
Pimelic acid	0.5	48
Gluconic acid	0.5	37
Nicotinic acid	0.5	42

アミノ酸及びアミノ酸塩

Tyrosine	0.5	49
Cystine	0.5	47
Histidine	0.5	47
Sodium glutamate	1	16
Alanine	0.5	33
Glutamic acid	0.5	50
Arginine	0.5	50
Asparagin	0.5	31
Lysine	0.5	43
Aspartic acid	0.5	47
Sodium aspartate	1	22
Glycine	0.5	42

蛋白質

Trypticase	56

Amigen	5	52
Neopeptone	0.5	44
Mucin	0.5	53
Gelatin	0.5	50

Ⅱ 4

Arabic	0.25	30
Tragacanth	0.25	34
Ghatti	0.25	36

雑

Brain heart infusion	1.85	46
Creatinine	0.5	51
肝臓エキス	1	58
Guanidine sulphate	0.5	51
蒸溜水	-----	50
Saline	0.85	42
Sulfathiazole	0.5	52
Kaolin	1	41
馬の血清	5	30
Charcoal	5	53
Urea	0.5	50

なお Fry-Greaves⁽¹⁷⁾ は broth 又は nutrient gelatin を添加すると, broth を含まない媒体 (例えば, ヘモグロビン, アルブミン, アカシア・ゴム) よりもよい生菌残存率が長期間保たれることを見出した。nutrient broth に 5~10% glucose を加えると, 夫々単独の場合より生残率が高い。他の種の糖でも同様な効果が得られるという。

インフルエンザ・ワクチンについては次の2表を掲げよう。³⁶⁾

(52)

カ2表. インフルエンザ・ウイルス乾燥における媒体の影響

実験番号	媒 体	感 染 力 価 LD_{50}^*	
		starting allantoic culture	乾 燥 後
1	ゼラチン	10^{-8}	10^{-3}
	蔗糖+ゼラチン		$10^{-3.5}$
	蔗糖+ゼラチン+寒天		$10^{-3.5}$
	卵 白		$10^{-3.5}$
	蔗糖+卵白		10^{-3}
	牛 乳		$10^{-3.5}$
	蔗糖+牛乳		$10^{-2.5}$
	卵黄		10^{-5}
	蔗糖+卵黄		$10^{-2.5}$
2	<i>allantoic liquid</i>	$10^{-6.5}$	10^{-3}
	蔗糖+ゼラチン		10^{-4}
	卵 黄		$10^{-4.5}$
	蔗糖+卵黄		$10^{-5.5}$
3	<i>allantoic liquid</i>	10^{-8}	$10^{-4.5}$
	卵 黄		$10^{-5.5}$
	蔗糖+卵黄		$10^{-2.5}$

* LD_{50} (lethal death) 半数致死量

この表から保護媒体がないと、乾燥によつて大量のウイルスが死滅することが判る。卵黄と蔗糖とで良好な結果が得られるが、この点についてはカ3表が明かな概念を与える。

BCGの場合にはこれらの媒体をどのような濃度で用いればよい。炭水化物では“泡立ち”易いこと。高濃度において残存率が低くなること。⁶⁾ が報告されていたが、Miller-Gordner は glucose の最終濃度 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 15, 20, 25% について実験して、低濃度(0.25, 0.5%)を除いては結果に甲乙のないことを見出した。之に反して 0.05, 0.1, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2.5,

表3 底糖と卵黄の乾燥における影響

媒 体	%		乾燥後の LD_{50}
	底 糖	卵 黄	
<i>allantoic liquid</i>	—	—	10^{-2}
底 糖	5	—	10^{-3}
	10	—	$10^{-3.5}$
	20	—	$10^{-3.5}$
	—	5	10^{-3}
卵 黄	—	10	$10^{-4.5}$
	—	20	$10^{-4.5}$
	—	—	$10^{-4.5}$
底糖 + 卵黄	5	5	$10^{-5.5}$
	10	5	10^{-6}
	20	5	$10^{-5.5}$
	10	10	$10^{-6.5}$
	20	10	$10^{-6.5}$
	30	10	$10^{-6.5}$
	10	10	10^{-6}
	10	20	10^{-6}
	10	10	$10^{-5.5}$
	10	20	10^{-6}

