

3-4 供試材料と実験方法

3-4-1 供試材料

細胞膜水伝導係数の測定対象として、ハウレンソウ(メガトン)の葉細胞プロトプラストを選択した。ハウレンソウは東京大学・生物プロセス工学研究室にて26日間、養液栽培されたものを用いた。

プロトプラストの作成手順は第2章における2-2-4-2プロトプラストの作成方法で述べた方法とほぼ同一である。異なる点は、酵素液の構成がマンニトール0.6M、セルラーゼオノヅカ1.0%、マセロザイム0.05%であったこと、また振盪時間が3時間であり、プロトプラストの洗浄に用いたマンニトール溶液の濃度が0.6Mであったことである。

プロトプラストは3回目の洗浄の後、0.4Mのマンニトール溶液中に密度が $10^4/\text{ml}$ となるように懸濁した。作成したプロトプラストを約1時間静置して、0.4Mのマンニトール溶液と浸透圧平衡状態にした後、実験に供試した。

3・4・2 従来法による水伝導係数測定(対照実験)

二層流式水伝導係数測定法の測定精度について検討するために、対照実験として、Leibo(1980)の手法を参考にマイクロスライドを作成して水伝導係数測定を行った。作成したマイクロスライドの図面を Fig.3-13 に示した。マイクロスライドは厚さ 2.0mm、幅 60mm、奥行き 25mm のアクリル板の中央に、厚さ 1mm、幅 3mm のアクリル板 2 枚(Fig.3-13、黄色部分)を 1mm の間隙を空けて接着し更にその上から厚さ 2.0mm、幅 7mm のアクリル板(Fig.3-13、淡青色部分)を接着して作成した。以上のように作成したマイクロスライドには上部より観察すると幅 1mm、深さ 1mm、長さ 25mm の空隙が存在することになる。

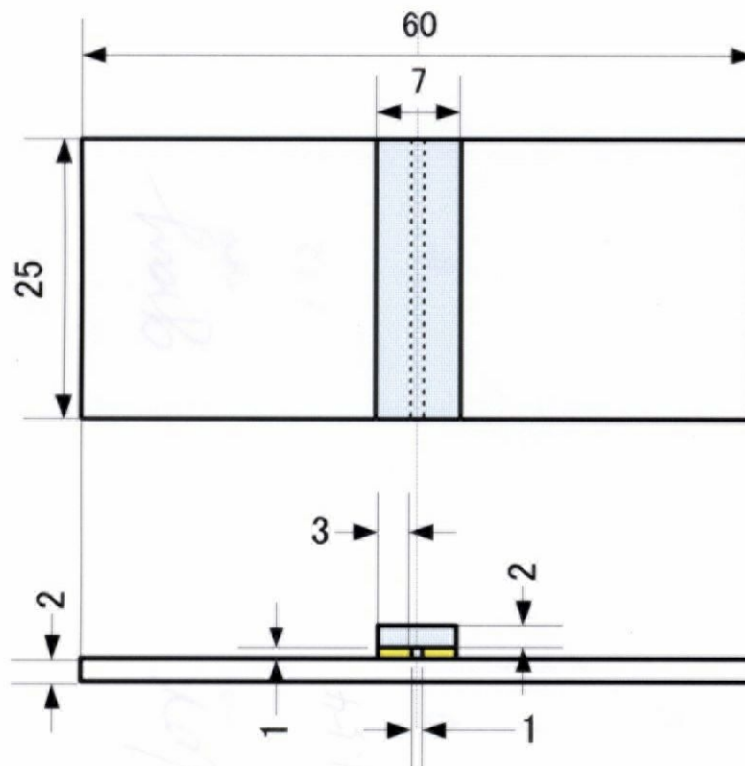


Fig.3-13 作成したマイクロスライドの図面

マイクロスライドを用いた水伝導係数測定の手順は以下のとおりである。まずマイクロスライドの空隙に **0.6M** のマンニトール溶液を満たした。その後、ホウレンソウプロトプラストを懸濁した **0.4M** のマンニトール溶液 **2.0 μ l** を、マイクロピペットにて空隙の **0.6M** マンニトール溶液に注入した。顕微鏡の視野と焦点を調整しながらプロトプラストを観察し、ビデオレコーダに記録した。

Fig.3-14 は作成したマイクロスライドの写真である。

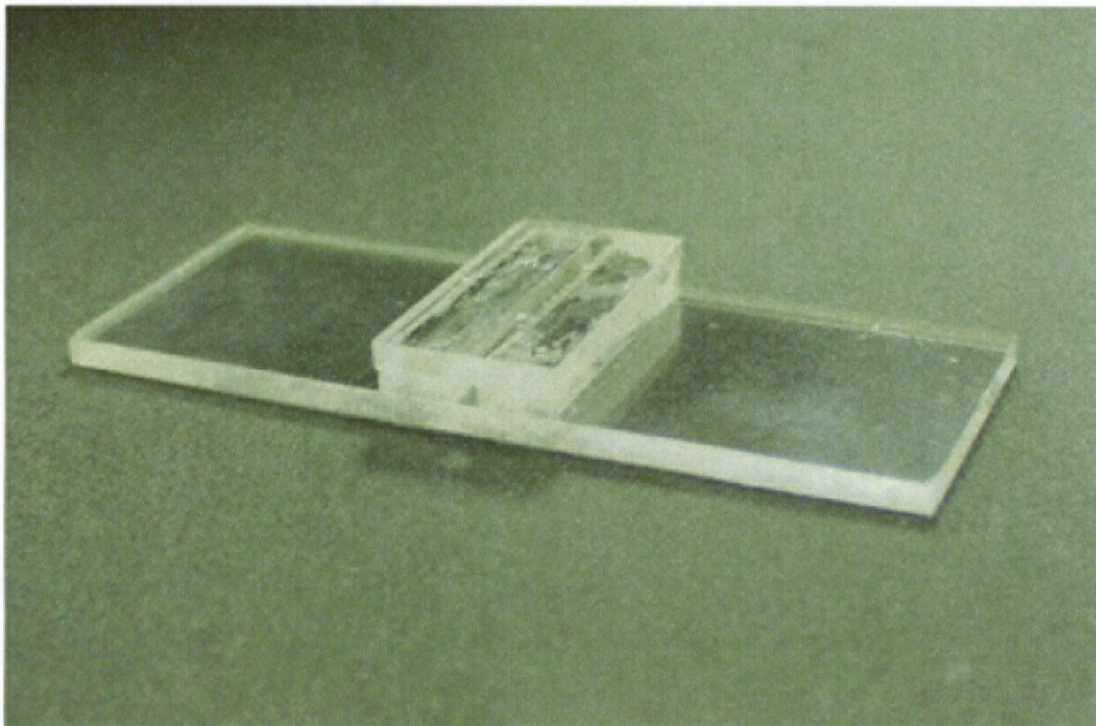


Fig.3-14 作成したマイクロスライド

3-4-3 二層流式水伝導係数測定法による水伝導係数測定

3-4-3-1 装置の設置

二層流セルを用いる際はあらかじめ、セル内へのメンブレンフィルタの設置、溶液の導入などの準備が必要となる。以下にその手順を述べる。

初めに二層流セルに接続された 2 つの溶液タンクにそれぞれ 0.4M、0.6M のマンニトール溶液を満たした。その後メンブレンフィルタを装着しない状態で 2 つのニードルバルブを開きセルに溶液を流し気泡を取り除いた。その後ニードルバルブと排液チューブに取り付けられたローラーランプを閉じ、二層流セルを上部と下部に分離した。セル内部の溶液の流れを止めた状態にて、およそ 5mm 四方に裁断したメンブレンフィルタを、二層流セル下部の垂直坑に被せた (Fig.3-15)。その後、ニードルバルブを微小に開き Fig.3-15 に示したように、二層流セル上部の垂直坑よりわずかに溶液を流出させた。この状態で二層流セルの上部と下部を結合させることにより、流路内に気泡を入れることなくメンブレンフィルタを設置した。

