

博士論文

キセノン水和物を利用した農産物の
長期保存法に関する基礎研究

2012年1月

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

王 蕾

目次

第1章 序論	1
1.1 研究の背景	1
1.1.1 凍結保存の現状	1
(1) 氷の構造	1
(2) 凍結保存	4
1.1.2 疎水性水和物	6
(1) 疎水性水和物の構造	6
(2) 疎水性水和物	9
1.2 研究の目的	14
第2章 組織保存へのキセノン水和物の利用可能条件	17
2.1 緒言	17
2.2 水中のキセノン水和物サイズ分布の検討	18
2.2.1 供試材料	18
2.2.2 疎水性ガスの選定	18
2.2.3 実験方法	21
2.2.4 結果および考察	25
(1) キセノン水和物形成の初期過程	25
(2) 水和物サイズの評価手法	28
(3) 水和物サイズ分布への温度, 圧力の影響	30

2.3	オオムギ子葉鞘細胞の損傷評価	35
2.3.1	供試材料	36
2.3.2	オオムギ子葉鞘細胞の損傷評価方法	39
2.3.3	結果および考察	41
2.4	結言	47
第3章 組織におけるキセノン水和物形成割合		48
3.1	緒言	48
3.2	供試材料	50
3.3	実験方法	51
3.3.1	NMRを用いた水和物形成割合の測定	52
(1)	NMR装置の測定原理	52
(2)	水和物形成割合の測定	53
3.3.2	NMRを用いた細胞内水の拡散係数の測定	54
(1)	細胞内水の拡散係数の測定	54
(2)	制限拡散現象	56
3.3.3	NMRを用いた細胞膜の水透過性の測定	59
3.4	結果および考察	61
3.5	結言	68
第4章 キセノン水和物の部分的な形成を利用した凍結プロセスの		

制御	69
4.1 緒言	69
4.2 キセノン水和物の部分的な形成を利用した長期保存法	70
4.2.1 供試材料	70
4.2.2 実験方法	70
4.2.3 結果および考察	71
4.3 X線イメージングを用いたキセノン水和物の形成確認	78
4.3.1 供試材料	78
4.3.2 実験方法	78
4.3.3 結果および考察	81
4.4 結言	85
第5章 結論	86
5.1 摘要	86
5.2 結論	89
5.3 長期保存法としての実用化への今後の課題	91
参考文献	93
謝辞	102

第1章 序論

1.1 研究の背景

1.1.1 凍結保存の現状

(1) 氷の構造

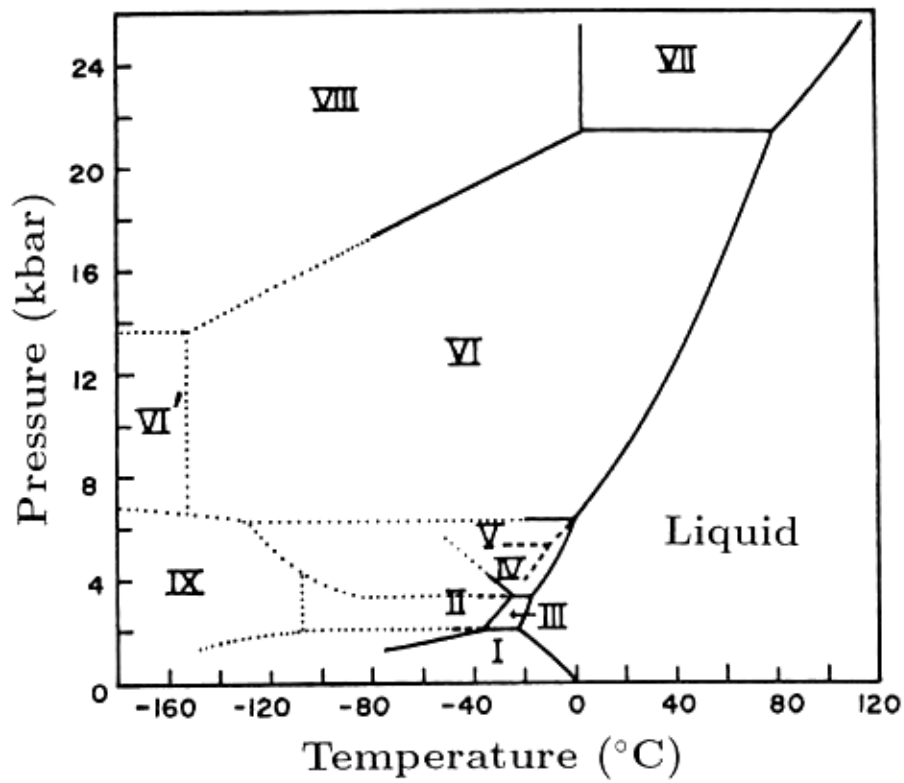
氷の構造は X 線回折, 中性子回折, 赤外分光, 誘電率などの測定結果から明らかにされており, 常圧で形成する結晶構造は氷 I_h と氷 I_c である. 氷 I_h は普通氷と言われるもので, 地球上に自然に存在する唯一の氷である. この結晶は六方晶系に属し, 各酸素原子は 4 個の隣接酸素原子によって四面体的に囲まれており, 隣接水分子間には水素結合によって結ばれている. 氷 I_c の場合, 酸素原子の配位様式はすべてトランス型, 六角形部分はすべて椅子型で, 結晶は等方性の結晶系に属している. 氷 I_h および氷 I_c に共通する特徴は, ひとつの酸素原子が他の酸素原子 4 個で取り込まれていることである (Pauling, 1935).

ここで, 氷 I_c (立方晶系) は -120°C 以下で水蒸気の凝縮によるか, 凍結された高圧氷からの転移によって形成させることができる (Bertie *et al.*, 1963). しかし氷 I_h を, 氷 I_c が水蒸気から生成する温度まで冷却しても, 氷 I_c に転移する傾向はみられない. 逆に氷 I_c を約 -100°C 以上に昇温させると, 氷 I_h に変化する.

高圧領域においては, 氷 I_h と結晶構造が異なる幾種類もの氷が見出されている. このように, 同じ物質で結晶構造を異にするものがあるとき, それらを多形であるという. Fig. 1-1 の相図には, これらの多形が存在する領域が示されている. 氷 II から氷 IX までは高圧下において形成される氷の多形である. これらの多形が常圧氷に比べて密に

詰まっている理由は水素結合が短いためではなく、水素結合がゆがみ、最近接以外の分子間距離が短くなっているためである (Kamb, 1973). Fig. 1-1 には、それぞれ氷の多形の結晶学的性質と構造についての特徴が示されている。

このほかに、氷 I_h の領域の低温部分にガラス質氷が存在することが知られている。ガラス質氷はガラス状態（無定形）にあるもので、極度に過冷却された水である。ガラス質氷を約 -160°C 以上に昇温させると、不可逆的に氷 I_c に転移する。一方、ガラス質氷の構造は X 線回折により明らかにされた。77 K で得られたガラス質氷は主に氷 I_h を母体としているが、10 K で得られたガラス質氷は氷 I_h 、氷 II、氷 III などの構造が無秩序に混合した構造になっていると解釈できる (Rice, 1975)。



Ice	Density	Crystal system	Space group	Z	Cell constant
I _h	0.93 g/cm ³	hexagonal	P6 ₃ /mmc	4	a=4.50 c=7.32 Å
I _c	0.93	cubic	Fd3m	8	a=6.35
II	1.18	rhombohedral	R3̄	12	a=7.79 α=113.1°
III	1.16	tetragonal	P4 ₁ 2 ₁ 2	12	a=6.73 c=6.83
IV	1.27	rhombohedral	R3̄c	16	a=7.60 α=70.1°
V	1.23	monoclinic	A2/a	28	a=9.22 b=7.54 c=10.35 β=109.2°
VI'	1.31	orthorhombic	Pmmn	10	a=b=6.27 c=5.79
VI	1.31	tetragonal	P4 ₂ /nmc	10	a=6.27 c=5.79
VII	1.49	cubic	Pn3m	2	a=3.43
VIII	1.49	tetragonal	I4 ₁ /amd	8	a=4.80 c=6.99
IX	1.16	tetragonal	P4 ₁ 2 ₁ 2	12	a=6.73 c=6.83

Fig. 1-1 High-pressure phase diagram of nH₂O and parameter of each ice
(Kamb, 1973) .

