

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, 坂本 修^a, 河野 晋治^b, 都 甲洙^c
Kyuya Nakagawa^a, Shinri Tamiya^a, Shu Sakamoto^a, Shinji Kono^b, Gabsoo Do^c

^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

^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,

凍結乾燥過程における構造変化の *in-situ* な X線CT観察を可能とした装置システムを用いて、凍結組織の微細構造変化を追跡した。単色化した X線を用いた X線CT観察は、X線線吸収係数 (X-ray linear absorption coefficient) 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。前年の測定より、スクロースやデキストリンといった糖類と水からなるガラス相の線吸収係数値と組成と間の相関関係を見出した。今回の測定では、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、また、乾燥過程におけるマイクロ構造がこれとどのように相関しているかについて検討した。デキストリン水溶液の凍結乾燥過程を分析したところ、氷の昇華と濃縮相からの脱水は逐次的に進行し、凍結濃縮相のガラス状態に依存して乾燥過程においてマイクロ構造が新たに形成していく過程を確認できた。これは乾燥製品の品質と強く関わる構造形成が凍結過程だけでなく乾燥過程にも進行していることを裏付ける結果であり興味深い。

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 :

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、過去2年にわたり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を試みてきた。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、製剤や食品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凍結濃縮相内の状態変化の結果と考えられる。凍結乾燥過程における凍結濃縮相内の状態は、糖やタンパク質が多く使用される凍結乾燥製品においてガラス状態であることがほとんどである。このガラス相の状態は品質に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例はその測定の困難さのためにほとんどなされてこなかった^[3]。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(ガラス構造)を評価できることが望ましい。本測定ではこれを目指す。

今回の測定では、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、ならびに乾燥過程におけるマイクロ構造がこれとどのように相関しているかについて検討した。単色化した X線を用いた CT観察を実施することにより、再構成画像中の輝度値として得られる線吸収係数を指標として画像中のガラス構造の評価を実施した。

実験：

測定試料は、20 wt%のデキストリン (DE=11) 水溶液を調整して用いた。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急速に凍結させた。凍結させた試料を -5°C の電気恒温槽中で 0–30 時間保持した (アニーリング)。一定時間のアニーリングを経た試料は -80°C のフリーザー中で保管し、その後の乾燥実験に使用した。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速やかにセットし、試料ステージを透明なアクリル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。その後、ステージ温度が約 -10°C 程度を維持するように温調設定し、およそ 3 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釣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特性) 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、乾燥中の装置内部の真空度は約 10–15 Pa で推移していた。X 線 CT 観察において、使用 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。

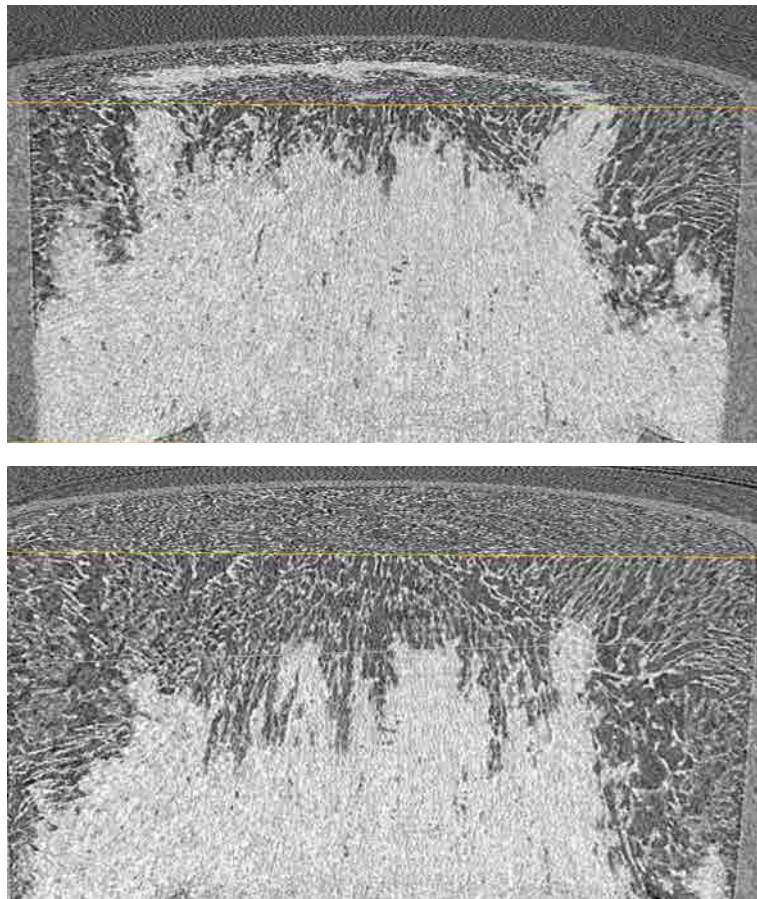


Fig. 1 デキストリン水溶液の凍結乾燥過程の CT 像 (アニーリング時間 12 時間；乾燥 1 時間経過後 (上)，乾燥 1 時間 15 分経過後 (下))