二層流セル内にメンブレンフィルタを設置した後、ニードルバルブにより 2 種の溶液の流量を調節し、垂直坑内に二層流を形成させた。メンブレンフィルタ設置時に 2 種の溶液はセル内で混合したと考えられることから、セル内部の溶液が新しく導入された 2 種の溶液により置換されるまで、装置を静置した。

また溶液の流れが速すぎるとメンブレンフィルタ上にて細胞(プロトプラスト)が破壊され、遅すぎると二層流の境界面が鮮明でなくなる問題があることから、溶液タンクと排液口を適切な高低差に調整し、溶液の流量を調整した。高低差は 20cm とした。またこのとき溶液タンクの溶液減少速度から、二層流セル垂直坑内の平均流速は、2.7[m/s]と計算された。

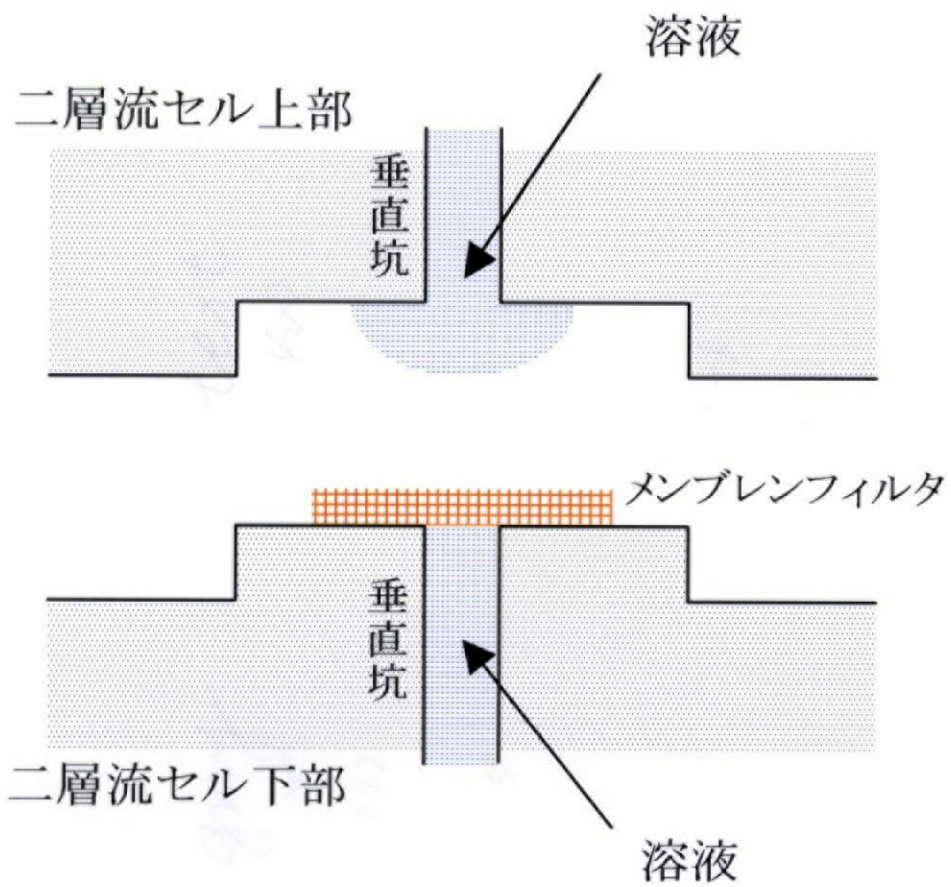


Fig.3-15 二層流セルの設置

3-4-3-2 試料細胞(プロトプラスト)の導入

二層流セル内への試料となる細胞(プロトプラスト)の導入時の写真を Fig.3-16 に示した。試料の導入にはまず、プロトプラスト懸濁液 $1.0\mu\text{l}$ を液体用シリンジにて採取した。その後、二層流セルの 0.4M マンニトール溶液導入部に接続されたタイゴンチューブにシリンジの針を刺し、チューブ内にプロトプラスト懸濁液を注入した。注入されたプロトプラストは二層流セルに流入しメンブレンフィルタ上に固定された。