(2) 凍結保存

農産物の貯蔵法の1つに凍結保存がある。これは1930年に始まったといわれ、凍結することによって、酵素や微生物による生化学的変化、水分蒸発などの物理的変化が抑制され、貯蔵性が向上するという利点がある一方、氷結晶による組織の損傷が著しく、解凍後の組織軟化は避けられないという欠点がある（鎌田，1974）。

植物生理学分野において、現在提案されている生鮮野菜の凍結保存法の基礎となる報告がなされてきた。Morris and Clarke (1981)は、植物細胞分離体であるプロトプラストを用いた細胞膜に対する凍結・解凍処理の損傷に関して、一般的な生物細胞において、細胞膜は細胞内外での物質やエネルギーの交換、ひいては基本的なレベルでの浸透平衡を保つ仲介者のような役割を持つ重要な部位であるとし、この細胞膜の損傷が凍結損傷の主要な原因であると述べた。

また、Fennemaら(1973)は、凍結速度が組織構造の破壊程度に及ぼす影響について報告した。凍結速度が遅い緩慢凍結の場合、細胞内の温度と水の化学ポテンシャルは、細胞外のそれらとほぼ同じレベルを保っており、外部からの冷却により、最初に細胞外に氷結晶が形成される（すなわち細胞外凍結が起きる）。それに伴い、細胞外の化学ポテンシャルが急激に低下し、水分子は細胞膜を通して細胞外に移動することが可能なため、細胞内で過冷却となっている水は細胞外に引き出され、氷結晶の表面に達して凍結し、氷結晶は成長する。その結果、細胞内の水分が外部に浸出するため、細胞自体は収縮し、同時に細胞内溶液の濃縮などにより、細胞膜に化学的な障害を生じる可能性がある。また、氷結晶の存在に起因する細胞膜と細胞壁の変形により、物理的な力による損傷が生じる可能性がある。凍結速度が速い急速凍結の場合、温度は急速に下がり、細胞内外を問わず凍結点以下の温度に短時間で到達するため、氷結晶が細胞内部と外部でほぼ均一に生成される。このように、細胞内外で同時に氷が形成することにより、細胞膜

などが受ける物理的障害は、緩慢凍結した場合よりも少ないといわれている（鈴木，2009）。また，細胞や生体組織の凍結保存法に関しては，凍結速度と植物細胞内外における凍結の観察から，細胞内凍結が細胞膜近傍から発生することなどが報告されている（上村ら 2002；上村，2004）。一方，凍結速度が細胞構造の破壊程度に及ぼす影響は，形成する氷のサイズに依存することが報告された（Fennema *et al.*, 1973）。すなわち，急速凍結処理は形成する氷のサイズを小さくできることを示した。

さらに安藤（2010）は，生鮮野菜を凍結・解凍処理した後の組織軟化の原因について次のように記した。

“凍結・解凍処理後の組織軟化は，細胞膜の水透過性の低さに由来する。この細胞膜の水透過性の低さは，凍結に伴う細胞内外での水分移動がうまく行われないうまま，細胞内に氷結晶が形成してその体積を増加させる。そのため，組織を凍結した場合，細胞膜とともに細胞壁も大きく損傷を受けてしまう。この現象は密閉容器内の水を凍結したときに起きる容器の破裂と類似した現象と推察される。”

上記の知見を参考に，氷結晶による組織の損傷を避けることを目的として，急速冷却や凍結防御剤の導入が試みられている。

氷の形成を防ぐ意図で，水をガラス化するためには， 10^6 K s^{-1} オーダー以上の冷却速度が必要であると報告されている（Franks, 1985）。ガラス状態の水は氷 I と異なって体積はほとんど増加しないので，細胞が破壊されることはない。ガラス状態の水は準安定であるため，保存温度によっては氷 I に転移し，生体組織を破壊する可能性がある。このように，冷却する際に試料内の熱伝導が冷却速度の律速要因になるため，大きな細胞や組織の凍結保存ではガラス化する前に氷核が形成される（Mazur, 1977）。このような細胞外凍結に伴う脱水や細胞内凍結に伴う細胞膜の損傷などの問題が，未解決のまま残されている。

凍結防御物質としては、グリセリンやジメチルスルホキシド、糖、ムコ多糖などが用いられている。これらの中でグリセリンは特に広く用いられており、使用濃度の増加とともに氷の結晶の大きさが減少し、結晶化温度も下がる。また、糖類の添加による氷結晶の成長抑制に関する報告もある (Uchida, 2007)。一方、凍結防御物質の添加による未凍結低温保存では、凍結防御物質と凍結した植物組織の生存率との関係について鈴木ら (2002) の報告などがある。しかし、凍結防御については、凍結防御物質を吸収させる時点で、細胞が脱水して損傷を受ける可能性があり (上平, 1983; 上平ら, 1989)、さらに解凍後に組織から凍結防御物質を除去する方法が確立されていないなどの問題点が残されている。

以上のように、組織損傷の軽減を目的とした凍結保存法について、農産物の貯蔵法の研究において、更なる検討が必要と考えられる。

1. 1. 2 疎水性水和物

(1) 疎水性水和物の構造

疎水性水和物とは、ある温度と圧力の下で水に疎水性ガスが溶解すると、水分子が疎水性ガス分子 (ゲスト分子) の周辺に水素結合で配向することにより、ネットワークが発達し、水が構造化され、水素結合した水分子の三次元構造の空孔に疎水性ガス分子が閉じ込められることにより形成される、結晶型の氷状固体物質である (鈴木, 1982)。疎水性水和物の形成は疎水性ガスの溶解量に依存し、温度と圧力も関係する。その形成プロセスのモデルを Fig. 1-2 (Sloan and Koh, 2007) に示した。この疎水性水和物の結晶構造には 2 種類の結晶格子が存在する。I 型の格子は 46 個の水分子を含み、II 型は 136 個の水分子を含んでいるかご型である。このかごは水素結合でつながれた水分子によって組み立てられており、ゲスト分子は穴の中で自由に移動する。Fig. 1-3 に示

すように、ゲスト分子が入る空孔は I 型ではそれぞれ 12 と 14 の面をもち、II 型ではそれぞれ 12 と 16 の面を持っており、これらの面は正五角形または正六角形である (Davidson *et al.*, 1978 ; Martion *et al.*, 1988).

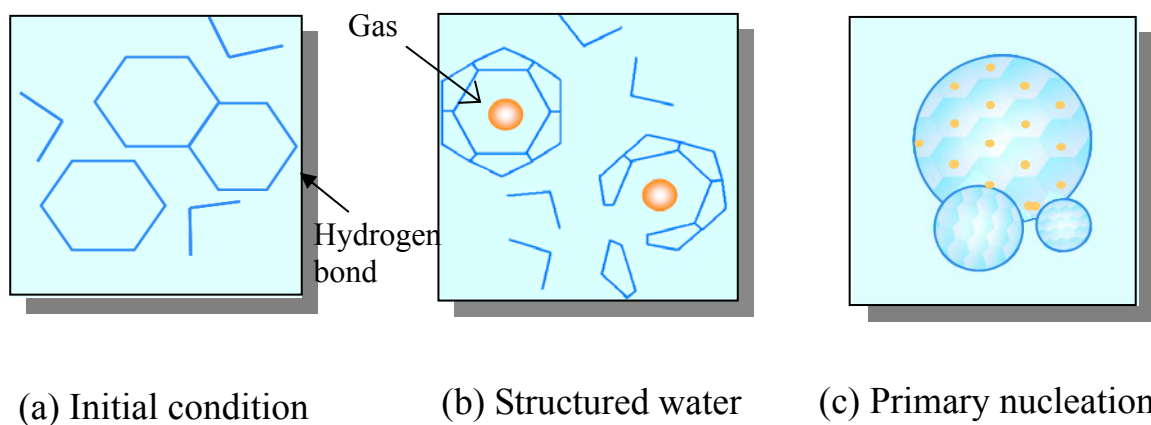


Fig. 1-2 Schematic model of gas hydrate formation from water to gas (a→b→c) .

