微生物の凍結乾燥

森 地 敏 樹*

(昭和46年6月2日受理)

Freeze-Drying of Microorganisms

Toshiki MORICHI

(Natl. Inst. Animal Ind., 959, Aoba-cho, Chiba-shi)

(Received Jun. 2, 1971)

1. はじめに

微生物の研究は、広く生物学の進歩に貢献する。そして各種の微生物は、社会的、経済的にも有意義に利用される。したがって微生物菌株を保存する事業は、人類共通の財産を管理する意味で、国際的にも重視されている。

微生物に限らず、一般に生物細胞は多量の水を含んでいるが、これらの細胞を長期間安定に保存するためには水の働きを押えなければならない。その手段としては古賀¹⁾が指摘したごとく、(1)温度を下げる、(2)晶析させる、(3)その他の方法で蒸気圧を下げる、(4)系外に取去る方法が、単独または組合せで利用される。

表1に、American Type Culture Collectionで保

管する各種の生物細胞の保存法を示した²⁾。ウイルス、細菌、マイコプラズマ、カビなどの保存には、主として凍結乾燥法が用いられていることがわかる。

微生物の凍結乾燥は、菌株保存の面で重要なばかりでなく、たとえば乾燥生菌ワクチン、細菌製剤、食品加工用の粉末乳酸菌スターターなどの製造にも、この乾燥法が応用されている。本稿では、微生物の凍結乾燥について、その大要を紹介し、二三の問題点を明らかにしたい。

2. 凍結乾燥法の特徴

周知のごとく、食品工業では、各種の乾燥方法を使いわけられる。そして凍結乾燥法を用いると、(1)色、味、かおり、有効成分などの変化が少なく、(2)水や湯でもどしたとき、きわめて復元性がよいという利点がある³⁾。しか

* 農林省畜産試験場(千葉市青葉町 959)

表1 American Type Culture Collection における生物細胞の保存ならびに配布方法²⁾

Collection	Seed stock	Distribution
Algae	frozen*	test tube
Bacteria	lyophilized	lyophilized
Mycoplasmata	frozen	lyophilized
Fungi	lyophilized ; frozen	lyophilized ; test tube
Plant rusts	frozen	thawed spores
Mycelial forms	frozen	test tube
Animal viruses	lyophilized (-70°C)** ; frozen	lyophilized ; frozen (CO ₂)
Plant viruses	frozen	lyophilized
Bacteriophages	frozen	lyophilized
Protozoa	frozen	test tube
Animal cell lines	frozen	frozen ; flask

* Frozen in liquid nitrogen (-196°C) .

** Stored at -70°C

し食品では、乾燥に要するコストが、現実的な決定因子となる。

一方、微生物を対象とする場合は、乾燥後も菌の生命が保たれていることが、絶対的な必要条件である。このためには、主として凍結乾燥法が採用される。ただし他の乾燥方法が有利な例もないわけではない。たとえば、プロトゾア（原虫の1種）を実験室内で凍結乾燥してもなかなか成功しないが、この細胞が自然に乾燥したときは、かなりよく生き残るといわれている。パン酵母の場合は、常温常圧乾燥の方が、凍結乾燥法よりも、生残菌数が多く、活性も高い。また乳酸菌の中には、乾燥抵抗性の強いものがあり、このような菌種に対しては噴霧乾燥でも差つかえない。

しかし実際問題として、Shackell(1909)が凍結乾燥による微生物の保存法を開発して以来、この方法は各国の専門家に賞用され、経験的な知識も蓄積されて、その応用範囲はますます広がりつつある。たとえば American Type Culture Collection に存在する約 6500 株の細菌のうち、凍結乾燥すると死んでしまうために、この方法が利用できない菌株は 100 株足らずといわれている²⁾。

このように、凍結乾燥法はほとんどすべての微生物に適用できる便利な方法であるが、やはり一定の限界があることを忘れてはならない。表 1 から明らかなように動物細胞（たとえば赤血球や精子）の凍結保存技術は現在ほぼ完成しているにもかかわらず、その凍結乾燥は事実上不成功に終わっている。この壁を突破するためには、現行の凍結乾燥法を改良すればよいのか、あるいは動物細胞にはまったく別のタイプの乾燥法を適用すべきなのか、今のところ判断の手がかりはほとんどない。