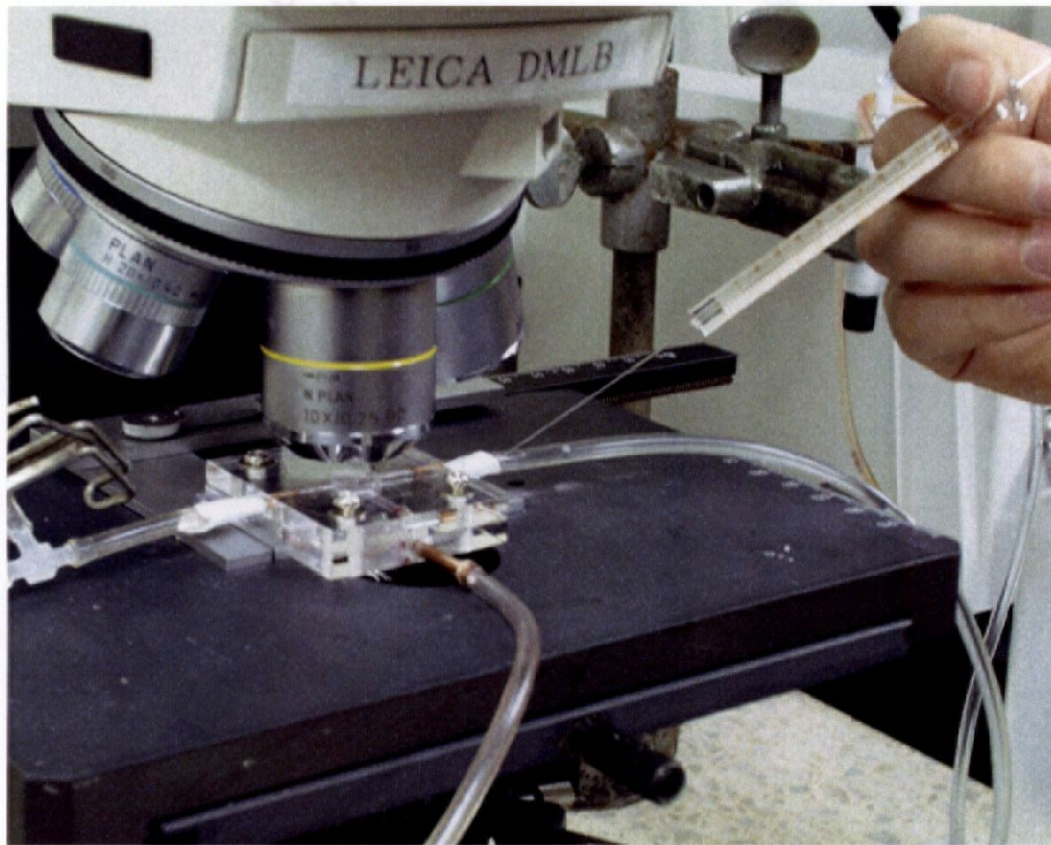


Fig.3-16 二層流セルへの細胞(プロトプラスト)の導入

3-4-3-3 試料細胞(プロトプラスト)の体積変化測定

前述の手法にてプロトプラストを二層流セルに導入すると、二層流セル内のメンブレンフィルタ上には10個前後のプロトプラストが固定される。プロトプラスト導入の確認後、観察の容易なプロトプラストを選び顕微鏡の視野と焦点を調節した。ビデオレコーダによる撮影を開始した後、ニードルバルブを操作することにより二層流の境界面を動かし、プロトプラストの周囲の溶液を0.4M マンニトール溶液から0.6M マンニトール溶液へと瞬時に置換した。溶液の置換から約5分間、測定を継続した。Fig.3-17 に二層流セル内に導入されたプロトプラストの写真を示した。

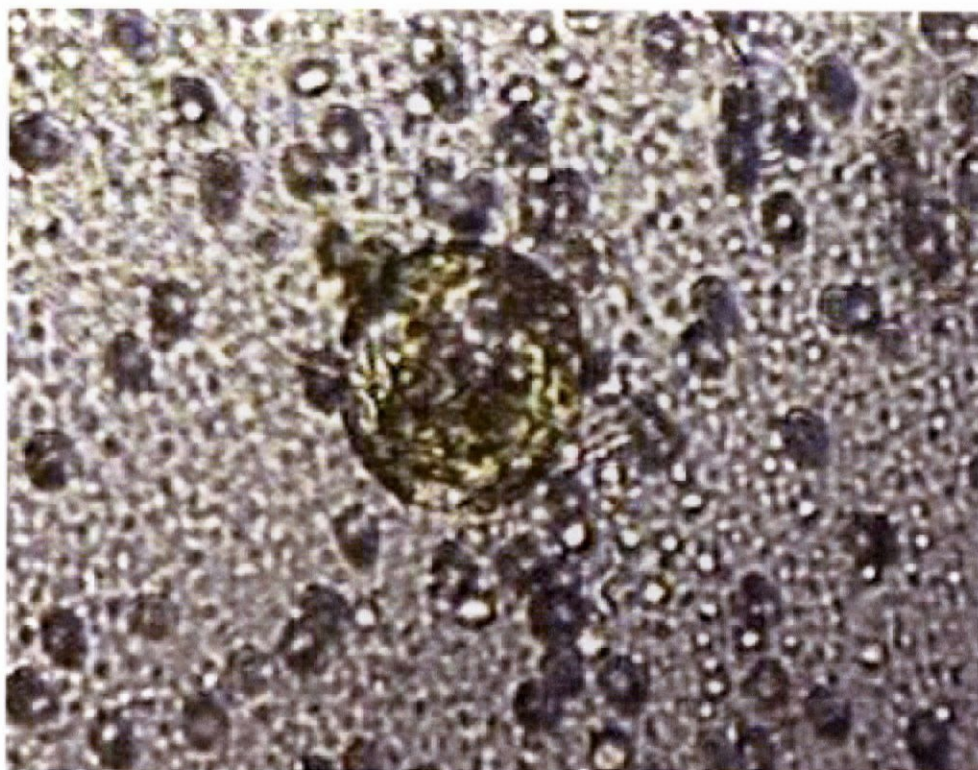


Fig.3-17 セル内に導入されたプロトプラスト

3-4-4 細胞(プロトプラスト)体積の算出方法

ビデオレコーダにより記録された細胞(プロトプラスト)の映像から、次に述べる方法でプロトプラスト体積を算出した。

はじめにビデオレコーダから **IEEE1394** インターフェイスを経由して、計算機に映像を転送した。計算機内では映像を **AVI** 形式ファイルで保存した。保存された **AVI** 形式ファイルより、5 秒から 30 秒の間隔で静止画を抽出し、**Windows** 形式 **Bitmap** ファイル(24bit 色)にて保存した。以上の操作に用いた計算機ソフトウェアは **Adobe** 社製、**Premire6.0** である。

保存された静止画より輝度情報を抽出したのち、中間値フィルタによりノイズを取り除いた。その後、8 方向ラプラシアンフィルタを用いて輝度情報の 2 次微分画像を求め、2 次微分画像を二値化することによりプロトプラストの輪郭を抽出した。得られた輪郭画像と元の静止画を合成表示させ、プロトプラストの輪郭以外の部分、例えばプロトプラスト内部の葉緑体の輪郭、またメンブレインフィルタの穴の輪郭、等を消去した。プロトプラストを球体と仮定すると、その投影であるプロトプラスト画像は円であるとみなせることから、得られたプロトプラスト輪郭画像に対して、円の方程式の最小自乗近似を行った。以上の操作に用いた計算機ソフトウェアは、**Microsoft** 社製、**Visual C++6.0** を用いて作成した。

以上の操作にて、プロトプラストの半径を画像のピクセル数として得た。あらかじめマンニトール溶液中のマイクロスケールにより求めたピクセルの大きさからプロトプラスト半径を求め、プロトプラストの体積を計算した。

3・4・5 水伝導係数の算出方法

測定されたプロトプラストの体積変化より、細胞膜の水伝導係数を算出した。その手法を以下に述べる。まず式 3・10 における細胞表面積 A は細胞の体積とともに変化するが、既往の研究においては定数近似している。本研究では細胞表面積 A を体積の関数として表し、式 3・10 に代入して次に示す式を得た。

$$\frac{dV(t)}{dt} = -\frac{L_p RT \chi_e^s}{v_w} \cdot 4\pi \left(\frac{9}{16\pi^2} \right)^{\frac{1}{3}} \{V(t)\}^{\frac{2}{3}} \frac{V(t) - V_\infty}{V(t) - V_b} \quad (3-27)$$

式 3-27 における水伝導係数 L_p にある値を与え、4 次の Runge-Kutta 法により体積応答関数 $V(t)$ を数値的に作成した。ある時刻 t_j に実測されたプロトプラストの体積を V_j とし、体積応答関数より求められる $V(t_j)$ との偏差二乗和は水伝導係数 L_p の関数 $E(L_p)$ となり、次に示す式にて表される。

$$E(L_p) = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n \{V_j - V(t_j)\}^2 \quad (3-28)$$

式 3-28 において n はプロトプラスト体積データの数である。 $E(L_p)$ は測定された体積データを式 3-27 の解に回帰する際の評価関数であるから、 $E(L_p)$ を最小にする L_p をもって、測定したプロトプラストの水伝導係数とした。 $E(L_p)$ の最小値を与える L_p は最急降下法にて求めた。最急降下法を用いる際には、初期値の与え方によりローカルミニマムを最小値として求めてしまう可能性がある。この問題を回避するため、あらかじめ L_p を試料細胞の細胞膜水伝導係数として考えられる範囲 ($1.0 \times 10^{-16} \sim 5.0 \times 10^{-13}$) まで変化させ、評価関数のグラフを作成した。評価関数のグラフの一例を Fig.3-18 に示した。評価関数のグラフより初