(a) Pressure and temperature in hydrate forming region, but no gas molecules dissolved in water. (b) Upon dissolution of gas in water, labile cluster forms immediately. (c) Labile clusters agglomerate by sharing faces, when the size of cluster agglomerate reaches a critical value, growth begins (Sloan and Koh, 2007) .

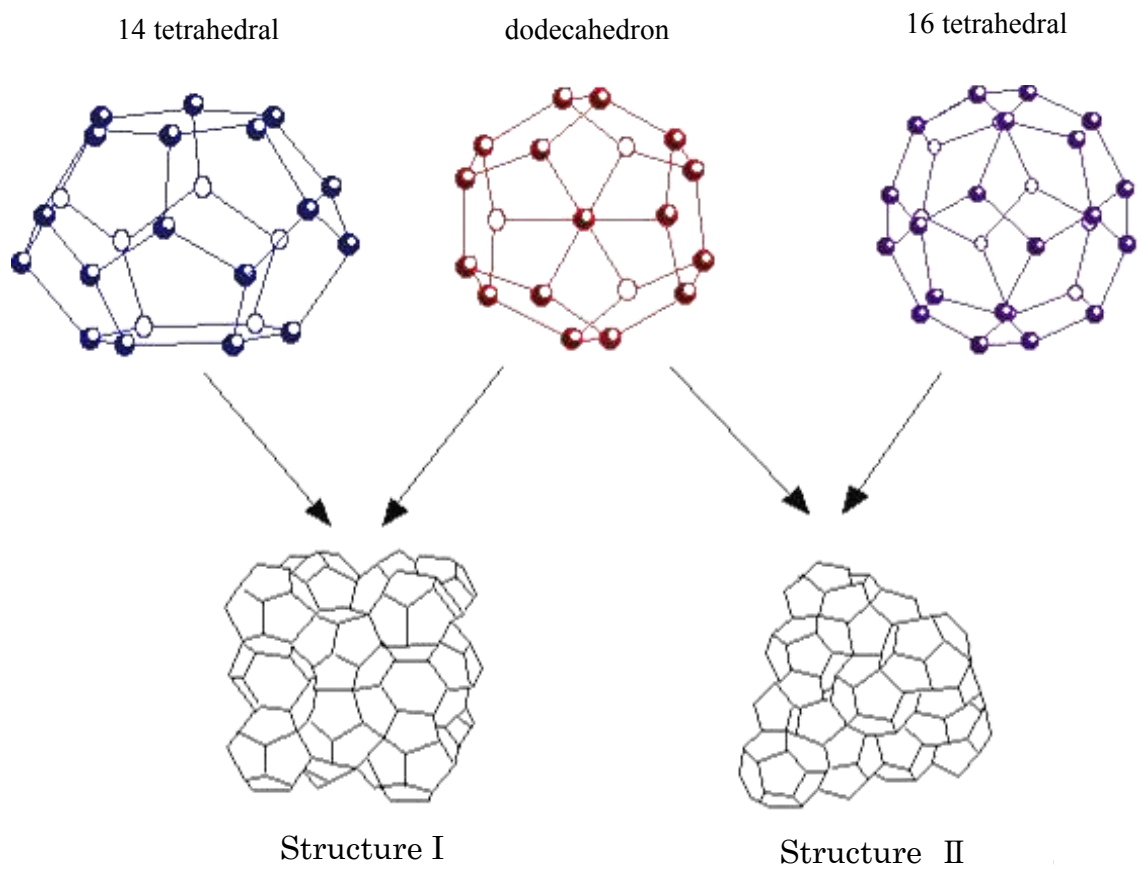


Fig. 1-3 Gas hydrate structure, structure I and structure II showing oxygen atoms only (Sloan and Koh, 2007).

(2) 疎水性水和物

疎水性水和物は、19 世紀にファラデーによって発見された (Davidson, 1973). その後、1930 年代までに X 線回折法の発展により結晶構造の解析が進み、数多くのゲスト分子と結晶構造との関係が見出された。1934 年には、シベリアで敷設された天然ガスパイプラインの閉塞事故が、疎水性水和物によることが判明し、生成条件の把握とその回避方法の研究が盛んに行われるようになった (内田・伊藤, 2005; Huo *et al.*, 2001). しかし、現在においても疎水性水和物の全貌は解明されておらず、多くの研究者によって様々な角度から研究が進められている。光学顕微鏡による巨視的な生成過程の観察 (大垣ら, 1994; 佐々木, 2005), X 線回折法を用いた構造解析 (Chrystele *et al.*, 2002; Takeya *et al.*, 2001; Takeya *et al.*, 2005; Takeya *et al.*, 2006), ラマン分光法を用いたゲスト分子含有率やゲスト分子の振動状態の解析 (Sloan, 2000), 中性子線の散乱や回折を用いたゲスト分子の振動状態の解析などの物性の研究 (加美山ら, 2005), 分子動力学 (MD: Molecular Dynamics) によるシミュレーション解析などが盛んに行われている (寺倉, 2005; Itoh *et al.*, 2003; Makogon *et al.*, 1996). 一方、近年、疎水性水和物の利用法に関する研究にも注目が集まってきた。その代表的な例に、地球のエネルギー資源 (天然ガス) の保存・輸送法への利用に関する研究がある (海老沼ら, 2002; 内田, 2001).

また、疎水性水和物の生成条件と挙動に関する研究も行われている。一般に水における水和物の形成は偶発的であり、水-ガス界面においてフィルム状に形成・成長することが知られている (Long *et al.*, 1996). Shimada ら (2003) によると、蒸留水の場合、10°C ではキセノン水和物の形成条件として必要なキセノン分圧は 0.41 MPa と報告した。この値は、一旦、高压・低温下で水和物を生成させ、圧力を減少させることで得られた相平衡状態を保つために必要な圧力であり、水和物の保持に必要な圧力であること

を意味する。従って、10°Cにおいて、核発生に要する自発的な水和物の発生に必要なキセノン分圧は 0.41 MPa となる。

さらに、Purwanto *et al.* (2001) は、キセノン水和物の生成によって、コーヒー溶液の濃縮が可能であることを報告した。また、スクロース/タンパク質水系のような水溶液では、NMR によってスクロース添加による水和性の変化が観測されている (Tiphaine ら, 2004) 。さらに、牛筋肉組織において、EO (酸化エチレン) 水溶液を用いた EO 水和物の形成過程は、緩慢凍結時に起きる氷の形成過程と類似し、細胞周囲で形成・成長することが報告されている (Hulle *et al.*, 1971) 。しかし、疎水性水和物を用いた農産物の保存法について検討された例は見あたらない。

一方、農産物や植物細胞の保存法として疎水性水和物の形成に至る前の水素結合ネットワークを発達させた水 (構造化した水) の状態を利用し、常温で細胞内部に疎水性ガスを溶解させ、代謝抑制を行う研究が行われている。

このキセノンガスを利用した保存法についての研究例として、モヤシに 0.25~0.94 MPa, 6°Cでキセノンガスを溶解させると、付着細菌の増殖とモヤシの変色が抑制され、品質が保持されたと報告されている (橋本・大下, 1996) 。大下ら (1996) は、オオムギ子葉鞘細胞を用いて原形質流動観察を行った結果、15°C下での原形質流動速度が、キセノンガスで 0.5 MPa に加圧した際に $4.1 \mu\text{m s}^{-1}$ となり、同じ温度で大気下での $5.9 \mu\text{m s}^{-1}$ に比べて低下したことを報告し、代謝抑制の可能性を示した。また、0.4~0.7 MPa, 15°Cの条件で、キセノンガスを作用させると、7日間保存後の細胞の生存率が上昇することを報告している。

