

**in-situ X 線 CT 観察による凍結乾燥過程における
ガラス組織構造の動的変化測定**
**Measurement of dynamic change in glass structures in the
freeze-concentrated phase during freeze-drying by in-situ X-ray CT
technique**

中川 究也^a, 田宮 慎理^a, 河野 晋治^b, 都 甲洙^c, 落合 隆晃^d
Kyuya Nakagawa^a, Shinri Tamiya^a, Shinji Kono^b, Gabsoo Do^c, Takaaki Ochiai^d

^a京都大学大学院農学研究科食品生物科学専攻, ^b株式会社前川製作所, ^c日本大学物資源科学部生物環境工学科, ^dアサヒグループ食品株式会社

^aDivision of Food Science and Biotechnology, Graduate School of Agriculture, Kyoto University,

^bResearch and Development Center, Mayekawa MFG Co., Ltd., Japan,

^cCollege of Bioresource Science, Nihon University, Japan,

^dAsahi Group Foods Ltd., Japan

減圧下における *in-situ* な X 線 CT 観察を可能とした装置システムを用いて、食品の凍結乾燥過程における凍結濃縮相組織の固体構造変化の追跡を目的とした測定を実施した。単色化した X 線を用いた X 線 CT 観察は、X 線線吸収係数を指標として画像中の固体構造評価が可能と期待できる。再構成画像中の輝度値を解析することにより、凍結中、および乾燥中に進行する構造変化に関わる情報を抽出したい。そのための基礎データとして、デキストリンと水(もしくはスクロースと水)からなる溶液を急速凍結させ、X 線線吸収係数の値と溶質濃度の関係を測定したところ、ほぼ線形な良好な相関関係を得られた。凍結乾燥過程における組織構造変化を解析したところ、氷の昇華と濃縮相からの脱水が連続的に進行し、脱水に伴う凍結濃縮相のガラス領域の大きさが変化していることを見出すことができた。今後精度のよい解析を検討・実施することにより、凍結乾燥過程における凍結濃縮相内のガラス構造の推移を追跡できると考えられる。

キーワード : X 線 CT, 氷結晶, 凍結乾燥, *in-situ* 測定

背景と研究目的 :

近年、減圧下における *in-situ* な X 線 CT 観察を可能とした装置システムが BL19B2 において開発されてきた。これを利用して食品の凍結乾燥過程における氷結晶組織(ならびに凍結濃縮相組織)の動的な変化過程の観察が可能となってきた。凍結乾燥(フリーズドライ)は、凍結を経た後に氷を昇華させることにより脱水を行う乾燥手法であり、食品製造のみならず、抗生剤、抗がん剤などの注射剤製造に欠かせない技術である。凍結乾燥製品の品質を制御するために特に重要と考えられるのは凍結濃縮相の状態変化であり、発泡やコラプスといった製造上の不具合と関連する現象もこの状態変化と密接に関連している^[1,2]。また、乾燥製品の品質に関わる物性もこの状態変化の帰結として決定されていると考えられるが、その詳細の解明は今後の研究課題である。

凍結乾燥過程における凍結濃縮相内の状態は、食品においては多くの場合ガラス状態である。このガラス相の状態は品質と関わる様々な物性変化と関連しているが、乾燥による水分移動に伴うガラス相の状態の評価はその困難さのためにほとんどなされていない^[3]。これはこのガラス相が氷結晶組織のマイクロ構造間隙に形成するために、直接的な観察が困難であったということにも一因している。凍結乾燥過程のイメージングデータを取得し、製品内部に形成しているマイクロ構造、固体構造およびその推移を評価できることが望ましい。

今回の測定では、単色化した X 線を用いた CT 観察を実施することにより、X 線吸収係数を指標として画像中の固体構造を評価するアプローチを試みる。再構成画像中の輝度値は、使用した X 線の線吸収係数と対応するため、画像解析により X 線吸収係数の分布を得ることができる。この分布を基に、凍結中、および乾燥中に進行する構造変化に関わる情報を抽出することを目指し

たい。そのための基礎データの取得が今回の測定の目的である。

実験：

測定試料は、デキストリン水溶液(DE =11, 25), スクロース水溶液を適宜濃度調整して用いた。濃度調整した溶液は測定の目的に応じて異なる条件にて溶液を凍結させた。

- ① 急速凍結条件(ガラス相の X 線吸収係数検量線の作成): ステンレス製の試料ステージ上に取り付けた内径 6 mm, 長さ 10 mm のプラスチック製チューブ内に溶液を充填し, 液体窒素中に試料ステージごと浸漬し凍結させた。
- ② 緩慢凍結(凍結乾燥過程の観察): ステンレス製の試料ステージに取り付けた内径 6 mm, 長さ 40 mm のプラスチック製チューブ内に溶液を充填し, -15°C の熱交換器(恒温槽冷却面)に端辺が接するように直立させ, チューブ底部から上部へと一方向に凍結を進めた。約 1 時間半後にチューブ上部まで凍結界面が進行した後, チューブ上端の 10 mm の領域を切断し, 凍結乾燥に供した。