期値を決定した。

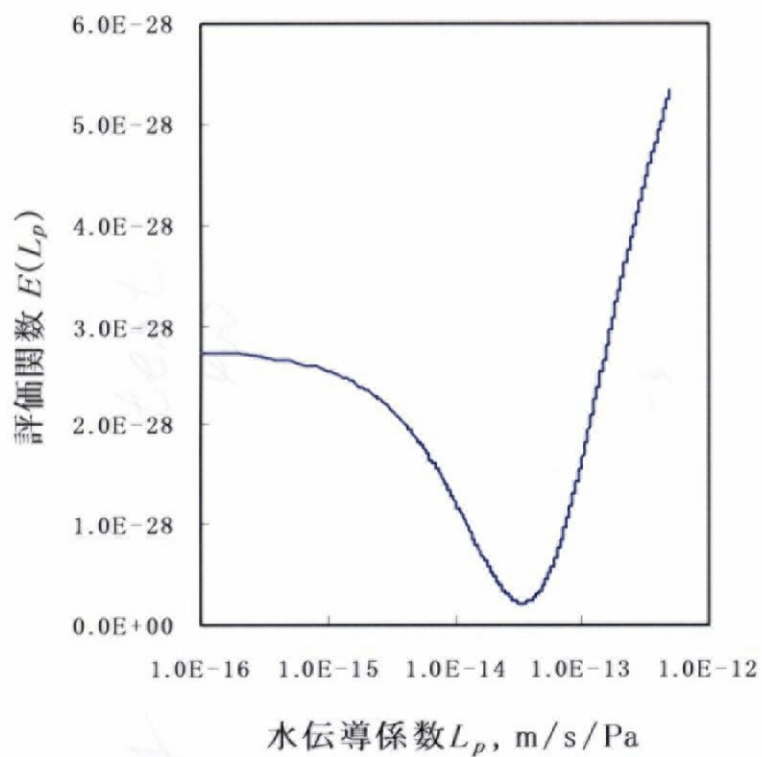


Fig.3-18 評価関数

3-5 結果および考察

3-5-1 従来法による水伝導係数測定結果

従来法による測定は 3 回行った。測定された体積変化と求めた水伝導係数を以下に示す。

1 回目の体積変化の測定結果を Fig.3-19 に示した。Fig.3-19 より、プロトプラストの体積減少が、測定開始から 50 秒ほど送れて起きていることが分かる。これはプロトプラスト外部溶液の置換における時間遅れのためと考えられる。この測定から求めた細胞膜の水伝導係数は $0.032[\text{pm}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{Pa}^{-1}]$ であった。

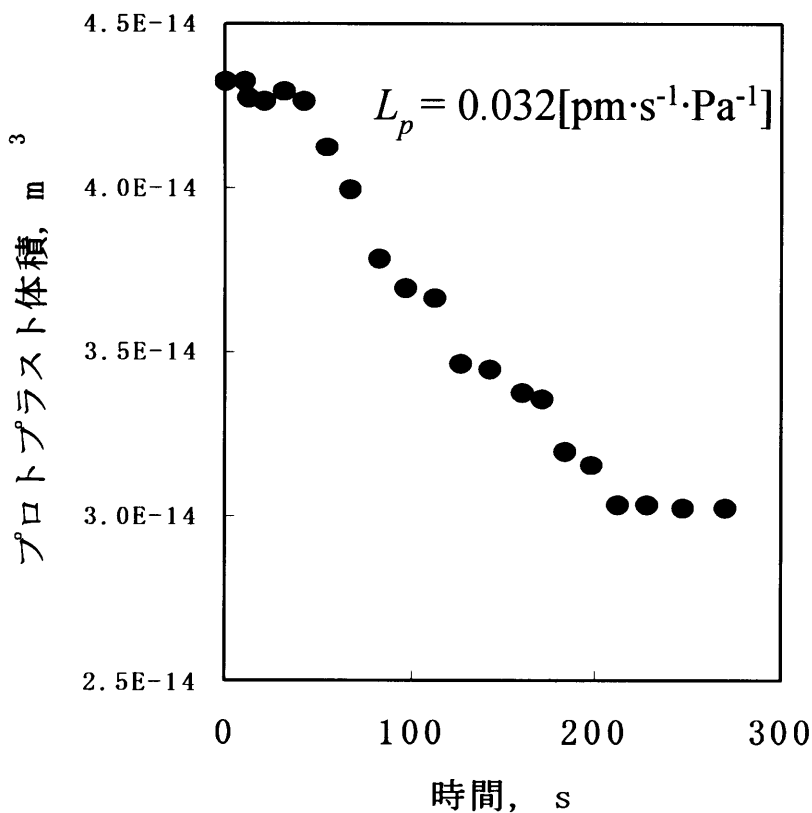


Fig.3-19 従来法による測定結果(1)

2 回目の体積変化の測定結果を Fig.3-20 に示した。この測定ではプロトプラストの体積減少が測定開始から約 10 秒で始まっている。1 回目の測定と比較して体積応答の時間遅れが少ないが、これはプロトプラストを高張液に注入した際に、プロトプラストの周囲に溶液の流れが発生したことにより、溶液がすばやく混合したためと考えられる。この測定から求めた細胞膜の水伝導係数は $0.065[\text{pm}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{Pa}^{-1}]$ であった。

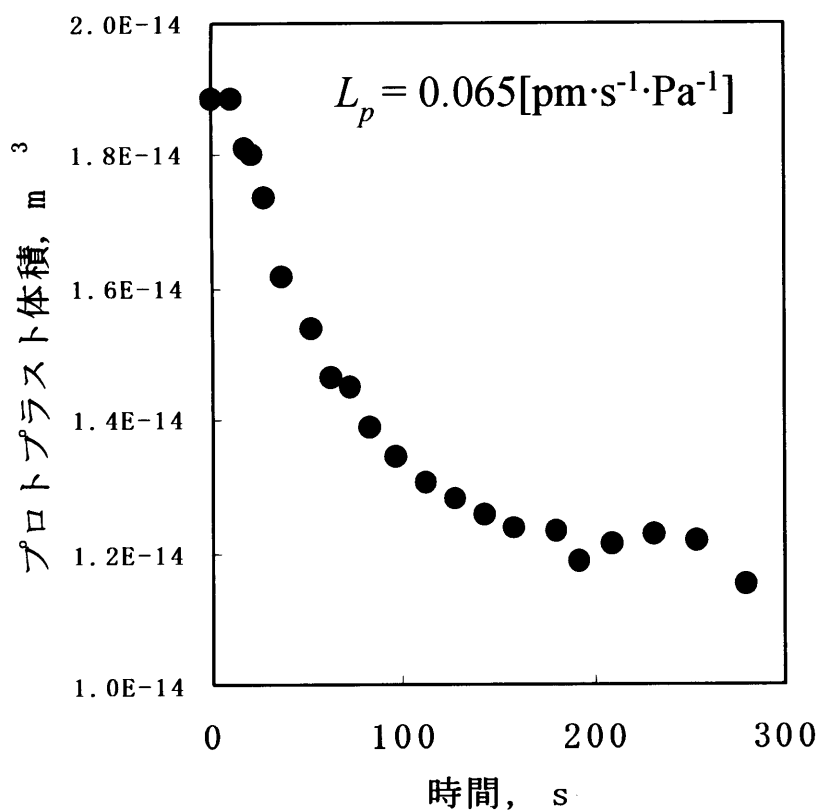


Fig.3-20 従来法による測定結果(2)