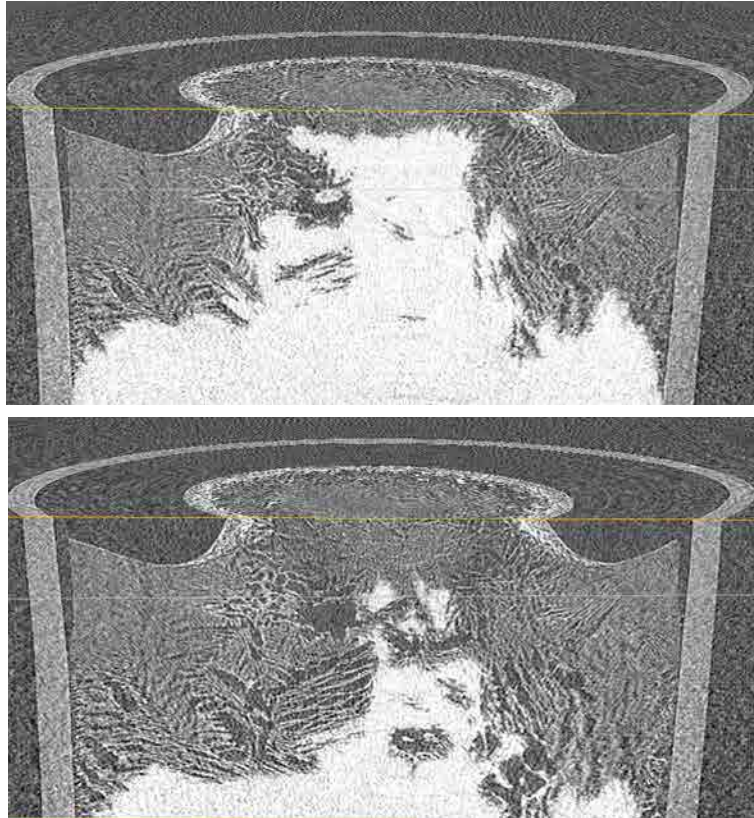


Fig. 2 デキストリン水溶液の凍結乾燥過程の CT 像(アニーリング無し；乾燥 1 時間経過後(上)，乾燥 1 時間 15 分経過後(下))

結果および考察：

一般に，溶液は凍結によって氷結晶と凍結濃縮相とに分相しマイクロ構造が形成する．凍結乾燥過程においては溶液中の氷の昇華が進行する一次乾燥過程と，濃縮相からの脱水が進行する二次乾燥過程とに分けられる．凍結濃縮相は凍結直後には最大限に凍結濃縮された状態ではなく，緩和過程を経て最大限まで凍結濃縮される．アニーリング過程はオストワルドライプニングによる氷晶の粗大化と，凍結濃縮相の緩和が進行する過程である．従って凍結乾燥過程における凍結濃縮相からの脱水は，この緩和の程度によってその速度が変化することが推測される(ガラス転移点の違いにより)．また，緩和が十分でない凍結試料においては，脱水に伴ってマイクロ構造が形成するという機序も考えられる．Fig. 1 に 12 時間のアニーリング過程を経た試料の凍結乾燥過程における X 線 CT 像を示す．ここから分かるように氷結晶と凍結濃縮相から形成されるマイクロ構造を保持したまま，氷晶が昇華によって取り除かれていく様子を確認することができる．比較的サイズの揃った氷結晶・孔隙の形成が特徴的である．一方，Fig. 2 に示すアニーリングを経ていない試料の凍結乾燥過程では，非常に微細なマイクロ構造の形成と大きな孔隙の形成が特徴的である．この大きな孔隙は未乾燥の領域に確認することができず，凍結濃縮相からの脱水によって形成した構造と考えられる．凍結濃縮相の緩和が十分でない場合，この相の示す見かけの蒸気圧は最大限に凍結濃縮された相の示す蒸気圧よりも高いことが推測される．この場合，氷の昇華と同程度かそれ以上の速度で脱水が進むことが推測され，この脱水に伴うガラス相の形成がマイクロ構造を形成させるというメカニズムを考えることができる．これは凍結時に形成した氷晶がそのままレプリカとなって凍結乾燥物のマイクロ構造を形成するという従来考えられてきたメカニズムとは別のメカニズムを示唆している．すなわち，一見同等の凍結乾燥製品であっても，内部に形成メカニズムの異なる構造領域が含まれていることを示唆している．