また、ブロッコリ断片にキセノンガスを溶解させたところ、0.39 MPa, 6°Cでは褐変の防止、0.24 MPa, 2°Cでは呼吸代謝の抑制が示された (大下ら, 1997) 。さらに、Zhan ら (2005) により、0.3 MPa, 10°Cで、24 h キセノンガスで処理した後、キュウリの

呼吸速度が低くなり、品質が向上したことが報告されている。これに加えて、Zhangら(2008)は、常温で1.1 MPaのキセノン・アルゴン混合ガス(分圧比9:2)中にアスパラガスを24 h静置した後、4°Cの大気下での保存実験を行った結果、色の変化やクロロフィル量の減少を抑制する効果があると報告している。松嶋ら(2000)は、カーネーション切り花を用いて、分圧0.5 MPa、20°Cの条件で24 hキセノンガス中で貯蔵した結果、切り花内部の水分が保持され、花持ち期間が延長されたことを報告している。

一方、細菌の増殖抑制効果について、キセノンガスの溶解がグラム陽性菌よりもグラム陰性菌に対して効果的であることが、橋本・大下(1998)により報告されている。このような食品の品質劣化に関する細菌の増殖を抑制する効果と共に、農産物自身の代謝を抑制することで、保存性が向上することが確認されてきた。

既往の研究から得られた結果を考慮すると、疎水性水和物を利用した農産物の保存法は、品質劣化防止を目的とした凍結保存の代替法となりうることが示唆されている。しかし、この保存法と凍結保存法の効果は類似しているものの、水和物と氷の物性には大きな違いがある。CH₄水和物を例として挙げると、一般的に見られる氷結晶 I_hはHexagonal(六方晶)であるが、キセノン水和物、CH₄水和物などはI型のCubic(立方晶)である(Baumert, 2004)(Fig. 1-4)。また、氷の熱伝導率はCH₄水和物の約5倍であり、CH₄水和物の密度は水と氷の間(0.95 g cm⁻³)である(Table 1-1)(Stern, 1996)。ただし、Fig. 1-4に示されたX線回折測定結果から、CH₄水和物は、1個のCH₄分子が5.75個の水の作るかごに取り囲まれている構造であることが明らかになった(Baumert, 2004)。CH₄水和物は、見かけ上シャーベットに似た氷状の固体物質(Fig. 1-5)で、低温高圧の環境条件下で安定に存在しており、常温常圧ではCH₄と水に分解する。

さらに現在, 食品を含めた生体組織の凍結保存に大きく貢献している組織内水溶液のガラス状態の存在が, 疎水性水和物においても確認された (山室, 2005). しかし, 疎水性水和物の形成により, 農産物の保存に伴う組織への損傷を軽減できるか否かについては明らかにされていない.

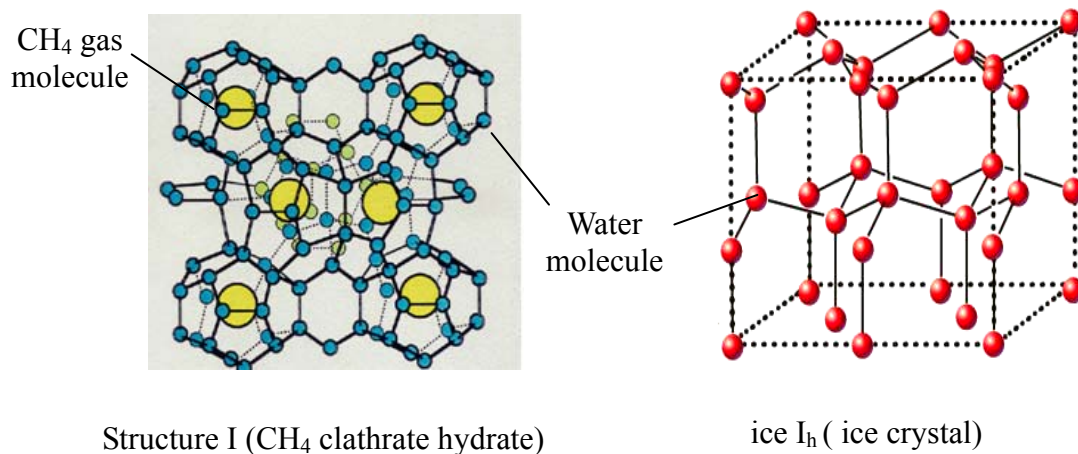


Fig. 1-4 Images of the CH₄ clathrate hydrate (structure I) and ice crystal (I_h) (Baumert, 2004) .



Fig. 1-5 Photograph of CH₄ clathrate hydrate.

Table 1-1 Comparison on physical properties of ice crystal (ice I_h) and CH₄ clathrate hydrate (structure I).

Property	Ice I _h	Structure I
Kinds of Crystal	Hexagonal	Cubic
Bulk Modulus (GPa)	8.8 (273K)	8.0 (296K)
Long. Sound Velocity (km s ⁻¹)	3.8 (273K)	3.7 (296K)
Therm. Expansion at 200K (K ⁻¹)	5.6×10^{-5}	7.7×10^{-5}
Therm. Conductivity at 263K (W m ⁻¹ K ⁻¹)	2.23	0.49
Density (g cm ⁻³) at 273K	0.92	0.95

1.2 研究の目的

食品としての農産物には、高品質であることが求められる。農産物は収穫後も生きているため、絶えず体内物質を消耗しつつ呼吸を続けている。そのため、常温に放置すると、酵素反応により変質し、次いで微生物により腐敗し、品質が急激に劣化する。農産物の鮮度を保つために種々の技術が開発されているが、保存期間は、葉菜では長くても1週間を超えない。一方、現在では、 -60°C で保存する超低温保存も可能となり、マグロなどの動物性の生鮮食品素材においては、半永久的に近い保存が可能であるとされている（加藤，1974）。しかし、生鮮野菜のような植物性の食材の場合、細胞内外の凍結による氷結晶の形成および体積膨張により、部分的な凍結濃縮、凍結脱水が生じ、組織の変形や損傷および含有成分の変性に伴う解凍後のドリップ発生、組織の物理的劣化、テクスチャーの劣化などの問題点が残されている。

凍結速度が細胞構造の破壊程度に及ぼす影響は、形成する氷のサイズに依存することが報告された（Fennema *et al.*, 1973）。すなわち、急速凍結処理は、形成する氷のサイズを小さくし、破壊を抑制できることを示した。一方、凍結防御物質が植物組織の生存率に及ぼす影響については、鈴木ら（2002）の報告がある。これらの報告では大きな氷結晶の形成による細胞膜の損傷が問題として指摘されている。これを避けるために、凍結防御物質の導入や急速冷却によるガラス化が試みられている。凍結速度が氷結晶の形成とサイズに影響することは知られている一方で、細胞外凍結に伴う脱水や細胞内凍結に伴う細胞膜の損傷などの問題が未解決のまま残されている。また、凍結防御については、解凍後に組織から凍結防御物質を除去する方法にも検討すべき課題が残されている。

これらの既往の研究は、凍結保存法について低温での化学変化の抑制を期待して行わ

れてきたが、その一方で、凍結点以下の温度で起きる氷の成長を制御する方法も模索されてきた。しかし、氷の形成割合を人為的に制御するのは困難であり、成功に至っていない。そこで本研究では、疎水性水和物の利用に着目した。