凍結乾燥 (freeze-drying, lyophilization) は、真空乾燥 (vacuum drying) の特殊な場合と考えることができる。食品の分野では、真空乾燥とは、真空中において氷晶点以上の温度で乾燥することをいう。そして予備凍結の有無に関係なく、凍結状態を保つ真空中で水の昇華によって乾燥を進めることを、凍結乾燥と称する³⁾。微生物の場合は、原則として、予備凍結したのちに、減圧して凍結乾燥する方式が用いられる。（真空中で自己凍結させる方法もあるが、これについてはのちに触れる。）しかし果して予備凍結は絶対的な必要条件であろうか。この点に関しては、今後検討すべき余地が残されている。たとえば Annear⁴⁾ は、品温を 20°C に保って、液体状態で真空乾燥を行ない、動物ウイルスからプロトゾアに及ぶ各種微生物の乾燥に成功している。したがって、真空を巧みに利用すれば、生物細胞の乾燥に適した

図 1 凍 結 乾 燥 装 置

(a)棚板の温度、(b)ワクチンの温度、(c)ピラニー真空計の読み、(d)コールドトラップの温度
(鈴木正敏: J. Hyg., Camb. 68, 29, 1970 より引用)

図 2 痘苗の凍結乾燥における温度と真空度の変化

新しい乾燥法が開発できるかも知れない。本誌読者のお知恵を是非お借りしたいところである。

3. 微生物の凍結乾燥法の実際

微生物の凍結乾燥法の手順を、菌株保存の場合を例にとって、簡単に説明するとつぎの通りである⁶⁾。

凍結乾燥しようとする微生物を適当な培地に培養し、菌体を集める。この菌体を、保護物質の溶液（分散媒、これについてはあとで詳しく説明する）に懸濁し、あらかじめ滅菌したアンプルに約 0.1 ml ずつ分注する。図 1 に模式的に示したように、凍結乾燥装置にはいくつかの型式があり、微生物試料の凍結方法は必ずしも同一ではない。多岐管式の装置を使うときは、ドライアイス・アルコールなどの低温槽につけて凍結し、多岐管に差しこむ。棚板式では、棚上にアンプルを並べて、冷凍機で凍結する。これらの場合は、試料を予備凍結したのちに、減圧し、乾燥する。また遠心式凍結乾燥機では、アンプルを真空中で遠心し、発泡を防ぎながら、試料を薄

膜状に自己凍結させる。凍結が完了したら回転をとめる。このあと昇華した水分をコールドトラップで捕捉して乾燥を進めることは、いずれの型式の凍結乾燥機でも同様である。乾燥を促進するために、棚板を加温することが多い。水分が除かれるにしたがって、徐々に品温が上昇する。微生物を凍結乾燥するときには、一般に最終品温を $35^{\circ}\sim 40^{\circ}\text{C}$ 以下に押える。図2に、痘苗（種痘に用いるワクチン）の凍結乾燥における温度と真空度の変化を示した。この実例では棚板式凍結乾燥機を用い、ワクチンはアンプルに 0.5ml ずつ分注している。

つぎに、図1に示したごとく、五酸化磷を乾燥剤として、とくに高性能の真空ポンプ（通常は拡散ポンプ）を用いて18～20時間程度乾燥すると、残存水分を約1%のレベルまで下げることができる。この操作は、水の存在しない状態における脱水過程であり、二次乾燥と呼ばれる。

（二次乾燥装置は、凍結乾燥機の本体に組みこまれている場合と、独立している場合がある。なお二次乾燥はしばしば省略される。）二次乾燥過程における試料と水の活性との関係は、単純な吸着論では説明できず、水を放出する或る種の化学反応も関与していると考えられる⁵⁾。

乾燥終了後、アンプルは真空中で熔封し、保存する。またバイアルは、凍結乾燥機の乾燥室内において、真空下あるいは不活性ガス中で密栓することもできる。英国の National Collection of Type Cultures は、多くの種類の菌株について、18年にわたる凍結乾燥保存の成績⁶⁾を発表したが、このデータは微生物学の発展を支える凍結乾燥法の役割を改めて認識させるものである。

医療用に大規模に生産される生菌ワクチン（乾燥 BCG ワクチン、弱毒生麻しんワクチン、乾燥痘苗など）の製造法は、厚生省の告示する生物学的製剤基準の中に厳密に規定されている。たとえば BCG（結核菌の1種）の場合は、定められた培地に 7～10 日間培養して、菌膜を採取し、磨砕したのち、白糖またはグルタミン酸ナトリウムの媒液を加えて、 1ml 中の菌量として 80mg を含