註 乾燥前の *allantoic culture* の $LD_{50} = 10^{-6.5}$

5%濃度の *sodium glutamate* についての実験は、0.1乃至0.25%が良好で高濃度は不利であつた。²⁴⁾

なお *Miller* 等は水素イオン濃度の影響をも調べているが、その結果によれば中性が最もよい。表4表参照。

媒体のこのような強い作用は何によるのであろうか。

*Fry-Greaves*¹⁷⁾ は自己の実験におこる *glucose* の好影響を *glucose* による一定量の湿気保持に帰することが出来るものと考え、彼等の実験は、生残率が良好なるためには最小限の水分を必要

(54)

表 4

番号	pH	乾燥直後から		4℃に8週間保存してから		38℃に8週間保存してから	
		3 週	5 週	3 週	5 週	3 週	5 週
1	4.48	2	3	1	2	no	1
2	5.08	2	3	2	2	no	1
3	5.59	2	3	2	3	1	1
4	6.11	3	4	2	3	1	2
5	6.50	3	5	3	5	2	2
6	7.05	3	7	2	6	3	5
7	8.42	3	6	3	5	1	1
8	7.12	2	3	2	3	1	1
9	8.56	2	3	2	2	no	1
cont'd	7.05	5	9				

とすることを示すものであつて、實際上の困難な点は適当量の水分を決定することだけだと結論している。

Miller-Goodner²⁴⁾ は普通考えられている説明として物理的説明と生理学的説明を引用している。

物理的説明としては、**第一**、媒体は細胞内に氷の結晶の生成するのを防ぐこと、**第二**、媒体は細胞壁に附着し、細胞を非透過性にすること。**第三**、媒体は細胞を締め、このため再生に際して細胞は原形質分離を起さないこと、が挙げられる。

生理学的説明としては、**第一**、媒体は細胞に参み入り、何らかの理由で、代謝活動を抑圧すること。**第二**、細胞の物質代謝に保護的作用を及ぼすこと、が挙げられる。

このような普通の思い付きに対して、物理的に細胞を非透過膜で囲む作用は疑問であるとし、生理的な説明については、生理的活性であるものが必ずしも良好な影響を及ぼさないこと、特に良好な媒体たる *lactose* が *micobacteria* の代謝に何の役割も演じないこと。また *sodium glutamate* が生体の代謝活動に役立つていない実験

事実, などを反論として提出している。

佐藤³⁴⁾はコロイド化学的研究の必要を指摘した。ついでながら根井²²⁾は酵母の凍結過程を調べて細胞凍結が起ると大部分死滅することを示している。

§ 3. 予備凍結

良好な生残率を得たと主張している Van Deïnse などが, きびしい予備凍結を行っていることは注目に値するであろう。彼は 50% glucose を用い, アンプルを液体窒素で急冷し, 蜂窠状の胞に区画した金属筒 (-50°C) に入れ, この金属筒を -70°C のオートクレーク (これはコンデンサーとして役立つ) の中に入れている。⁴²⁾

インフルエンザ・ワクチン³⁶⁾についての結果でも -20°C や -78°C に比して -180°C という予備凍結が良好である。

第 5 表 予備凍結温度のインフルエンザ・ウイルスの死滅におよぼす影響 (数字は LD_{50})

乾燥前	種々の予備凍結温度における乾燥度		
	-20°C	-78°C	-180°C
$10^{-2.5}$	$10^{-6.5}$	$10^{-6.5}$	$10^{-2.5}$
10^{-8}	10^{-7}	$10^{-2.5}$	10^{-8}
$10^{-2.7}$	$10^{-6.5}$	$10^{-6.7}$	$10^{-2.5}$