3回目の体積変化の測定結果を Fig.3-21 に示した。1回目の測定と同様に際プロトプラストの体積応答に時間遅れが見られる。この測定から求めた細胞膜の水伝導係数は $0.055[\text{pm} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}]$ であった。この測定では 150 秒以降でプロトプラスト体積が増減するが、これは球形であったプロトプラストが収縮により歪んだため、撮影された画像から体積を算出する段階での誤差が大きくなったためと考えられる。

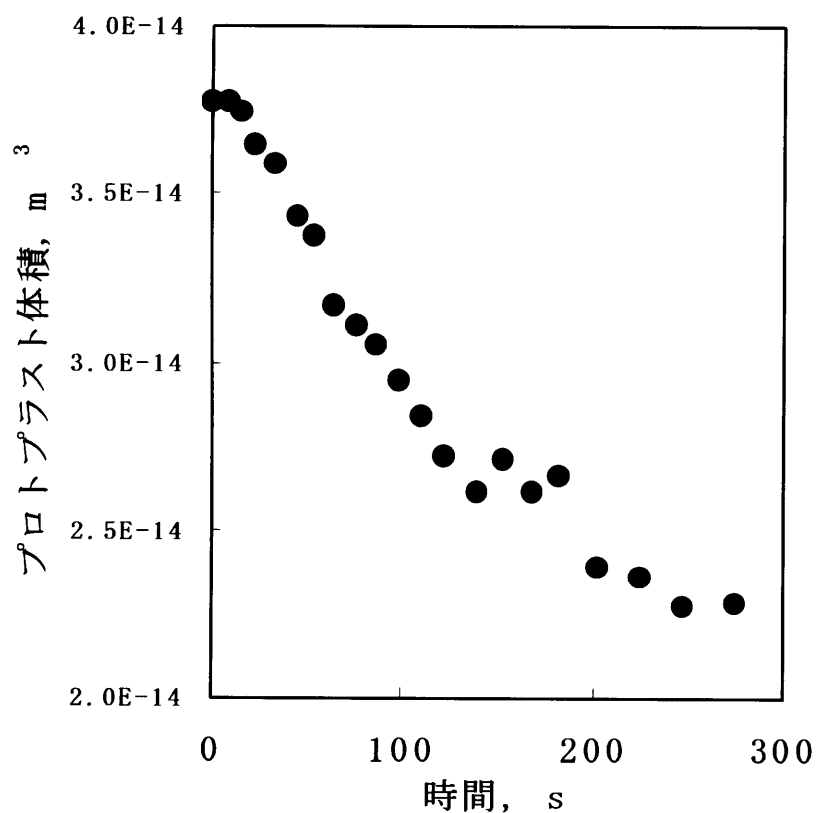


Fig.3-21 従来法による測定結果(3)

3-5-2 二層流式水伝導係数測定法による水伝導係数測定結果

二層流式水伝導係数測定法による測定は2回行った。測定された体積変化と求めた水伝導係数を以下に示す。

1回目の体積変化の測定結果を Fig.3-22 に示した。Fig.3-22 より、プロトプラストの体積は、測定開始直後に減少し始めていることがわかる。このことからプロトプラストの外部溶液が測定開始の後、直ちに置換されていることが分かる。よって従来の測定法における大きな測定誤差の要因であった外部溶液の置換における時間遅れは、ほぼ排除されたと考えられる。この測定から求めた細胞膜の水伝導係数は $0.075[\text{pm}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{Pa}^{-1}]$ であった。

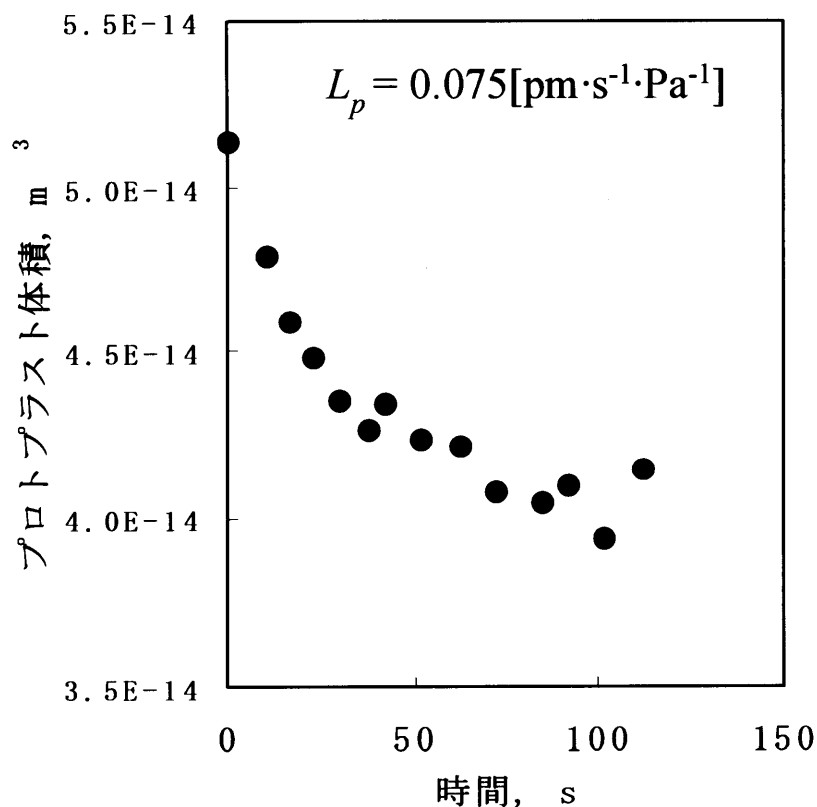


Fig.3-22 二層流式水伝導係数法による測定結果(1)

2回目の体積変化の測定結果を Fig.3-23 に示した。1回目の測定と同様にプロトプラストの体積応答に時間遅れが見られない。この測定から求めた細胞膜の水伝導係数は $0.073[\text{pm}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{Pa}^{-1}]$ であった。