図3 各種細菌の凍結乾燥直後における生存率 (%)

（註）各細菌試料は、 0.06M グルタミン酸ナトリウム水溶液（ $\text{pH } 7$ ）に、細胞数 $10^9/\text{ml}$ となるように懸濁し、凍結乾燥したのち、生き残った菌数を、乾燥前の菌数に対する百分率で示した。

む菌浮遊液をつくる。これを所定量、小分け容器（バイアルまたはアンプル）に分注し、凍結乾燥したのち、 0.1 Torr 以下において真空熔封する。残存水分量は、アブデルハルデン法で測定して3%以下でなければならない。乾燥ワクチンの力価試験法も細かく規定されている。

微生物は、凍結乾燥の過程で、多かれ少なかれ死滅する。したがって乾燥の前後に、生きている細胞の数を測定して、生存率 (%) を求め、凍結乾燥の成否を判定する。つぎに、微生物の凍結乾燥において、菌の生死に影響する可能性のある因子を、実用的立場から整理して示した。

3.1 微生物の種類 一般的には、構造の複雑な微生物ほど凍結乾燥が困難である。現在の技術では、各種ウイルス、細菌、マイコプラズマ、レプトスピラ、酵母、カビ、一部の藻類の凍結乾燥は成功しているが、プロト

ゾアはまだ難しい。またウイルスや細菌の中でも、小児まひウイルス、コレラ菌、淋菌、一部の海洋細菌などは凍結乾燥で非常に死にやすいことが知られている。

グルタミン酸ナトリウムを保護物質として添加して各種細菌を凍結乾燥したときの生残率(%)を図3に示した。この実験では、細胞数が約 $10^8/ml$ の菌液を1mlずつバイアルに分注し、棚板式凍結乾燥機を用いて、最終品温 $30^{\circ}C$ まで乾燥した。図3から、同じ細菌といっても、菌種によって凍結乾燥の難易に著しい差があることがわかる。

3.2 培養令 微生物は、その培養時間に応じて老若に分かれ、同一菌でも細胞の性状はかなり相違する。一般に若い菌ほど、凍結乾燥で死にやすく、定常期に達した菌はもっとも抵抗性が強いといわれている。

3.3 菌濃度 分散媒に懸濁するときの菌濃度が高い方が、生残率は大になる傾向がある。菌株保存の目的では、細胞数 $10^8/ml$ 程度の菌濃度で凍結乾燥する例が多いが、乾燥ワクチンの製造などでは、しばしば $10^{10} \sim 10^{11}/ml$ という高い菌濃度が用いられる。

3.4 分散媒 微生物の凍結乾燥を成功させる上に、実用上もっとも重要な因子であって、報文も多い。この点については4で詳しく述べる。

3.5 凍結速度 あまりに緩慢な凍結速度(たとえば $0.1^{\circ}C/min$)では、微生物細胞が長時間、濃縮塩類の害作用を受けるため、生残率が低下する。また極端な急速凍結(細菌では $100^{\circ} \sim 1000^{\circ}C/min$)は、致命的な細胞内凍結をおこすので避けなければならない。凍結乾燥の実用機では、凍結速度はコントロールしにくい、普通は $1^{\circ} \sim 10^{\circ}C/min$ の範囲にあり、特殊な細胞を対象とする場合を除き、凍結条件はそれほど問題とならない。

3.6 乾燥温度 乾燥中に液相を生じて支障がおこらないように、共晶点より高い温度で乾燥することは避ける。電解質の共晶点は正確に決まっているが、生物材料では完全固化温度が問題にされる。仙波(1969)によれば、たとえばインフルエンザワクチンの融解温度は $-21^{\circ}C$ 、凍結乾燥適温は $-25^{\circ} \sim -30^{\circ}C$ である。

3.7 凍結乾燥機の機種 機種の違いにより、バクテリオファージ凍結乾燥の成功率はかなり相違する例が報告されている⁷⁾。機械の構造によって、凍結乾燥条件に微妙な差が生ずるためかも知れない。

3.8 保存の気相 凍結乾燥した微生物は、空気中の酸素で酸化されて、死にやすい。したがって乾燥菌の容器は、脱気するか、あるいは乾燥不活性ガスを封入する。小分け容器としては、アンプルが優るが、利用者はバイアルの方が使いやすい。ブチルゴム栓は、品質が均一で通気性が小さいといわれている。またアタクチック