疎水性水和物は、低温で圧力を加えながら水に疎水性ガスを溶解させると形成する氷状結晶である。氷と比較して、疎水性水和物は 0°C 以上の温度でも形成でき、その形成割合は温度・圧力などの条件を設定し、人為的に制御できる可能性があるため、その物性の研究は進展が目覚ましい（内田ら、2005）。また、疎水性ガスであるキセノンガスの溶解により形成された疎水性水和物と構造化した水は、全身麻酔のメカニズムとして提案されるなど、生物の代謝抑制と関係することが指摘されている（Pauling, 1961）。さらに、生鮮農産物の保存について、大下ら（1996, 1997）、Zhan ら（2005）により、キセノンガスの溶解に伴う水の構造化による農産物の変色や代謝の抑制効果が報告されている。これは、キセノン水和物形成前の水分子間の水素結合ネットワークが発達した状態を利用したものである。しかし、水が構造化した状態の利用では、保持期間を数日しか延長できない。そのため、安藤(2010)は、キセノン水和物を利用した長期間の保存の可能性について研究を行った。

これらの背景を受けて、本研究では、凍結点より高い温度で部分的にキセノン水和物を形成させる条件を明らかにする。さらに、その後凍結点以下まで冷却することにより、水和物周囲の領域に氷核を生じさせ、細胞内外に微細な氷結晶を形成させることを試みる（詳細について 4.2 で述べる）。すなわち、キセノン水和物の部分的な形成を利用した凍結プロセスの制御による、細胞膜の損傷を抑制することが可能な農産物の長期保存法の確立を目的とした。具体的には、1) 部分的なキセノン水和物の形成条件の検討と 2) キセノン水和物の部分的な形成を利用した凍結プロセスの制御の検討に着目し、細胞・組織レベルでの長期保存法への利用可能性について検討した。

本論文は 5 章から構成され、第 1 章では現行の長期保存法である凍結保存法の既往の研究についてまとめ、凍結保存における問題点について述べた。また、氷結晶と異なるキセノン水和物を利用した保存法を検討する意義を述べ、本研究の背景と目的を示した。第 2 章では、細胞膜の損傷が軽減可能な細胞・組織保存へのキセノン水和物の利用可能条件について検討した。第 3 章では、キセノンガス処理時間が、組織におけるキセノン水和物の形成割合の変化およびキセノン水和物形成・解離後の細胞膜の損傷程度に及ぼす影響について検討した。第 4 章では、細胞膜の損傷評価に基づいて、キセノン水和物の部分的な形成を利用した凍結プロセスの制御について検討した。第 5 章で各章から得られた結果を総括し、本研究の意義および今後の課題を記した。

第2章 組織保存へのキセノン水和物の利用可能条件

2.1 緒言

新しい長期保存技術として、キセノン水和物を部分的に形成させることにより、水和物周辺に微細な氷結晶を形成させ、細胞膜の損傷を抑制する凍結保存技術を提案した(第1章参照)。しかし、既往の研究においては、生体組織における疎水性水和物の形成が述べられているものの、細胞の損傷の有無については明らかにされていない。

そこで、本章では、疎水性ガスのキセノンガスを溶解させることで形成されたキセノン水和物を利用した長期保存法を確立するために、キセノン水和物の形成がオオムギ子葉鞘細胞に与える損傷に着目し、細胞の生存率の観点から細胞膜の損傷程度を検討することを目的とした。細胞内では水和物の直接観察が困難なため、まず、1) 水中キセノン水和物の形成過程および結晶サイズ分布について検討し、最も小さなサイズのキセノン水和物が形成される条件を明らかにした。次に、2) この条件をオオムギ子葉鞘細胞に適用し、細胞内での水和物結晶形成の確認と細胞の損傷を、氷結晶の形成過程と比較して検討した。

2.2 水中のキセノン水和物サイズ分布の検討

一般に、生体や食品はタンパク質、脂質など多様な物質を含む不均一、多成分系であるが、水は大部分の農産物と食品に共通して含まれる主要成分の一つである。この章では、キセノン水和物の形成が細胞膜に損傷を与えるか否かを検討するため、温度・圧力条件がキセノン水和物の結晶サイズに及ぼす影響を検討する。そのため、タンパク質、脂質などの影響をなくし、水に対して氷が形成されない 1℃、5℃の温度で、異なる圧力下において、キセノン水和物の形成過程とキセノン水和物の結晶サイズ分布について検討することで、与えられた条件の中で最も小さな水和物結晶が生じる温度・圧力条件を明らかにすることを目的とする。

2.2.1 供試材料

0.8 ml の超純水（関東化学（株））を用いた。水道水では、不純物が混在することがあるため、それを核として、水和物の形成を促進する可能性がある。このような水和物の形成への影響をなくすために超純水を使用した。

2.2.2 疎水性ガスの選定

疎水性水和物を形成するゲスト分子には、アセトンや EO のように水との間の相互作用がかなり大きいものもあり、気体分子としてはアルゴンやグリプトン、キセノンのような不活性気体、あるいはメタンのような炭化水素やその他の疎水性分子が多く含まれているものもある。

水を構造化し、さらに疎水性水和物を形成させるには疎水性ガスを溶解させればよい。しかし、一般に疎水性ガスの水への溶解度は極めて低いことから、まず疎水性水和によ

り水を構造化し、さらに水和物を形成させるために疎水性ガスの圧力を高くする必要がある。すなわち、圧力の増加は疎水性相互作用の破壊の方向、言い換えれば疎水性水和物の形成を促す。ただし、疎水性水和とは、水溶液中においては疎水性分子や疎水基の周りに高い構造化をもった一種の擬固体構造である iceberg(冰山)が形成する状態をいう(鈴木, 1982)。疎水性相互作用とは、水溶液において疎水性部分が水分子から遠ざかろうとする結果、その濃度がある限界以上になるとお互いにより集まって分子集合態ミセル (micelle) をつくるようになる。このような集合態形成に働く分子間相互作用である (Kauzmann, 1959)。

そこで、疎水性ガスの水への溶解度を Table 2-1 に示す (Lide, 1993)。Table 2-2 に、0.101MPa における水和物の解離温度と 0°Cにおける水和物の解離圧を示した(奥田, 1981)。これらの知見から、疎水性ガスの圧力が同一であれば、疎水性ガスの中ではキセノンガスの溶解度が最も高く、容易に水和物が形成されることが期待される。

また、細胞内で水の構造化、あるいは疎水性水和物が形成されれば、キセノンガスは常温では化学的に不活性であるため、細胞内の化学反応に関与しないと考えられる。

以上の理由より、農産物における疎水性水和物の形成と組織に与える損傷程度を検討する本研究では、キセノンガスが最適のガスであると考え、疎水性ガスとしてキセノンガスを選定した。キセノンガスを用いれば、0°C以上の温度においても、メタン水和物などと比べ、比較的低い圧力条件で水和物を形成できると考えられる。Fig. 2-1 に水におけるキセノン水和物の解離圧と温度の関係を示した。このように、キセノン水和物の解離圧は温度の上昇とともに高くなる。

Table 2-1 Solubilities of inert gases (Lide, 1993)

Inert gas	273K	288K
Xe	1.81×10^{-4}	1.05×10^{-4}
Kr	8.91×10^{-5}	5.73×10^{-5}
Ar	4.32×10^{-5}	3.05×10^{-5}
N ₂	1.89×10^{-5}	1.39×10^{-5}
Ne	1.01×10^{-5}	8.70×10^{-5}
He	7.57×10^{-6}	7.12×10^{-6}

Solubility : mole fraction mol - Xe / mol - H₂O

Table 2-2 Characteristics of inert gas hydrates (Okuda, 1981)

Inert gas hydrate	Decomposition temperature under	Dissociation pressure
	101kPa (K)	at 273K (MPa)
Xe	269.8	0.15
Kr	245.4	1.47
Ar	230.4	10.6