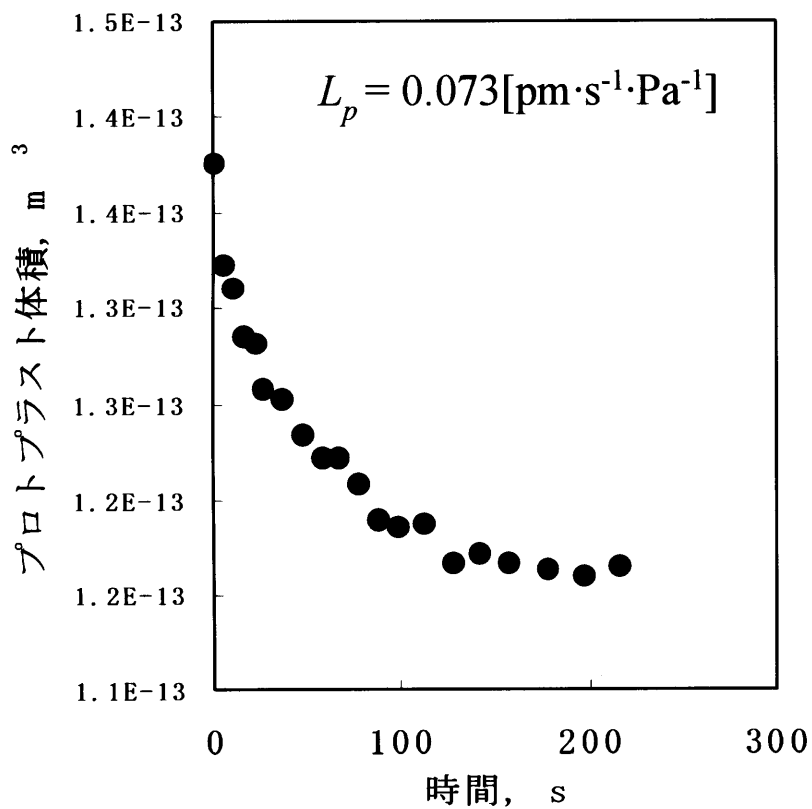


Fig.3-23 二層流式水伝導係数法による測定結果(2)

3-5-3 水伝導係数測定結果の比較

従来の水伝導係数測定法と二層流式水伝導係数測定法による測定結果を比較した。Fig.3-24 に測定された水伝導係数を示した。Fig.3-24 より従来の測定法により得られた水伝導係数は、二層流式水伝導係数により得られた値に比べて全体的に小さいことが分かる。また従来の測定法による値は測定ごとの違いが大きいことが分かる。

また二層流式水伝導係数測定法により測定された値の平均値 $0.074[\text{pm}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{Pa}^{-1}]$ を真の値と仮定し、3-2-5 節と同様の手法にて計算機シミュレーションより予測された従来法による測定値は約 $0.02[\text{pm}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{Pa}^{-1}]$ となった。これは外部溶液の混合が完全に拡散のみによると仮定した場合の値である。実際の従来法による測定では、外部溶液の混合時間遅れは様々な要因により変化すると考えられる。また外部溶液の置換が完全に拡散のみによることはないと考えられる。よって従来法による測定値は $0.02[\text{pm}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{Pa}^{-1}]$ より若干大きい値から、真の値と仮定した $0.074[\text{pm}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{Pa}^{-1}]$ より小さい値の間に分散すると考えられる。Fig.3-24 より、水伝導係二層流式水伝導係数による測定値を真の水伝導係数と仮定した場合に予測される範囲に、従来法による測定値が分散していることがわかる。

以上に述べた事と、二層流式水伝導係数測定法により得られたプロトプラストの体積応答曲線に時間遅れが見られないことを考慮すると、二層流式水伝導係数測定法の精度は従来法に比べて大いに向上していると考えられる。

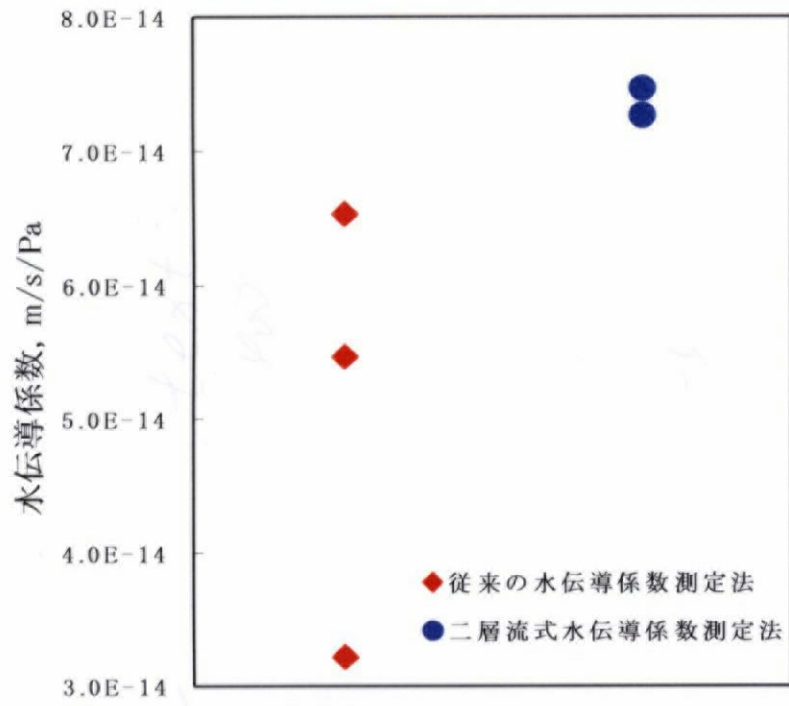


Fig.3-24 測定結果の比較

3-6 摘要

葉菜類組織内部の水移動に大きな影響を及ぼすと考えられる細胞膜の水伝導係数を測定するため、既往の研究における水伝導係数測定法について検討した。その結果、測定精度が高い手法では試料が大量に必要なため、葉組織から試料を取り出しての測定には向かないと考えられた。また少量の試料で行える測定法では、葉細胞の細胞膜水伝導係数の変化を捉えるために必要な測定精度が得られない可能性が高いことが判明した。そのため必要な試料が少量であり、かつ測定精度の高い新しい水伝導係数測定法が必要であるとの判断に至った。

従来の少量の試料で行える測定法において、測定精度を低下させる原因は、試料となる細胞の周囲の溶液を置換する際の時間遅れが不確定であることであった。そのため細胞周囲の溶液を速やかに置換することが可能な二層流式水伝導係数測定法を考案し、また測定装置を開発した。この測定法では浸透圧の異なる二種の溶液が、混合せず層流として流れる流路内に試料となる細胞を固定した。二種の溶液それぞれの流量を調節することにより二層流の境界面を動かすことにより、細胞周囲の溶液を一方の溶液から他方の溶液へ速やかに置換する事を可能とした。

二層流式水伝導係数測定法と従来法により測定を行い、細胞の浸透圧変化に対する体積応答と、そこから得られた水伝導係数を比較した結果、新たに開発した二層流式水伝導係数測定法は従来法に比べて、大いに測定精度が向上していると判断された。