凍結乾燥試料から回収される生菌数
(乾燥前の生菌数に対する%)

図4 *L. bulgaricus* 凍結乾燥試料から回収される生菌数に及ぼす復水温度の影響

ポリプロピレンを用いる減圧封栓法も開発された。

3.9 保存温度 凍結乾燥した微生物は、保存温度が高いほど速やかに死滅するので、冷蔵することが望ましい。凍結乾燥菌の死滅速度の見かけの Q_{10} は、著者らのデータでは $2.2 \sim 3.5$ (ただし $10^{\circ} \sim 37^{\circ}C$ の範囲)であった。すなわち温度を $10^{\circ}C$ 下げると、保存性は2~3倍高まる。表1に示したごとく、一部の動物ウイルスは、凍結乾燥しても不安定で非常に死にやすいため、このような場合は乾燥菌を凍結保存することがある。

3.10 日光 凍結乾燥菌を、長時間、日光にさらすことは、きわめて有害である。またごく限定された条件下ではあるが、乾燥状態の微生物に紫外線やブラックライトを照射すると、高頻度の突然変異や死滅を誘起する危険性があるので⁸⁾、凍結乾燥菌を扱うとき、誤って殺菌灯などを照らさないように気をつける。

3.11 残水量 一般的には、残水量 $1 \sim 3\%$ の範囲では、凍結乾燥菌の保存性に大きな影響はない。しかし水分が 10% 以上も残存する生乾きの状態では、微生物は急速に死滅する。なお微量水分の定量は、実験技術上、かなり難しいものであって、同一試料でも測定法によってかなり差が生ずる。生物学的製剤基準では、アブデルハルデン法($60^{\circ}C$)が採用されている。

3.12 復水条件 凍結乾燥した微生物を利用するには水または適当な溶液を加えて、もとの濡れた状態にもどさなければならない。この復水条件が不適当な場合はそれまで生存状態にあった菌が死滅するおそれがある。その1例として、凍結乾燥した *Lactobacillus bulgaricus* (ヨーグルトなどの製造に用いる乳酸菌)の

生菌数が、復水液の温度によって、いかに相違するかを明らかにした実験成績を 図 4 に示した。同じ凍結乾燥試料でも、20°Cと50°Cの復水温度を比較すると、回収される生菌数には100倍近くの開きがあることがわかる。

3.13 凍結乾燥菌の培養条件 凍結乾燥で生き残った菌も、微生物学的に見れば、決して無傷の状態ではない。したがって凍結乾燥菌の培養条件が不適当であると菌の増殖能が失われることがある。凍結乾燥による微生物の損傷は、つぎのような形で表われる⁹⁾。

(1) 栄養要求性が一時的に複雑になり、無傷の状態では不必要な特定のビタミン、アミノ酸、ペプチドなどがなければ、増殖できない場合がある。そのため、できるだけ栄養素の豊富な培地で培養する必要がある。

(2) 細胞内の必須成分が外部に流失し、細胞増殖の開始が遅れる。

(3) 増殖の温度範囲や pH 域が狭くなり、悪条件に対する抵抗性が弱まる。たとえば痕跡量の重金属、あるいは正常菌には無害な薬剤により、増殖が阻止される。

微生物の専門家は、これらの点を念頭において、凍結乾燥菌の培養には慎重を期している。また上述のごとき損傷がなるべくおこらないように、微生物の凍結乾燥条件を工夫しなければならない。

4. 微生物の凍結乾燥に用いる保護物質

現在知られている各種乾燥法のうちでは、凍結乾燥法はもっとも穏やかな処理である。しかし微生物のごときデリケートな生き物を相手にするときは、相当の注意を払わなければ、凍結乾燥中に大半の菌は死んでしまう。菌株保存の場合には、ごくわずかの菌でも生き残れば差しつかえないという考え方もあるが、微生物の性質に偏りを生じないように菌株を維持するためには、できるだけ多数の細胞が生き残る条件を工夫すべきであろう。また医療用や食品加工用に凍結乾燥菌を使用するときも、乾燥状態で生きている細胞数ができるだけ多いことが望まれるのは当然である。