Fig. 3 に先の試料の乾燥後の断面像を比較する．アニーリングを経ていない凍結乾燥試料(写真右)には，高密度領域の形成が顕著である．この領域はおそらく緩和が不十分な凍結濃縮領域から脱水によって形成した構造と考えられる．12 時間のアニーリングを経て作成した試料(左)にはこ

のような領域は多く見られない。これらの構造形成は不連続な孔隙形成に特徴が見られる。これを評価するためにこれらの画像を基に空隙性(lacunarity)を算出した。ここで空隙性(lacunarity)とはフラクタルな構造に満たされた空間の割合のことであり、空間の空き具合が異なるフラクタル構造物の評価指標となる。Fig. 3の左、右写真の構造のフラクタル次元(ボックスカウンティング法により算出)はいずれも1.8であったが、空隙性はそれぞれ0.12と0.14であり、マイクロ構造の差異を数値として見る事ができた。

今回の測定で、氷晶の昇華によるマイクロ構造形成と別に、凍結濃縮相からの脱水に伴うマイクロ構造形成を観察できた。これらの形成機序のことなるマイクロ構造は、それらが示す物性と強く関わっていると推測できる。今後これらの評価を通じて、凍結乾燥製品の品質と関わる物性制御への糸口を掴みたい。

まとめ：

凍結乾燥過程における構造変化の *in-situ* な X 線 CT 観察を可能とした装置システムを用いて、凍結組織の微細構造変化を追跡した。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、また、乾燥過程におけるマイクロ構造がこれとどのように相関しているかについて検討した。デキストリン水溶液の凍結乾燥過程において、氷の昇華と濃縮相からの脱水は逐次的に進行し、凍結濃縮相のガラス状態に依存して乾燥過程においてマイクロ構造が新たに形成していく過程を確認できた。氷晶の昇華によるマイクロ構造形成と、凍結濃縮相からの脱水に伴うマイクロ構造形成という、形成メカニズムの異なる構造領域が凍結乾燥製品中に含まれる可能性を示唆している。これは乾燥条件が乾燥製品の品質と強く関わっていることを裏付ける結果であり、凍結乾燥製品の品質と関わる物性制御の糸口と期待される。

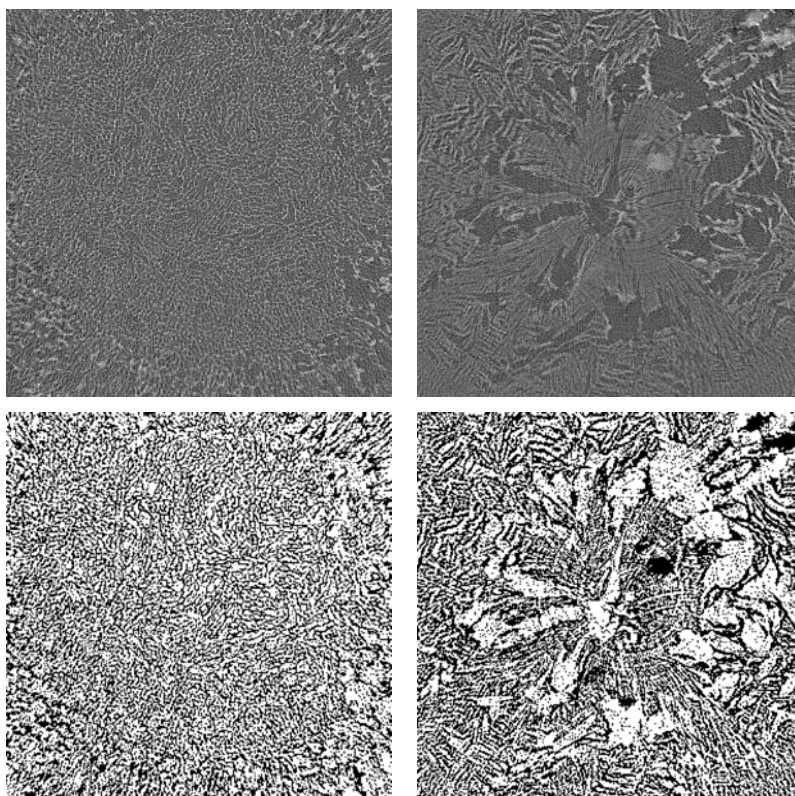


Fig. 3 凍結乾燥後試料の CT 像(アニーリング無し(右) ;アニーリング 12 時間(左))

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.