Sokolov の研究によると乾燥の種々の段階におけるインフルエンザ・ウイルスの死滅を調べると, ウイルス死滅は凍結の際に起るのであって, 乾燥中に起るのではない。

この点については Luyet⁴⁴⁾の研究が興味がある。Luyet は各種の細胞, 組織および微生物の急冷に際しての生残率を調べた。彼の結果は, a) 高い凍結速度の必要なこと, b) 元に戻すのも高速なること, c) 含水量の初期の減少の影響が大きいこと e) ごく低い温度も一度達せられてしまえば無害なこと, を示している。

之に対して龐大な Miller などの研究でも, 予備凍結には大きな関心が払われていない。彼等はドライアイスと acetone とを用いてい

(56)

る。

Hutton 等¹⁹⁾は *Brucella abortus* の凍結乾燥における生残率を調べたが、乾燥前温度の影響を次のように表示している。

表 6

乾燥前温度	試料番号	生残細胞%
-10°C	1	1.1
	2	1.3
	3	13.0
	4	10.0
-15°C	1	6.1
	2	7.9
	3	51.0
	4	57.0
-20°C	1	79.0
	2	55.0
	3	86.0
	4	59.0
-25°C	1	44.0
	2	55.0
	3	59.0
	4	62.0

こゝで生残率の比較的低いのは予備凍結温度の高いことに帰すべきでないかどうか考慮を要するであろう。

§4. 乾燥材料の性質

菌株にも種々あるが、その種類による差違は余り著しくないようである。Miller 等の BCG の研究では 9 種の菌株と *vole bacillus* とを使った。こゝでは菌株についての説明は省略して結果だけを引用しよう。

次の表

媒体 \ 菌株	858	425	805	31	823	B59	826	862	186	1707
Galactose d	2	2	1	3	2	3	2	4	1	3
Glucose	1	1	1	2	2	1	1	2	1	2
Sucrose	2	1	3	2	2	3	3	2	3	2
Lactose	1	1	1	2	1	2	2	2	1	2
Sodium glutamate	1	2	3	2	1	1	1	2	1	2
Sodium aspartate	2	1	2	3	2	2	4	1	2	3
Gelatin	5	5	4	6	5	7	4	3	5	6

また *bacteria* の分散度の影響も同じ着者が調べている。*phosphate buffer* の中で BCG を磨りつぶし、一つ一つに分散した菌の率を測った。媒体として *sodium glutamate* を用い、前述の生育適定度を調べた。分散菌の率は夫々 84, 67, 32, 10 であったが分散度の高い程生存率がよい。

また *Santon's medium* で *subculture* を続けると代を重ねるにつれて適定度が悪くなり、8代以後では乾燥ワクチンから菌は生えて来なかった。しかし10代の後に一度 *glycerinated water potato medium* に戻すと、殆ど全く元に戻った。²⁴⁾

Fry-Greaves の *paracolon bacillus* の凍結乾燥実験では媒体に *tryptic digest broth* を用い、*culture* の age の変化の生存率に及ぼす影響が調べられている。次表は *young culture* (4½ 時) と *old culture* (20 時) とを凍結乾燥して夫々 24 時間、13ヶ月、29ヶ月保存した後の菌の生存率%を示すものである。¹⁷⁾

	24 時間	13 ヶ月	29 ヶ月
<i>young culture</i>	3.5	1	1
<i>old culture</i>	15	6	6

§ 5. 乾燥過程の條件

Deinse の BCG の研究では前述のような -70°C のオートクレーブ中に入れて、真空度は 10^{-4}mmHg 、この状態を24時間続けて後に始めて常温にした。之には電気抵抗によつて加熱する。ここで真空を中断し、アンプルをつけた金属筒をオートクレーブから取出し、別のオートクレーブに入れる。再び真空にする。 10^{-4}mmHg 恒し常温で、吸湿剤としては無水硫酸を使った。(Batt²³) はその総合報告の中で含水率を更に一層低めるためには、2次乾燥が望ましいと考えている。2次乾燥は化学薬品を乾燥剤に使うのが普通である)。真空をとめるときには中に入つて行く空気は硫酸で乾かしてからにしたという。