微生物の凍結乾燥においては、3で述べたごとく、多くの因子が菌の生死に影響を与える。しかしその中でもっとも重要な因子は、どのような保護物質を使用するかという問題である。実際の操作としては、凍結乾燥しようとする微生物細胞を懸濁させる媒液（分散媒）の中に保護物質を添加する。

図 5 に *Streptococcus thermophilus*（乳酸菌の1種）の凍結乾燥における保護物質の効果を示した。この細菌は、凍結乾燥に対する抵抗性が比較的強く、どちらかといえば乾燥しやすい菌であるが、そのような微生物であっても、蒸留水に浮遊させただけで凍結乾燥した場

表 2 微生物の凍結乾燥に用いる保護物質の実例

酸性化合物：

グルタミン酸、アスパラギン酸、りんご酸、くえん酸、ピログルタミン酸、ラクトビオン酸

中性化合物：

ぶどう糖、乳糖、蔗糖、ラフィノース、ソルビトール、キシリトール、cap-スレオニン

塩基性化合物：

アルギニン、リジン、ヒドロキシルアミン、セミカルバジド

高分子物質またはその分解物：

アルブミン、ゼラチン、ムチン、ペプトン、肉エキス、可溶性でん粉、デキストリン、アルギン酸、ペクチン、アラビアゴム、デキストラン、ポリビニルピロリドン (PVP)、カルボキシメチルセルロース

天然の混合物：

脱脂乳、血清

混合分散媒：

Naylor ら (1946)

チ オ 尿 素 0.5%
塩化アンモニウム 0.5%
デキストリン 2.0%
アスコルビン酸 0.5%

Stamp (1947)

nutrient gelatin 10%
アスコルビン酸 0.25%

Fry ら (1951)

血 清 3部
nutrient broth 1部
ぶどう糖 7.5%

Briggs ら (1955)

血 清
ぶどう糖 8%

大林ら (1961)

PVP 5%
グルタミン酸ナト 3%
リウム

照井ら (1963)

脱脂粉乳糖 10%
蔗糖 5%
グルタミン酸ナト 1%
トリウム

佐藤ら (1963)

脱脂粉乳糖 3%
ぶどう糖 5%
アスコルビン酸 0.2%

大塚ら (1968)

ペプトン 5%
可溶性でん粉 0.75%
ぶどう糖 5%
アスコルビン酸 0.2%

図5 *S. thermophilus* の凍結乾燥における保護物質の効果

合は、ほとんどすべての細胞（約98%）が死滅する。しかし図5から明らかなように、この細菌を滅菌脱脂乳に懸濁して凍結乾燥すれば、約70%の細胞が生き残り、さらに分散媒を工夫すれば、ほとんどすべての細胞を生存状態で乾燥することも可能である。

表2に、微生物の凍結乾燥に用いる保護物質の実例を示した。これは、現在までに報告された多数の研究成績を参照して、まとめたものである。微生物の凍結乾燥に関する研究においては、効果的な保護物質の検索が中心テーマの一つを占める。表2の内容を理解するために、現在までの研究動向を概観してみよう。

1910年に始まる初期の研究においては、分散媒として微生物の液体培養基、血清または牛乳（脱脂乳）が用いられた。たとえば脱脂乳が有効なことは、図5の成績からも明らかである。初期の研究者は、血清や牛乳に含まれるコロイド物質が保護効果を発揮すると考えた。そしてこの線に沿って、表2に示した各種の蛋白質や多糖類の有効性が明らかにされた。

1940年代になると、糖類の保護効果が確認されて、微生物の凍結乾燥に、糖類を中心とした炭水化物を利用することが全盛となった¹⁰⁾。図5の実験でも、乳糖の保護効果を検討しているが、この菌の場合は糖類はそれほど効果的ではない。つづいて従来使用されていた血清と糖類を混合して、さらに保護効果を高める試みが盛んになった。表2に示したFryらやBriggsらの混合分散媒がその例である。とくにFryらの分散媒は、コレラ菌や淋菌のごとく、乾燥にきわめて弱い細菌を凍結乾燥するとき効果的であるといわれている¹¹⁾。しかし血液成分には抗原性があるため、生菌ワクチンの凍結乾燥に応用することは困難であった。

ところが1956年に至り、故大林容二博士らが、BCGの凍結乾燥において、グルタミン酸ナトリウムが強い保護効果を発揮することを見だし、その実用化に成功した¹²⁾。グルタミン酸の有効性は、従来から用いられてい