X 線 CT 観察においては使用する X 線のエネルギーは 12.4 keV に設定した。計測システムは, X 線の画像を蛍光体として可視化するイメージングユニット(浜松ホトニクス AA40)と CCD カメラ(浜松ホトニクス C4880-41S)を組み合わせたものを用いた。空間分解能を決定する画素サイズは $2.9\ \mu\text{m}$ であった。測定の手順は、試料ホルダーにセットした試料を回転試料ステージ上にセットし, この試料部分を透明な樹脂製の筒状真空チャンバーで覆い, 直ちに真空引きして試料を減圧下においた。試料ステージはあらかじめ温調装置によって -80°C 程度まで予冷させてあり, 直ちに氷の昇華は進行しない条件とした。ガラス相の X 線線吸収係数検量線の作成はこの条件のまま測定を実施した。凍結乾燥過程の測定は, ステージ温度が -10°C 程度を維持するように温調設定し, およそ 5 時間にわたる凍結乾燥過程の CT 像を *in-situ* で測定した。凍結乾燥過程における試料温度は昇華速度と試料への熱流束がつりあったものとなる。そのため, 測定中の試料温度は今回使用したシステムの乾燥能力(熱と物質移動と関わる係数)と, 測定中にモニタした試料ステージ温度より推算することができる。尚, 装置内部の真空度は約 6-7 Pa で推移していた。

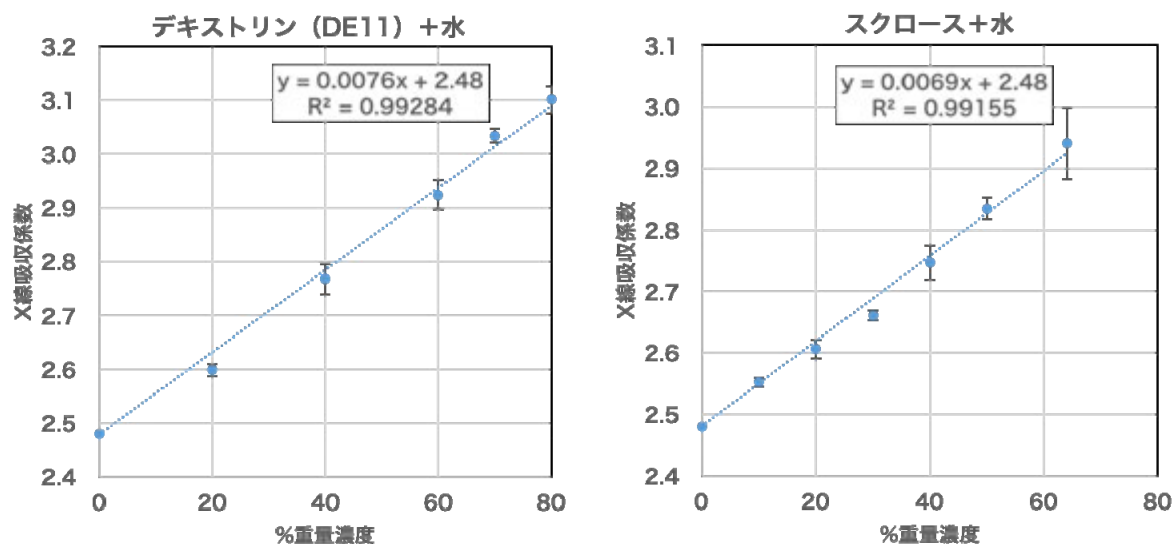


Fig. 1. 急速凍結させたデキストリン水溶液, スクロース水溶液の X 線線吸収係数値 (濃度の異なる溶液の CT 像より値を推定)

結果および考察：

Fig. 1 に作成したガラス相の X 線線吸収係数検量線を示す。検量線の作成にあたり, ①の実験要領で作成した凍結試料三つについてそれぞれ測定を行い, 再構成画像より平均輝度値を抽出, それらの値の平均値をデキストリン・スクロースの重量濃度に対してプロットした。濃度ゼロの切片の値には氷の X 線線吸収係数値 2.48 を適用した。ちなみに再構成画像には目立った構造形成