Deinse は高真空による長時間乾燥によつて乾燥がよく行われるものと考えている。乾燥の前後に BCG ワクチンを Löwenstein-Jensen egg medium の表面に植えて、一定時間の後生えて来た colonies の数を数えると殆んど常に同一である。この colonies 計数は 1947 年以來 4 年間毎週 2 回おこなつて来たもので、乾燥によつて生残率が害を受けていないことは確信出来ると主張している。

一方 Birkhang⁴⁾ は Deinse と同一の 50% glucose を媒体として、5% の生残率しか得なかったが、Deinse は之を批判して Birkhang の実験では眞の乾燥が達成されなかったのだといひ、その理由として Birkhang の使用した真空は 0.1mmHg に過ぎないこと、製品が結晶質のフィルムに被われたシロツプ状態であること、(Deinse の製品ではクリーム色の海綿状のものである) を挙げた。

Miller など²⁴⁾ は真空度は 0.015mmHg の水準を保ち、予備凍結をドライアイスとアセトンを用いて行つて後は周囲の大気の対流を放任している。彼らは Deinse の主張する生残率を疑ひ、滴定を行えば違つた結果が出るのではないかと言つてゐる。

Hutton など¹⁹⁾ の実験では、乾燥速度は寧ろ緩い方が良く、恐らく optimal な速度があるのではないかと推測している。

Sokolov のインフルエンザ・ワクチンの実験では真空は $0.1 \sim 0.2 \text{ mm Hg}$, 時間は $24 \sim 36$ 時間である。

乾燥過程の諸条件は未だよく判っていないというべきであろう。この際佐原³³⁾の示した乾燥の型(彼は真空度に依存する臨界点があつて、残水率の大きい所では恒率、臨界点を超えると2段階の減率の乾燥となることを見出した)の問題や、Gersch¹⁸⁾が組織の乾燥について乾燥速度の限界が組織自身の構造によつて与えられることを示したこと(コロイド的な懸吊では、凍結乾燥によつて多孔質海綿状物質が得られるので、水分の昇華に大きな影響を与えないものと考えられているが¹⁴⁾)なども考慮に入れる必要があるだろう。

56. 保存の条件と製品の性質

乾燥過程中の生残率の変化は前節で述べたが、乾燥製品は保存中に如何に変るであろうか。

Miller など²⁴⁾ は貯蔵温度(冷蔵庫と卵卵器との温度)による適定度の変化を追求めて次の結果を得ている(表8表)。彼らは特に炭水化物の媒体が冷蔵庫温度における長期貯蔵を可能にすること、*sodium glutamate*, *sodium aspartate*, *ascorbic acid* が熱に対する抵抗を与えること、に注目して、更に2種の混合物の試験を行つた。低温と高温との夫々の最適濃度の *glucose* と *sodium*

表 8 表 適定度の負の対数の変化

媒 体	乾燥前	乾燥直後	保存期間	3ヶ月		10ヶ月	
			保存温度	4°C	38°C	4°C	38°C
<i>galactose d</i>	6	4		3	3	3	1
<i>glucose</i>	7	6		6	1	5	no
<i>sucrose</i>	7	5		5	2	4	no
<i>lactose</i>	7	5		4	2	4	1
<i>sodium glutamate</i>	6	5		4	4	4	4
<i>sodium aspartate</i>	8	5		5	4	5	5
<i>gelatin</i>	6	1		1	no	no	

(60)

glutamate との混合物を媒体とした。その結果 (カ 9 表) は改良となるものではなかった。

カ 9 表. 適定度の負の対数

媒 体	乾燥 前	乾燥 直後	保存期間 保存温度	3ヶ月		10ヶ月	
				4℃	38℃	40℃	38℃
glucose + sodium glutamate	7	6		3	2	2	1
glucose	6	5		5	1	5	1
sodium glutamate	6	5		5	4	5	4