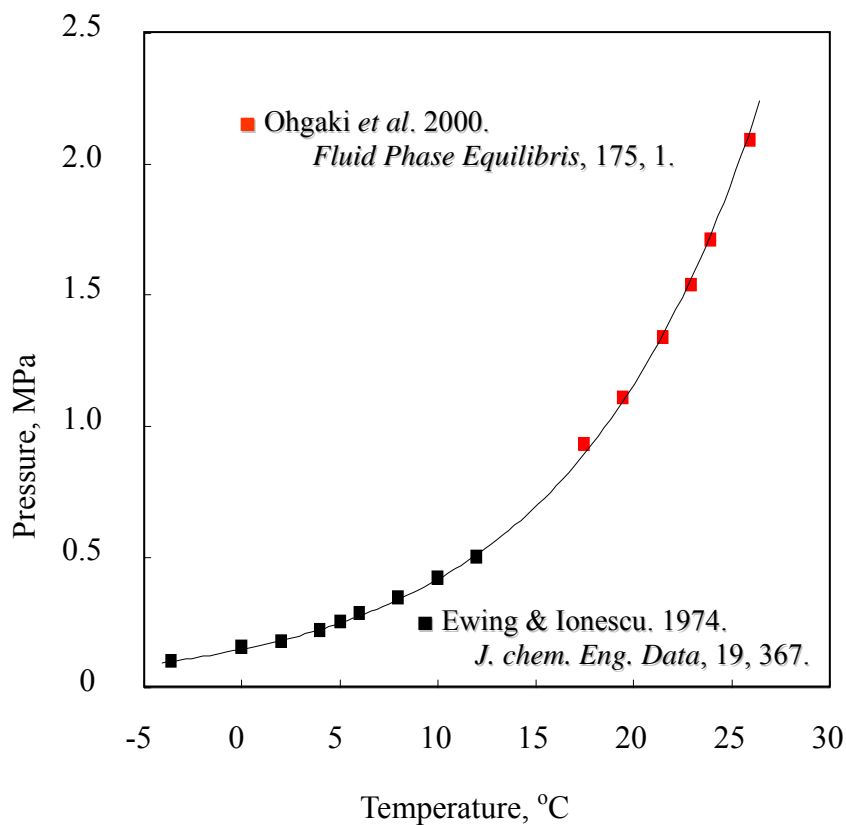


Fig. 2-1 Relationship between pressure and temperature of Xe hydrate decomposition in water.

2.2.3 実験方法

キセノン処理装置を Fig. 2-2 に示す。

耐圧容器(柴田科学株式会社製)は, ステンレス製であり, 内径 30 mm, 外径 70 mm, 高さ 43 mm である。蓋上下面には直径 48 mm, 厚さ 3 mm の耐圧硬質ガラスが嵌め込まれており, ガラス越しに圧力を維持した状態での顕微鏡観察が可能である。耐圧容器は, その二重壁内に冷却用媒体液(エタブライン EC-Z)を循環させて容器の温度を一定に保つ構造を持つ。実験で使用した容器の耐圧は 1.0 MPa である。

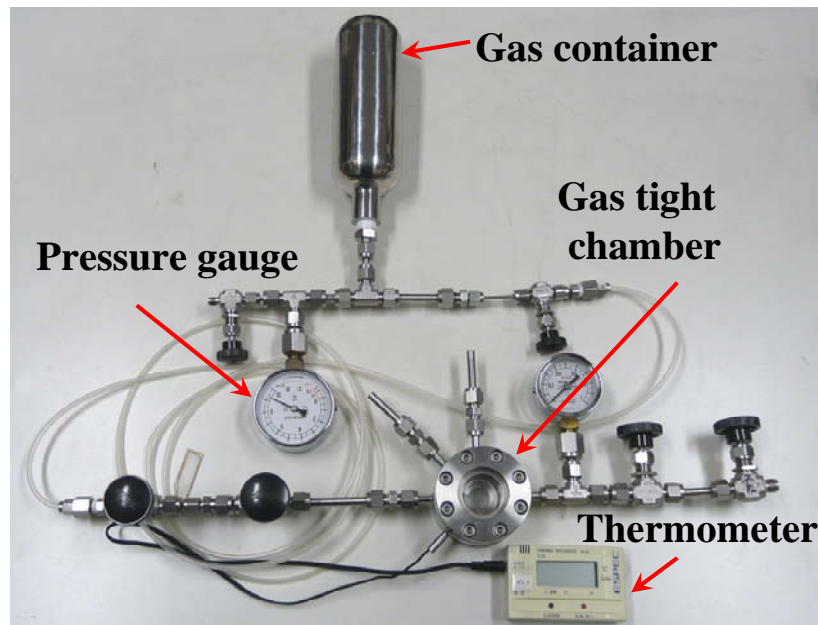


Fig. 2-2 Experimental setup for introducing Xe gas into the gas tight chamber with a viewing window.

実験中の冷却用媒体液の循環および温度維持には、サーモレギュレーター (B.Braun 社製 Thermomix UB) を用いた (Fig. 2-3). 耐圧容器側面には温度センサ (タバイエ スペック株式会社製 サーモレコーダーRS-10, センサ直径 5 mm, センサ先端長 15 mm) が装着されており, 容器内部の温度測定が可能である. なお, 本実験で使用された耐圧容器は, ステンレス製で熱容量が大きい (同体積で水の 941 倍) ため, 周囲の温度の影響を受けにくく, 耐圧容器側面に装着された温度センサは試料室直近に感温部が設置されているため, ほぼ試料室の温度が表示されると考えた. 実際の温度はその表示温度に対して $\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ の誤差があり, 実験中設定された温度はほぼ安定していた.



Fig. 2-3 Experimental setup for the temperature control system.

また，耐圧容器には，ステンレス製パイプを介して圧力計及び容積 300 ml のガスボンベが接続されている．これはステンレス製の耐圧仕様であり，ここでは試料に対するキセノンガス溶解量を実験中一定に保つ目的で装着されている．また，圧力計（Kusaba Gauge 社製）で容器内部のキセノンの圧力を測定することが可能である．

耐圧容器内に試料を静置した後，バルブ A, B, C を閉めた状態で，バルブ D を開け，キセノンガス（99.995%，岩谷産業株式会社）をガスボンベ内部に導入した．その後，バルブ B, C を開け，耐圧容器内部を目的のキセノン圧力に設定した．圧力を開放する場合は，バルブ A を開け，外部にキセノンガスを放出した（Fig. 2-4）．

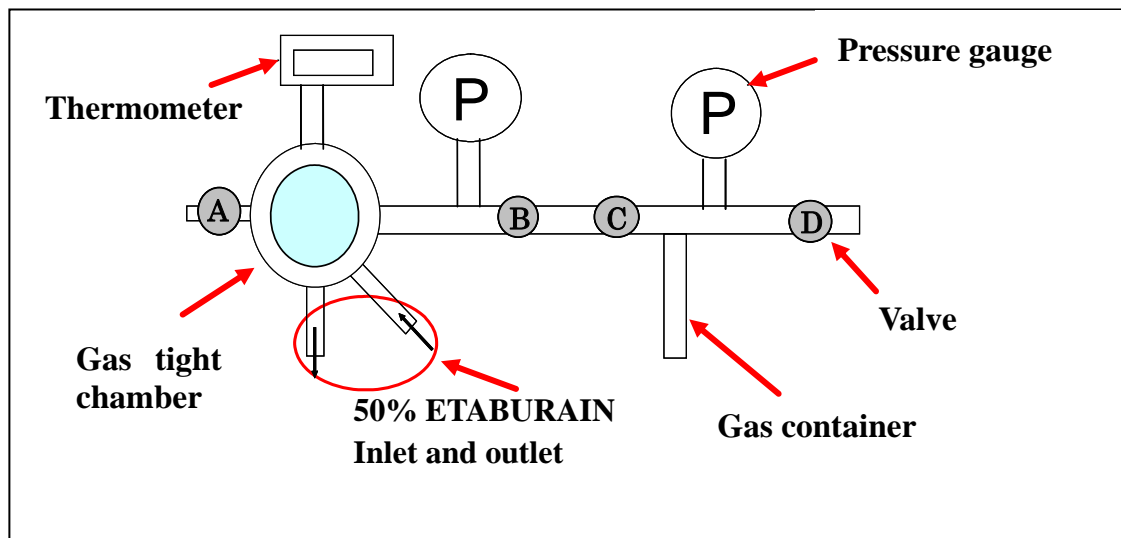


Fig. 2-4 Pressure unit for introducing Xe into the sample chamber. Xe gas was filled in a gas container to keep a given pressure.