第4章 結論

4-1 本研究で得られた結果

本研究では葉菜類の鮮度保持に関する研究を進める上で重要と考えられる、生体内の水の状態や組織内部の水移動を把握する事を目的とし、以下に述べる成果を得た。

第2章において、貯蔵による細胞内水の動的状態と、生体膜の状態の変化を明らかにすることを目的とし、モデル試料としてオオムギ子葉を用い、 $^1\text{H-NMR}$ による縦緩和時間 T_1 およびオオムギ子葉プロトプラストの低張液への耐性を測定した。 T_1 の測定から、オオムギ子葉中には約 **700ms** の長い T_1 を示す水と、約 **300ms** の短い T_1 を示す水が存在することが確認され、子葉の貯蔵中に長い T_1 を示す水の存在比が減少することが明らかになった。このときの試料の目減りが最大でも約 **2.5%**であったことから、この存在比の変化は貯蔵中に、長い T_1 を示す液胞内部の水が細胞質へ漏出し短い T_1 を示す水に変化したためと考えられた。また、プロトプラストの低張液耐性の測定から、オオムギ子葉細胞の低浸透圧耐性が貯蔵により低下することを明らかにした。これは細胞の浸透圧調節機能の低下および細胞膜の物性の変化が起こったためと考えられた。またプロトプラストの低浸透圧耐性における個体差の変化から、低浸透圧耐性の低下に二つの過程が存在することを明らかにした。これは液胞膜の機能低下による低浸透圧耐性の低下と、液胞からの水分漏出による細胞膜の機能低下を表していると考えられた。以上に述べた **NMR** による T_1 測定の結果とプロトプラストの低浸透圧耐性の測定結果から、オオムギ子葉においては切出し直後に、液胞膜の劣化が起こることにより、液胞内部の水が細胞質へ漏出し、それにより細胞膜の

機能低下が引き起こされると考えられた。また同様の現象が葉菜類においても起こると仮定すると、葉菜類の貯蔵においては、全体的な水分損失が無い状態でも液胞から細胞質への水分流出により膨圧の低下や細胞全体の劣化が起こり、萎れや品質低下を招く可能性があることが考えられた。よって葉菜類の貯蔵においては液胞からの水分の漏出を防ぐことにより、より長期にわたる鮮度保持が可能となると考えられた。

第 3 章において、葉細胞の定量的な物性値を得るために、細胞膜水伝導係数の測定について検討した。既往の研究におけるいくつかの測定法について検討した結果、十分な測定精度が得られない可能性がある、もしくは大量の試料が必要なため、葉組織からプロトプラストを作成し、測定することは困難であると考えられた。そのため少量の試料による測定が可能であり、かつ測定精度の高い新たな水伝導係数測定法が必要であるという判断に達し、新たな測定法である二層流式水伝導係数測定法を考案し、測定装置(二層流セル)を開発した。この手法では二種の浸透圧が異なる溶液が、混合せずに層流として流れる流路内に試料細胞(プロトプラスト)を固定し、二種の溶液の流量を調節することにより、細胞周囲の溶液を一方から他方へと速やかに置換し、同時に試料を顕微鏡にて観察することが可能である。二層流式水伝導係数測定法と従来法にて、ハウレンソウプロトプラストの細胞膜水伝導計数を測定した結果、二層流式水伝導係数二層流式水伝導係数測定法では $0.073 \sim 0.075 [\text{pm} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}]$ 、従来法では $0.032 \sim 0.065 [\text{pm} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}]$ と測定された。二層流式水伝導係数測定法による測定値を真の値と仮定した際、計算機シミュレーションから予測された従来法による測定値の範囲に、従来法による実測値が分布した。以上のことと試料細胞の体積変化曲線の形状から、二層流式水伝導係数測定法では従来法と比較して大幅に測定精度が向上していることが示された。

4-2 今後の課題

本研究では葉菜類生体内部における水の動的状態の変化を調べるために、 $^1\text{H-NMR}$ を用いて生体内水の縦緩和時間を測定した。この測定より液胞から細胞質へ水が移動している可能性などは示せたものの、その水移動を更に深く知るために必要と考えられる、生体内水と生体膜、生体高分子との相互作用の変化などを解明するには至らなかった。また液胞膜の機能低下とそれに起因する細胞膜の機能低下による葉菜類の鮮度低下の仮説を立てたが、この仮説は未だ検証されていない。今後は生体内水の動的状態の測定について、測定法を検討し上記のことを明らかにし、また仮説について検証していく必要がある。

また水伝導係数測定においては、新たに開発した二層流セルにより測定が行えることが示せたが、二層流セルには改良すべき個所がいくつか存在する。まずセル流路内に気泡が付着しやすいという問題があった。これは流路内に親水処理を施すことにより解決できると考えられる。また今回作成した二層流セルでは流路断面積比の問題からメンブレンフィルタの穴における溶液の流速が非常に速くなり、試料細胞をフィルタ上に破壊されないように固定するための流速調節に多大な労力を割かねばならなかった。よって二層流セルの流路の構造も改善の余地があるといえる。

また新たに開発した二層流式水伝導係数測定法にて、貯蔵時の葉菜類細胞膜の水伝導係数変化などを測定し、さらに細胞膜水伝導係数の温度、浸透圧、溶質などに対する依存性について明らかにされる必要がある。

参考文献

安藤喬志, 宗宮 創: これならわかるNMR, 化学同人, 1998

Belton, P.S., Jackson, R.R., Packer, K.J.: Pulsed NMR Studies of Water in Striated Muscle I. Transverse Nuclear Spin Relaxation Times and Freezing Effects, *Biochemica et Biophysica Acta*, 286,16-25,1972

Curry, M.R., Redding, B.J. and Watson, P.F.: Determination of Water Permeability Coefficient and Its Activation Energy for Rabbit Spermatozoa, *Cryobiology*, 32, 175-181, 1995

Freeman, R.: A Handbook of Nuclear Magnetic Resonance, Longman Scientific & Technical, 1988

Gao, D.Y., McGrath, J.J., Jun Tao, Benson, C.T., Critser, E.S. and Critser, J.K.: Membrane transport properties of mammalian oocytes: a micropipette perfusion technique, *Journal of Reproduction and Fertility*, 102, 385-392, 1994

花沢智仁, 石川英撰, 宮脇長人: 誘電率法による細胞原形質膜水透過係数の測定, *低温生物工学会誌*, Vol.44, (2), 38-40, 1998

Hazlewood, C.F., Chang, D.C., Nichols, B.L., Woessner, D.E.: Nuclear Magnetic Resonance Transverse Relaxation Times of Water Protons in Skeletal Muscle, *Biophysical Journal*, 14, 583 - 606, 1974

Houghton, J.T., Jenkins, G.J., Ephraums, J.J: IPCC FIRST ASSESSMENT REPORT, Cambridge University Press, 1990

Ishikawa, E., Seoung-Kwon Bae, Miyawaki, O., Nakamura, K., Shinoki, Y., Ito, K.: Freezing Injury of Cultured Rice Cells Analyzed by Dielectric Measurement, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 83(3), 222-226, 1997-a

Ishikawa, E., Miyawaki, O. and Nakamura, K.: Water Permeability of Plasma Membrane of Cultured Rice, Grape, and CH27 Cells Measured Dielectrically, *Bioscience Biotechnology Biochemistry* 61(11), 1826-1830, 1997-b

加来章輔, 井上眞理: ¹H-NMR による植物体の水の動態研究, *植物の化学調節*, 28(2), 166-173, 1993

笠毛邦弘: 低温ストレスと生体膜, *研究ジャーナル*, 163(1), 7-13, 1993

隈本保子, 渡辺剛史, 井上眞理: 果実の成熟に伴う結合水と自由水の変動, *低温生物工学会誌*, 44(2), 98-106, 1998

黒田佐俊: ホウレンソウの目減り速度の推定, *園芸学会雑誌*, 46(3), 395, 1977

Lazan, H., Ali, Z.M., Mohd, A.A., Nahar, F.: Water Stress and Quality Decline during Storage of Tropical Leafy Vegetables, *Journal of Food Science*, 52, 1286-1288, 1987