Hutton など¹⁹⁾ は冷蔵庫の温度で保存した凍結乾燥 *Brucella abortus* は 90 日間に生残率の変化を認めなかったという。

Sokolov はインフルエンザ・ワクチンについて感染力価を次の様に示した。

カ 10 表. 乾燥ワクチンの保存性に対する外界温度の影響

ワクチン 番 号	保 存 温 度	乾 燥 直 後	保 存 期 間 (月)				
			1	3	6	9	14
4	40	$10^{-6.5}$	$10^{-6.5}$	$10^{-6.5}$	$10^{-6.5}$	10^{-6}	10^{-5}
	18-20°	$10^{-6.5}$	10^{-5}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-4}
	37°	10^{-6}	$10^{-4.5}$	$10^{-2.5}$	10^{-1}	—	—
11-20		10^{-7}	—	$10^{-6.5}$	$10^{-6.5}$	10^{-6}	—
11-78	40	$10^{-7.5}$	—	10^{-8}	10^{-7}	10^{-7}	—
11-180		10^{-8}	—	10^{-8}	$10^{-2.5}$	$10^{-7.5}$	10^{-6}
14	40	10^{-7}	—	—	10^{-7}	—	—
	18-20°	10^{-7}	—	—	10^{-7}	—	—
10		10^{-8}	—	—	10^{-7}	—	—
4-M	40	10^{-9}	—	—	10^{-8}	—	—
12		10^{-8}	—	—	10^{-8}	—	—

この結果によれば、4℃での保存では9ヶ月では実際上変化がない。温度の低い程保存性は悪くなる。

Deinse⁴²⁾は常温でのBCG貯蔵で、生残バクテリアのうち1ヶ月後に20%、5ヶ月後に40%が死に、冷蔵庫の中では3~4ヶ月では死なず、6ヶ月で約10%死ぬといっている。

Fry-Greavesの*paracolon bacillus*の研究では24時間乾燥した後に(この時菌のうち50~95%が死んでいた)生残菌数を数え始めた。7.5% *glucose broth*の場合には死滅の大部分は、最初の2時間に起った。以後数ヶ月間は殆ど変化がなかった。5% *albumin*, 5% *aqueous gelatin*及び10% *haemoglobin* (何れも、*glucose*を添加しないもの)では最初の24時間の間絶えず死滅して行つた。特に*haemoglobin*の場合にはそれ以後も経続して死滅して13ヶ月後には無菌となつた。*glucose*添加による好影響が*glucose*の水分保持に帰せられるという著者たちの考えは既に前に引用した。

乾燥直後の短時間に効力が低下し、以後殆ど一定に保たれるという事実は、ワクチンの場合のみでなく、抗菌性物質の場合にも認められる¹⁴⁾が、これは製品の*potency*表示の信頼性を大ならしめることを可能ならしめるものである。

製品の質として重要なのは、乾燥後の含水量である。DeinseのBirkhangに対する批判は既に引用したが、含水量の保存上の重要性は既にFlosdorf¹⁴⁾が詳しく述べているところであるが、Hutton等¹⁹⁾の結果を次に引用しておこう。乾燥した*Brucella Abortus*について次表が得られている。

表 11 表 (数字は生残菌の%)

含水量 \ 常温保存 期間(月)	0	4	10	25	30
5.0	65	< 1	< 1	< 1	< 1
2.5	45	< 1	< 1	< 1	< 1
1.7	46	20	5	< 1	< 1

(62)

0.3	43	27	19	2	2
0.2	46	28	11	2	< 1

生残率についてはこのほかにも考慮に入れるべき要因があるうが、乾燥製品を再びとかす場合には何を使うべきかという問題は未だ考察されていないことを Miller 等は注意している。

なお、日本の乾燥 BCG の生菌数は多いにも拘らず、ツベルクリン陽転は接種者の 50 % 以下であることから、*allergenic potency* の *factor* としては、生残率以外にも考慮に容れねばならないとも指摘している。