また、この耐圧容器を 200 倍の透過型光学顕微鏡（OLYMPUS 社製 BX-51）のステージに載せ、試料を直接観察するために、耐圧容器中央部の試料室（内径 20 mm、深さ 18 mm）の上部と下部に透明な耐圧ガラスを設置した。試料室にはステンレスチューブが貫通しており、外部に設置したキセノンガス容器により試料室内の圧力を調整できる。この試料室に、シャーレに入れた 0.8 ml の超純水（以下は水とする）を静置した。はじめに少量のキセノンガスで試料室内の空気をパージし、所定の圧力になるようにキセノンガスを封入した。その上で、水と上部空間のキセノンガスとの界面を透過型顕微鏡により観察し、高速ビデオカメラ（デジモ社製 VCC-H1600C）により、150 枚/s でキセノン水和物の形成過程を記録した。

キセノン水和物については、高温、低圧で形成された結晶ほどサイズが大きいという、コーヒー溶液に関する報告がある（Purwanto *et al.*, 2001）。水中でも同様の傾向が期

待されると考え、水中でのキセノン水和物の結晶サイズ分布への温度および圧力の影響を検討するため、次の条件を設定した。すなわち、温度を常温より低い 5℃および 1℃とし、圧力は①5℃では 0.9, 1.0MPa ②1℃では 0.7~1.0 MPa に設定した。実測した温度は 5℃の場合、5℃±0.2℃、1℃の場合、1℃±0.2℃であった。水中のキセノン水和物の解離圧は 5℃および 1℃において、0.3 MPa および 0.2 MPa と報告されている。このため、キセノンガスの最小圧力をその温度での水和物の解離圧以上の圧力とした。各実験条件において、キセノン水和物が核形成し、水の表面に水和物の結晶が観察された時点から 1 h, 24 h, 48 h 後の画像を抽出し、フリーソフトウェアの Scion image (デジモ社製) により画像処理を行い、水和物の境界を手動でトレースすることによって、水和物が形成された面積を求めた。結晶のサイズはこの面積から算出された等価円直径により評価した。得られた等価円直径を階級幅 4 μm で分割し、各階級において占める細胞数の割合を結晶サイズ分布として算出した。

2.2.4 結果および考察

(1) キセノン水和物形成の初期過程

透過型光学顕微鏡でキセノン水和物の形成観察したところ、その初期には 2 つのパターンの存在が確認された。その一例を Fig. 2-5 に示す。これは 50 枚/秒で記録した動画から抽出した静止画の一部である。温度とキセノンガス圧力は a-type, b-type (Fig. 2-5 参照) のいずれも 1℃, 1.0 MPa であった。多くの場合は 2 次元的に結晶が全表面に広がる様子が観察されたが (Fig. 2-5-a), まれには、観察した顕微鏡視野内の各所にキセノン水和物の結晶核が出現し、これらが互いに接合して全水面に広がっていく様子が観察された (Fig. 2-5-b)。後者の核形成は、ゲスト分子であるキセノン分子の局所的濃縮によるものと考えられている (内田, 2007)。このような形成過程の違いの原因

は、次のように推察された。まず、界面近傍の水中における溶存キセノンガス濃度が比較的均一な場合は、一部に結晶核が形成されると、そこを中心にキセノン水和物結晶が成長し、水表面を覆うように 2 次元的に拡がると考えられる (Fig. 2-5-a)。次に、キセノンガスは水-キセノンガス界面を介して水中に溶解するが、局所的濃縮が生じて界面近傍の水中における溶存キセノンガス濃度が水面付近で均一にならない場合には、各所に独立した結晶核が形成される (Fig. 2-5-b)。局所的濃縮が生じた部分で結晶核が発生し水和物が形成されると、周囲に溶存するキセノン分子が水和物に向かって移動すると同時に、濃縮が生じていない部分の界面を通してキセノンガスが溶解し、これが繰り返されてキセノン水和物が成長すると考えられる。また、a-type と b-type の核生成の過程に違いが生じることは、実験時間内での水中へのキセノンの溶解量の違いによるものと考えられる。キセノンガス圧力をかけて初めにパージする際、高圧で数分間処理することにより、b-type が形成しやすいことが明らかになった。それは気・液を接触させたまま静置しておく、キセノンは拡散により溶解するが、このパージの間に気液界面を波立ち、気・液の接触面積が大きくなると (攪拌すると)、短時間でより多くのキセノンが水中に溶解するためと考えられた。

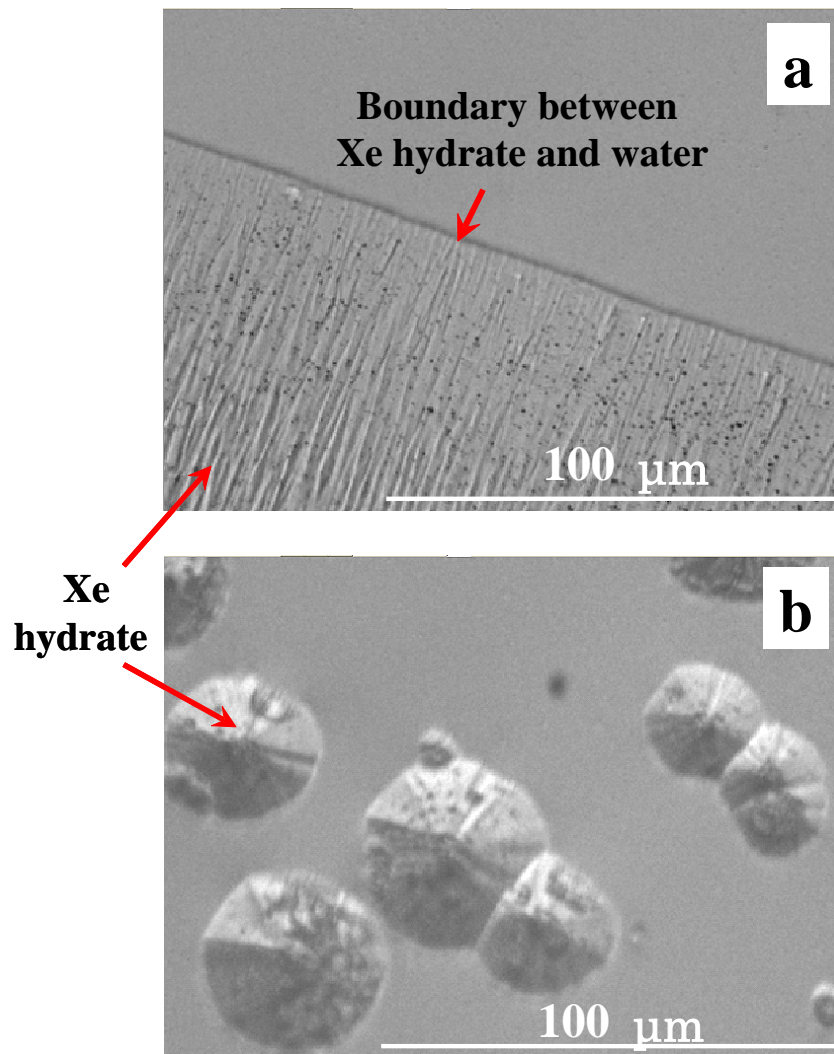


Fig. 2-5 Microscopic images of Xe hydrates in different formation. Two patterns were observed in initial stages of formation. In most cases, crystals grew two-dimensionally as shown in image a-type. In rare cases, small crystals appeared and agglomerated each other to cover the water surface as shown in image b-type.