Leibo, S.P.: Water Permeability and Its Activation Energy of Fertilized and Unfertilized Mouse Ova, *Journal of Membrane Biology*, 53, 179-188, 1980

Linke, M., Schreiner, M: Post Harvest Keeping Quality of Lettuce (*Lactuca sativa* L. var. *capitata* L.) –Measurement and Analysis of Climatic Factors and Transpiration-, *Gartenbauwissenschaft*, 60(5), 202-211, 1995

Mann, G.: Symposium on the control and measurement of humidity in cold stores. 5. The temperature and humidity in cold stores and the loss of water from stored produce, *Proceedings of the Institute of Refrigeration*, 48, 102-108, 1951

松嶋卯月, 大下誠一, 中西友子, 松林政仁, 瀬尾康久, 川越義則: カーネーション切り花内の水に対する無極性ガスの影響, *農業機械学会誌*, 62(5), 70-78, 2000

目黒孝司, 川原祥司, 相馬暁: 野菜の嗜好に関する消費者の意識調査(1985)(第4報)—ホウレンソウの品質に関する消費者の意識調査について—, 北海道園芸研究談話会報, 19, 44-45, 1986

Nobel, P., S.: *Physicochemical & Environmental Plant Physiology*, Academic Press, 1999

農林水産省統計情報部: 平成12年青果物卸売市場調査結果の概要, 2001

大久保増太郎: 商品としての野菜, 野菜の鮮度保持(第6版)(大久保増太郎編), 養賢堂, 1-38, 1993

大下誠一, 橋本篤, 瀬尾康久: 水の構造化による農産物の貯蔵(第1報), 農業機会学会誌, 58(1), 31-38, 1996

大下誠一, M.A.ラハマン, 川越義則, 瀬尾康久, 橋本篤: 水の構造化による農産物の貯蔵(第2報), 農業機会学会誌, 59(1), 29-35, 1997-a

大下誠一: 農産物の鮮度保持, 化学工学, 61(5), 20-22, 1997-b

大下誠一: 「機能水」による植物・農産物の制御, 計測と制御, 37(2), 1998

Oshita, S., Seo, Y., Kawagoe, Y.: Relaxation Time of Protons in Intracellular Water of Broccoli, *The CIGR Electronic Journal*, I, October, 1999

Platt-Aloia, K.A., Thompson, W.W.: Freeze-fracture Evidence of Gel-phase Lipid in Membrane of Senescing Cowpea Cotyledons, *Planta*, 163, 360-369, 1985

Schwartz, G.J. and Diller, K.R.: Osmotic Response of Individual Cells during Freezing II. Membrane Permeability Analysis, *Cryobiology* 20, 542-552, 1983

清水 碩: 植物生理学, 裳華房, 1996

- Singer, S.J., Nicolson, G., L.: The Fluid Mosaic Model of the Structure and Cell Membrane, *Science*, 175,720-731,1972
- Snaar, J.E.M., Van As, H.: Probing Water Compartments and Membrane Permeability in Plant Cells by ¹H-NMR Relaxation Measurements, *Biophysical Journal*, 63,1654-1658, 1992
- 鈴木健策: 老化と生体膜, 研究ジャーナル, 163(1), 23-27, 1993
- 隈本保子, 渡辺剛史, 井上真理: 果実の成熟に伴う結合水と自由水の変動, 低温生物工学会誌, 44(2), 98-106, 1998
- 樽谷隆之: 果実, そ菜の貯蔵, 日本食品工業学会誌, 10(5), 1963
- 樽谷隆之, 北川博敏: 園芸食品の流通・貯蔵・加工, 養賢堂, 1986
- Thimann, K.V.: A Proposed Integration of the Constituent Processes, *Plant Senescence* (Thompson, W.W. et al. eds.), The American Society of Plant Physiologists, Rockville, 1-19,1987
- Thompson, J.E., Mayak, M., Shinitzky, M., Halevy, A.H: Acceleration of Membrane Senescence in Cut Carnation Flowers by Treatment with Ethylene, *Plant Physiology*, 69,859-863,1982
- 上平 恒: 生体中の水,蛋白質・核酸・酵素, 21(7), 575-582, 1976
- 上平 恒, 逢坂 昭: 生態系の水, 講談社サイエンティフィック, 133-166, 1997
- Wells, A.W.: Storage Temperature and Humidity on Loss of Weight by fruit, *Marketing Research Report No.539, U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE Agricultural Marketing Service Market Quality Research Division*, 1962
- Wills, R.B.H., Lee, T.H., Graham, D., McGlasson, W.B. and Hall, E.G.: *Postharvest*, New South Wales University Press Limited, 1982

山田常雄, 前川文夫, 江上不二夫, 八杉隆一, 小関治男, 古谷雅樹, 日高敏隆
編集: 岩波生物学辞典, 岩波書店, 1993

山崎昌一: 脂質膜上における分子認識, 生体膜のダイナミックス (八田一郎, 村田
昌之編), 共立出版, 63-81, 2000

Yao, K.N., Paliyath, G., Thompson, J.E.: Nonsedimentable Microvesicles
From Senescing Bean Cotyledons Contain Gel Phase-Forming
Phospholipid Degradation Products, *Plant Physiology*, 97(2), 502-508, 1991

Yoshino, T., Sotome, I., Ohtani, T., Isobe, S., Oshita, S., Maekawa, T.:
Observation of xenon gas-treated barley cell in solution by atomic force
microscopy, *Journal of Electron Microscopy*, 49(3), 483-486, 2000

Zhang, W.H., Jones, G.P.: Water Permeability in Wheat Root Protoplasts
Determined from Nuclear Magnetic Resonance Relaxation Times, *Plant
Science*, 118, 97-106, 1996

謝辞

本研究を遂行するにあたりましては、東京大学大学院農学生命科学研究科生物・環境工学専攻瀬尾康久教授には終始適切なお指導また懇切なる御校閲を賜りました。ここに深くお礼申し上げます。

東京大学大学院農学生命科学研究科生物・環境工学専攻大下誠一助教授には終始適切なお指導、御校閲および貴重な御助言を頂きました。ここに深く感謝の意を表します。

東京大学大学院工学系研究科精密機械工学専攻鳥居徹助教授には実験装置の作成にあたって懇切なお指導、および貴重な御助言を賜りました。ここに深くお礼を申し上げます。

本論文をまとめるにあたりましては、東京大学大学院農学生命科学研究科生物・環境工学専攻芋生憲司助教授および後藤英司助教授には貴重な御助言、御指摘を頂きました。ここに深く感謝の意を表します。

東京大学大学院農学生命科学研究科生物・環境工学専攻川越義則助手には実験の遂行、研究の全般にわたりまして惜しみない御協力を頂きました。ここに篤くお礼申し上げます。

生物プロセス工学研究室秘書目時美穂子氏、阪美和氏には研究活動を円滑に行う上で多大な御協力を頂きました。東京大学大学院農学生命科学研究科生物・環境工学専攻生物プロセス工学研究室の大学院生・学部生諸氏には多大なご協力を頂きました。心からお礼申し上げます。