乾燥菌の保存性の問題は、結晶に精製し従って凍結乾燥などの要のないペニシリンのような抗菌性物質についても、収量のよい菌株を保存するため（何代も培養を続けると変性する危険がある）に重要な意義をもっている。

引用文献

1. ARONSON, J. D. *Am. J. Publ. Health* 1950, 40, 533
2. BATT, E. G. *World Refrig* 1951, 2, 562
3. BIRKHEAD, K. *Am. Rev. Tuberc.* 1949, 59, 567
4. " *Am. J. Publ. Health* 1950, 40, 545
5. " *Am. Rev. Tuberc.* 1951, 63, 85
6. BRETEY, J. *C. rend. Soc. biol.* 1940, 134, 324
7. Bøe, J & GREAVES, R. I. N. *Acta tuberc scand* 1950, 24, 38
8. COLLIER, L. N. *in Freezing and Drying* (1951)
9. DANBNEY, R. " " "
10. DREA, W. F. *J. Bact. Balt* 1942, 44, 149
11. EBINA, T. KATO, K. KOBAYASHI, T & SAKURAI *Sc. Rep. Tohoku Univ. series C.* 1949, 1, 1

12. ELBER, W. J. THOMAS R. A. & STEFFEN, G. I.
J. Immunol. 1935, 28, 433
13. FESSNER, F. Am. Rev. Tuberc 1951, 63, 714
14. FLOSDORF, E. W. Freeze-Drying (1949)
15. FLOSDORF, HULL, MUDD J. Immunol. 1945, 50, 21
16. FRY, R. M. in Freezing and Drying (1951)
17. FRY, R. M. & GREAVES, R. I. N
J. Hygiene 1951, 49, 220
18. GERSH, I. in Freezing and Drying (1951)
19. HUTTON, R. S., HILMOE, R. J. ROBERTS J. L.
J. Bacter. 1951, 61, 309
20. JACOX, R. F. & MEADE, G. M. Am. J. Tuberc. 1949, 60, 541
21. JENSEN K. A. Acta Tuberc Scand. 1946, 20, 1
22. KAISER Premier Congrès Intern, BCG Inst. Pasteur
1948, pp 39-40
23. LESCHINSKAYA, E. N. Am. Rev. Soviet Med. 1941, 3, 210
24. MILLER, R. JR & GOODNER K. Yale J. Biol. Med 1953, 25, 262
25. NORTH, E. A. M. J. Australia 1950, 5, 171
26. NORTH, E. A. & NEWMANN, W. C.
Tubercle 1951, 32, 251
27. 根井外喜男 科学 1951, 21, 94
28. PROOM, H. in Freezing and Drying (1951)
29. ROSENTHAL, S. R. Premier Congrès -- 1948 pp 40-43
30. " Am. Rev. Tuberc 1952, 65, 641
31. " Acta tuberc scand. 1952, 26, 106
32. " Ann Inst Pasteur 1948, 25, 209, 497
33. 佐原幸男 日本細菌学雑誌 1953, 8, 155
34. 佐藤和男 未刊
35. SMITHBURN, K. C. & LAVIN, G. I.
Am. Rev. Tuberc. 1939, 39, 782

(64)

36. SOKOLOV, M. I. J. Microb. Epid. Immun. 1953, No. 10 57
37. UNGAR, J. & MUGGLSTON, P, Premier Congrès-- 1948, pp 49-50
38. UNGAR J. Tubercle. 1949, 30, 2
39. VAN DEINSE, F. & SENECHAL, F. Premier Congrès--1948, pp 34-36.
40. " " Tubercle 1950 31 157
41. VAN DEINSE Bull World Health Org, 1950, 2, 347
42. " Am. J. Pub. Health 1951, 41, 1209
43. DUBAKINA, A. B., SUTIN, I. A & VULFOVICH, B. S. J. Microb. Epid. Immun, 1953, No. 10, 63
44. LUYET, B. J. in Freezing and Drying (1951)