は確認されず、少なくとも空間分解能 $2.9 \mu\text{m}$ のサイズ以上では均質な構造ができていると考えられた。適用した凍結条件から考えてもガラス状態と考えて問題ないと思われる。この図から推察されるように、デキストリンと水(もしくはスクロースと水)からなるガラス相の X 線線吸収係数値と溶質濃度の関係は、今回の測定濃度範囲においてほぼ線形な関係にあると考えて良さそうである。凍結試料の観察画像に対し、X 線線吸収係数値がこの図に示す範囲で有意に異なる領域があれば、その固体状態(ガラス状態)をおおよそ予測できることとなる。デキストリンとスクロースのそれぞれの測定より得られた係数(傾き)の値はあまり大きな差はない。これらの溶液が異なるガラス転移点(最大凍結濃縮濃度 W_g' 及びこの時の温度 T_g')を示すことを考えると、ここで測定した検量線に傾向の違いとして現れても不思議ではない。ここに示した検量線の傾向(線形性)と差異については今後慎重に判断されるべきである。

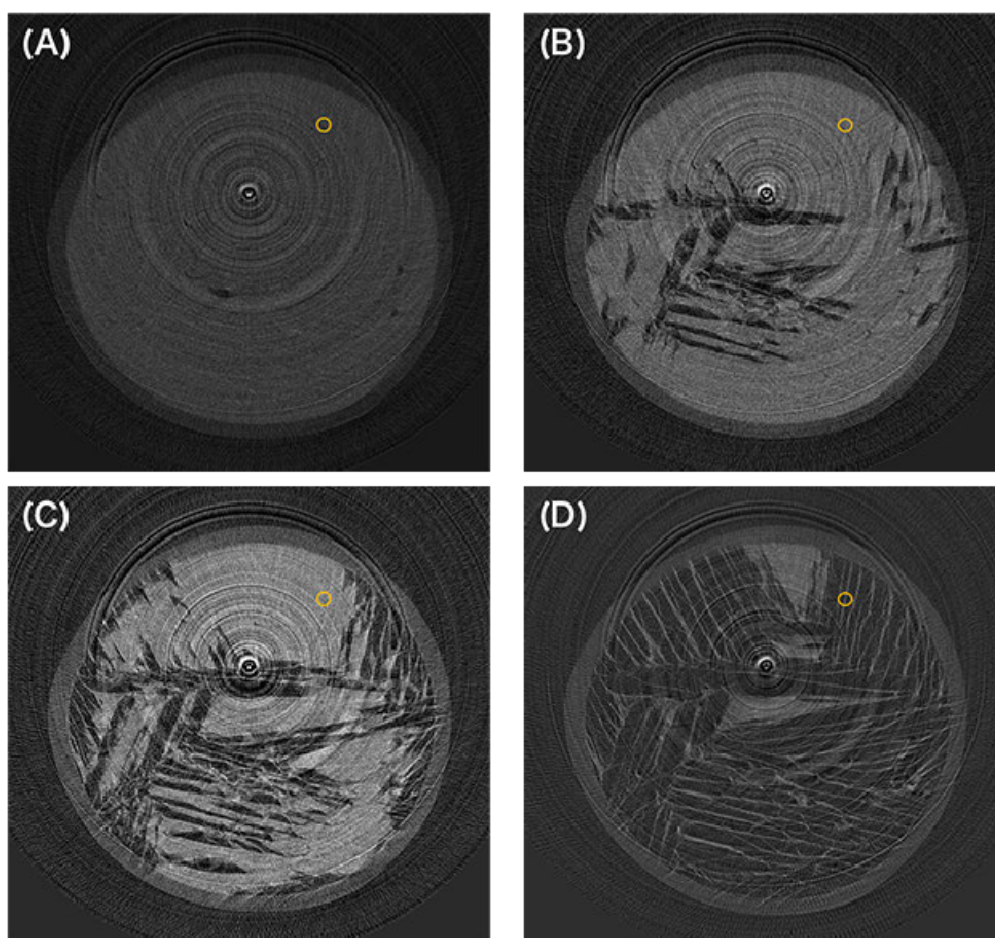


Fig. 2. 凍結乾燥過程における CT 画像：凍結乾燥開始直後(A)，乾燥過程(B)–(D)

20%(wt)デキストリン水溶液の凍結乾燥過程における CT 画像を Fig. 2 に示す。乾燥の進行に伴って氷晶が消失していく様子を捉えることができている。ここに示す(A)–(D)の画像は、試料の鉛直方向に沿って中央部の断面の再構成画像であり、試料収縮がなければ同じ場所と考えて良い。図中に丸く囲って示す位置における断面より、X 線線吸収係数に相当する輝度値を抽出し、Fig. 3 にある直線に沿った輝度値の 1 次元分布を示した。輝度値が 4–7 に至る大きな値を示す領域を確認できるが(Fig. 3 左図)、Fig. 1 に示す検量線を基礎とすると極端に大きな値に見える。デキストリンの密度を約 1.8 g/cm^3 とすると、X 線線吸収係数は約 4 程度と推測される。従ってこの値を超えるデータはエラーと判断し、4 を上限としてデータを丸めた(Fig. 3 右図)。 (A)→(C)、(C)→(D) の変化において、氷結晶の昇華に伴う X 線線吸収係数の変化を明確に見て取ることができる。興味深いのは(A)→(C)の変化においてすでに乾燥領域が形成したと判断できるが、(A)→(D)の変化に伴