た高分子物質の効果とほとんど変わらない。しかもグルタミン酸は、BCG以外の各種細菌（図3参照）、ウイルスなどに対しても有効な分散媒であることが確認されて、その実用価値はますます高まりつつある。このアミノ酸は、蛋白質などと違って、抗原性をもたないため、乾燥生菌ワクチンの製造に応用するとき好都合である。さらに表2に示したごとく、グルタミン酸を添加した混合分散媒も使用されるようになった。照井らの分

散媒は酵母用である。また大林らの分散媒は、合成高分子物質（たとえばPVP）とグルタミン酸を組合せたもので、組成もすっきりしていて、自由に改変できる利点がある。

グルタミン酸の有効性の発見がきっかけになって、保護物質の化学構造を手がかりに系統的な検索が行われ、多数の有効化合物が明らかにされた。その一部は表2に示してある。また図5のデータを見ると、りんご酸ナトリウムが、脱脂乳にほぼ匹敵する強い保護効果を発揮することがわかる。現在では、微生物の凍結乾燥において菌の死滅を防止する有効化合物には、つぎのような共通の特徴があることが知られている^{13,14)}。

(1) 水素結合性あるいはイオン性官能基が合わせて3個以上存在する。

(2) これらの官能基は、特定の立体配置をとらなければならない。すなわち有効化合物には、一定の分子サイズと形が要求される。

(3) 有効化合物は、凍結乾燥過程において、水に代って、細胞成分の高次構造を安定化すると考えられる。

実際に、表2の保護物質を分散媒として用いる場合はその濃度やpHが問題となる。グルタミン酸などのアミノ酸、有機酸は、通常1~3%水溶液とし、pHは中性付近に調整する。不必要に多量の保護物質（たとえばグルタミン酸10%）を加えると、凍結乾燥品の残存水分が多くなって、保存性が低下するおそれがある。ぶどう糖などの糖類では、普通5~10%溶液が使われる。この場合はとくにpH調整の必要はない。高分子物質を分散媒とするときの濃度は一概にいえませんが、たとえば可溶性でん粉では0.1~1%、PVPでは0.5~5%程度である。さき到大林らの分散媒を例示したが、一般に低分子化合物と高分子物質を混合すると、効果の高い分散媒が調合できる。すなわち試料からの水分昇華が容易になり、凍結乾燥菌の保存性が改善されるとともに、取扱いも容易になって便利である。

図6 *Sal. newport* 凍結乾燥菌の保存性に及ぼす保護物質、温度ならびに水の活性度の影響¹⁵⁾

このようにして、無事に凍結乾燥が完了すれば、微生物の細胞水分はほとんど除かれた状態になるため、非常に長期間にわたって生命を維持することができる。しかし凍結乾燥菌といえども、なまの菌とは比較にならないほどわずかな速度ではあるが、徐々に死滅する。図6にサルモネラ菌を凍結乾燥して、その保存性に及ぼす温度、水の活性度ならびに保護物質の影響を4年半にわたって検討した Marshallら¹⁵⁾の成績を示した。保存温度の低いとき、あるいは水の活性度が小さい条件では凍結乾燥菌の保存性がよいことは当然といえよう。そして図6の成績から、添加された蔗糖またはグルタミン酸は、単に凍結乾燥過程における菌の生命を守るだけでなく、乾燥菌の保存過程においても保護効果を発揮することがわかる。

5. 凍結乾燥による細胞成分の変化

凍結乾燥によって細胞成分にどのような変化がおこるかを明らかにすることは、微生物の凍結乾燥を確実に成功させる上に重要である。これまでに述べた実際の知見の理解を助けるため、この基礎的問題について簡単に触

れておきたい⁹⁾。

微生物細胞（たとえば大腸菌や酵母）の約1/2は乾物、残りの1/2は水分であって、細胞水分のうち約10%の水は -80°C まで冷却しても凍結しない（結合水）。凍結乾燥が進んで、この不凍水分が失われる段階に至ると、急速に菌の死滅がはじまる¹⁶⁾。すなわち、一定の配向と構造をもった結合水が離脱すると、菌の生命が脅かされる。

細胞に含まれる水は、単に溶媒として種々の反応系の場を提供するだけでなく、生命を構成する生体高分子物質（蛋白質や核酸）の複雑な構造を維持し、その正常な機能を発揮させる上にも重要な役割を果している。そして凍結乾燥によって結合水が奪われると、かなり多くの種類の蛋白質が変性することが明らかにされた¹⁷⁾。とくにリボ蛋白質は、本質的に凍結乾燥で変化しやすいといわれる。