ってその領域が小さく縮小していると判断できる。これはすなわち、氷の昇華と濃縮相からの脱水が、連続的に進行していることを示している。ここで得ている値が凍結濃縮相内のガラス状態を正確に反映するものであれば、もう少し詳細な議論ができるだろう。凍結した時点で決定した凍結濃縮相内のガラス構造が乾燥の進行に伴ってどのように変化するかが大きな興味であるが、今後精度を向上させる解析手法の検討が必要だろう。

今回の測定で、脱水に伴う凍結濃縮相のガラス領域の大きさの変化を追跡できることが分かった。今後、マイクロ構造内部における状態変化をより精度よく評価し、乾燥製品の品質と関わる物性制御への糸口を掴めると期待される。

まとめ：

デキストリンと水(もしくはスクロースと水)からなるガラス相の X 線線吸収係数値と溶質濃度の関係をまとめた。凍結乾燥の進行に伴う局所領域のガラス状態の推移を評価できる可能性が示された。本報告書記載のアプローチにて、凍結した時点で決定した凍結濃縮相内のガラス構造が乾燥の進行に伴ってどのように変化するか、凍結組織内における氷晶と濃縮領域の境界の連続性・不連続性を議論することが今後の課題である。得られた基礎的知見に基づいて、実際の食品への適用、凍結操作、乾燥操作、組織構造に依存した品質変化の理解へと繋げていくべきである。

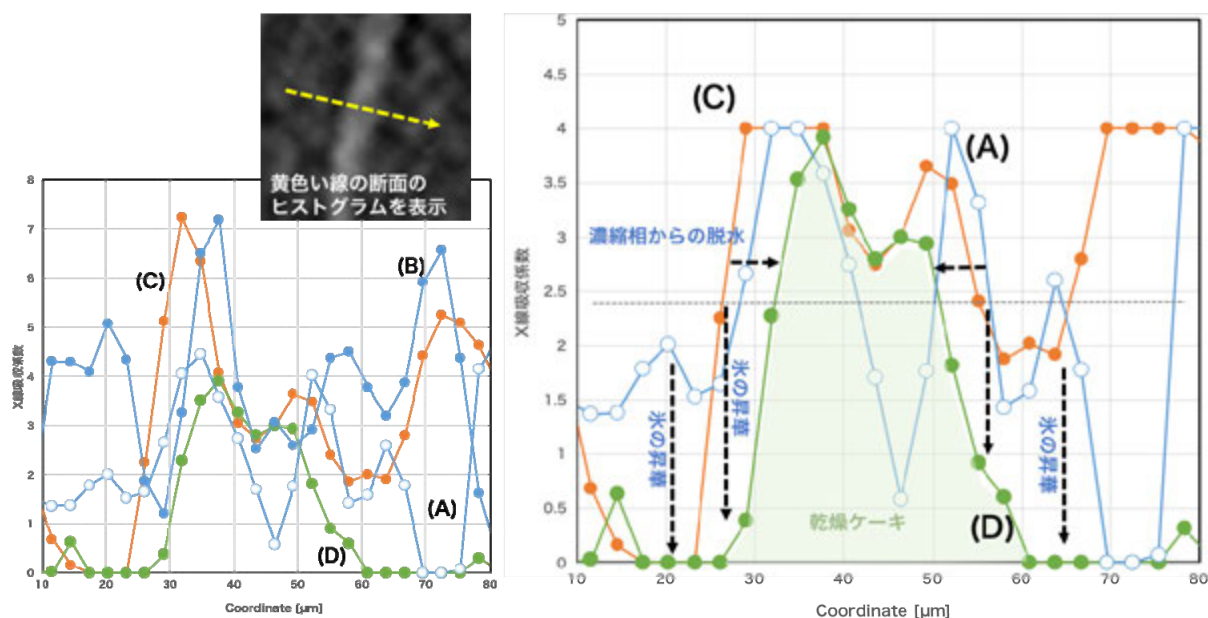


Fig. 3. 輝度値の1次元分布(Fig. 2. (A)–(D)画像より同じ箇所断面輝度値を抽出)

参考文献：

- [1] L. Slade et al., Critical Reviews in Food Science and Nutrition 1991, 30, 115-360.
- [2] E. Meister and H. Gieseler, Journal of Pharmaceutical Sciences 2009, 98, 3072-3087.
- [3] M.S. Rahman, International Journal of Food Properties 2009, 12, 726-740.