上述のリボ蛋白質は、微生物では細胞膜に偏在する。そして凍結乾燥によって、微生物の細胞膜が損傷をうけることは、多くの研究者がほぼ一致して認めるところである。また3.13において、凍結乾燥菌の損傷が実際にはどのような形で表われるかを説明したが、これらの現象はすべて細胞膜の損傷が主因となっておくと考えられる。

すなわち微生物の凍結乾燥における基本的な傷害因子は、結合水の攪乱と離脱であり、このために蛋白質やリビドが変化して、細胞膜が損傷される、このことは必然的に細胞成分の漏洩や有害物質の侵入につながり、また細胞高分子物質の不安定化を招く誘因となる、このようにして、微生物細胞では、いったん“ひきがね”が引かれると、雪崩のごとく、死に至る連続的の反応がひきおこされる。4で述べた保護物質は、細胞表面とくに細胞膜の必須成分を水に代って安定化し、微生物に不都合な変化がおこることを防止すると考えられる。微生物をはじめとする生物細胞の凍結乾燥に関する研究は、最近進歩しつつある低温生物学（Cryobiology）の一分野を形成する。そして学問的にも技術的にも、多くの関連分野の専門家の理解と援助が切望されている。

〔文 献〕

- (1) 古賀正三ら：凍結・乾燥と細胞障害（東京大学出版会、根井外喜男編、1970）p.33.
- (2) W.A. Clark : Proceedings of the First

- International Conference on Culture Collections (University of Tokyo Press, H. Iizuka & T. Hasegawa eds., 1970) p. 309.
- (8) 木村進：乾燥食品（光琳書院，1966）p.66.
- (4) D. I. Annear : Proceedings of the First International Conference on Culture Collections, p.273.
- (5) 高野光男ら：凍結・乾燥と細胞障害, p.21,
- (6) S.P.Lapage et al. : Methods in Microbiology Vol. 3A (Academic Press, J. R. Norris & D. W. Ribbons eds., 1970) p.135.
- (7) W.A.Clark et al. : Freezing and Drying of Microorganisms (University of Tokyo Press, T. Nei ed., 1969) p. 179.
- (8) S.J.Webb : Proceedings of the First International Conference on Culture Collections, p.281.
- (9) 森地敏樹：凍結・乾燥と細胞障害, p.45.
- (10) R.M.Fry : Cryobiology (Academic Press, H. T. Meryman ed., 1966) p.665.
- (11) R.M.Fry : Freezing and Drying (The Institute of Biology, R. J. C. Harris ed., 1951) p. 107.
- (12) Y. Obayashi : Recent Research in Freezing and Drying (Blackwell Sci. Pub., A. S. Parkes & A. U. Smith eds., 1960) p.221.
- (13) 森地敏樹：生細胞の凍結乾燥（日本学術振興会，根井外喜男編，1965）p.38.
- (4) T.Morichi : Proceedings of the First International Conference on Culture Collections, p. 351.
- (15) B.J.Marshall et al. : ibid., p. 363.
- (16) 根井外喜男ら：生細胞の凍結乾燥, p.13.
- (17) 花房尚史：凍結・乾燥と細胞障害, p.1.
- （付記）文献の引用は成書に限った。この分野におけるわが国の研究者の成績ならびに内外の関係文献目録については、「凍結及び乾燥研究会会誌」（北海道大学低温科学研究所内，凍結及び乾燥研究会発行）を参照すると便利である。

ニ ュ ー ス

日本酸素K.K. と英国エドワーズ社との合併会社

日本酸素K.K.と英国エドワーズ社とは、日本に新しく合併会社を設立する点について意見の一致を見、このたび調印した旨、6月1日発表があった。この合併会社は、日酸エドワーズ真空 K.K. (Nissan Edwards Sinku K.K.) と呼ばれ、英国エドワーズ社の製品につ

いて輸入と製造とを行なうことになる。資本金は1億2000万円で両者が折半出資する。

日本酸素は、これまで日本におけるエドワーズ社製品の販売を行なってきたが、これからは新会社の製品の独占の販売会社になる。なお、現在英国エドワーズ社は資本的には英国酸素株式会社 (British Oxygen Co., Ltd.) の翼下にある。