(2) 水和物サイズの評価手法

Fig. 2-6 は 5°C, 1.0 MPa でキセノン水和物が形成し始めてから 48 h 後の水和物画像の一例である。この画像の観察領域は 365 μm ×310 μm であるが、水の表面は 4.52 cm^2 であるので、その一部である顕微鏡画像が水（あるいは結晶）全表面の性質を代表しているか不明である。そこで顕微鏡画像を 4 分割し、4 つの各画像間の状態に差異があるか否か検討した。当該画像について、Scion image により画像処理を行い、水和物の境界をトレースした結果を Fig. 2-7 に示した。図にある水和物が形成された面積から等価円直径を算出した。5 μm 以下の結晶は測定限界以下であるため、得られた 6~45 μm の等価円直径をヒストグラムとして示した (Fig. 2-8)。Fig. 2-8 に示したサイズ分布は全体で 503 個の水和物から得られたものである。一方、画像を 4 分割し、それらの各画像についてサイズ分布を求めた結果、いずれも Fig. 2-8 に示した分布と一致した。そこで、データ処理を簡略化するため、取得した画像の 1/4 の領域を分析の対象とした。

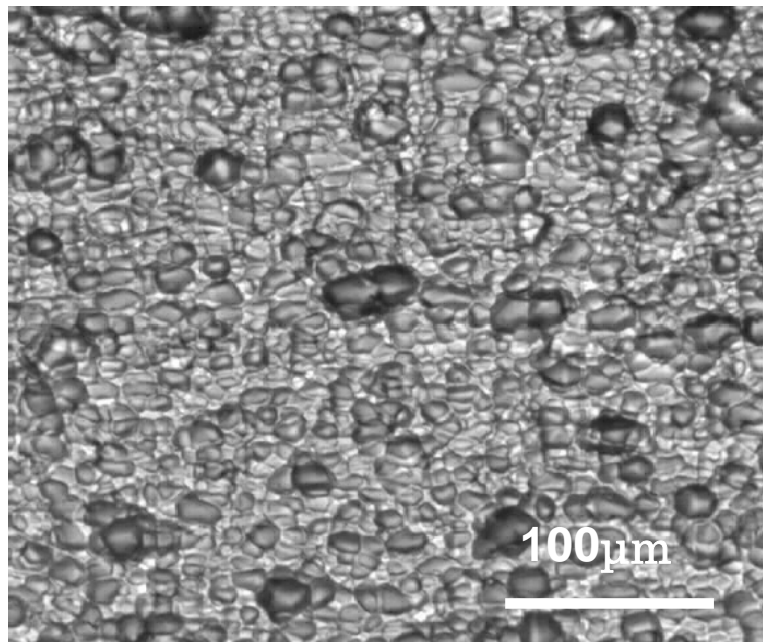


Fig. 2-6 Microscopic image of Xe hydrate over the water surface 48h after the onset of Xe hydrate formation.

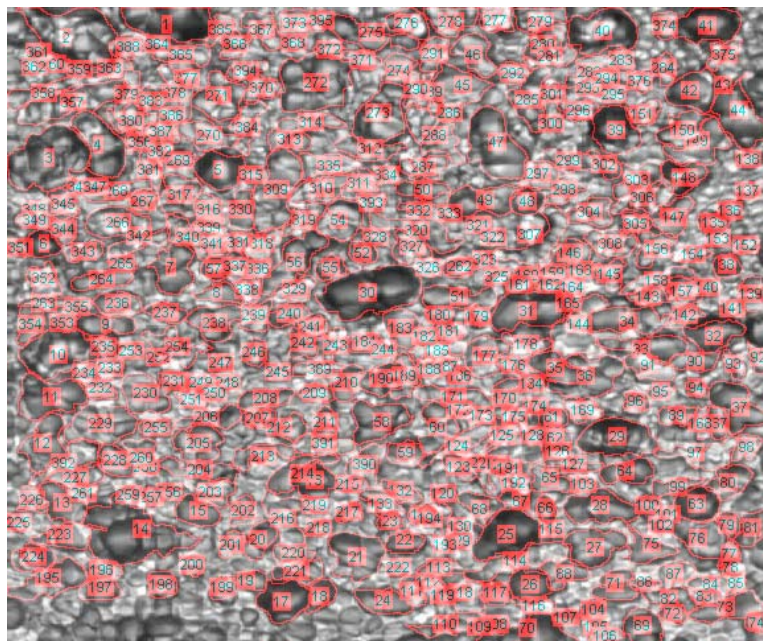


Fig. 2-7 Red lines in the boundaries of Xe hydrates identify ecircular diameter was calculated from the area.

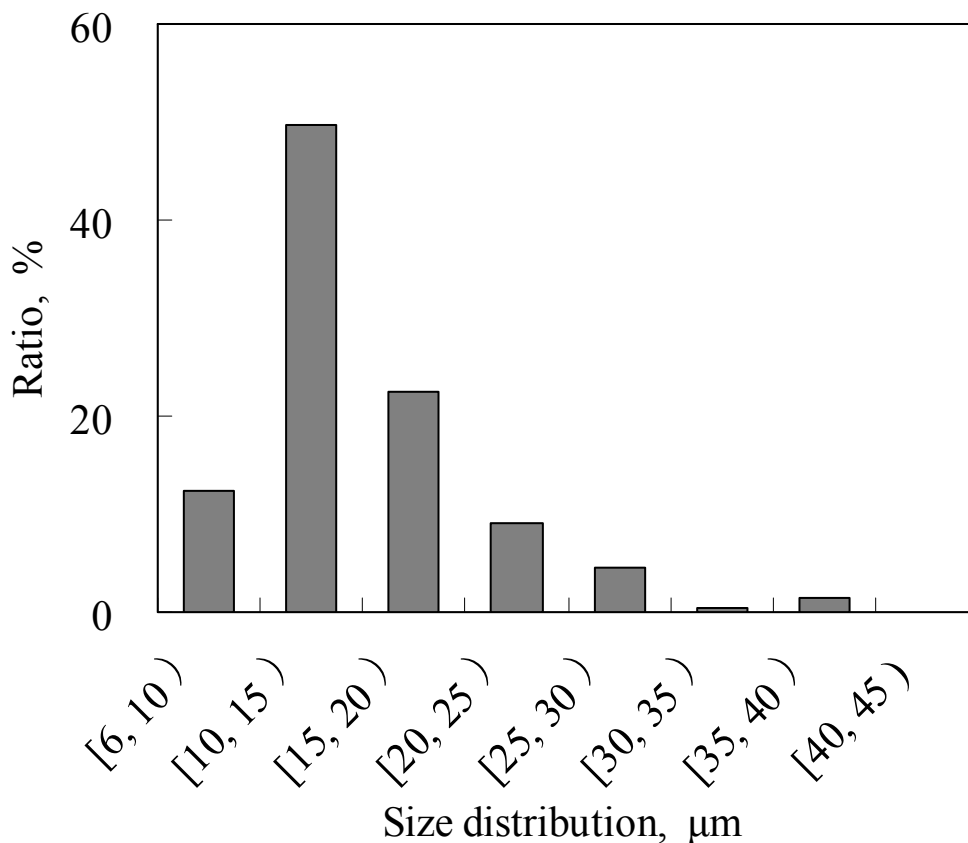


Fig. 2-8 Size distribution of 503 Xe hydrate crystals analyzed 48h after the onset of Xe hydrate formation at 5°C and 1.0 MPa of Xe pressure.

(3) 水和物サイズ分布への温度，圧力の影響

圧力一定の下で，温度が水和物のサイズ分布に及ぼす影響を調べるために，キセノンガス分圧を 1.0 MPa に固定し，1°C および 5°C におけるキセノン水和物のサイズ分布を比較した。Fig. 2-9 は 1°C で 246 個，Fig. 2-10 は 5°C で 208 個のキセノン水和物サイズ分布であり，いずれも水和物の形成開始から 1 h 後の顕微画像を処理した結果である。両図を比較すると，5°C の場合最多割合を占めた等価円直径は 10~15 μm であることが示された。これに対して，1°C の場合，最多割合を占めた等価円直径は 6~10 μm にあり，小さい方にシフトした。従って，圧力 1.0 MPa 一定では，温度が低いほど，小さいサイズの水和物結晶が多く形成される傾向が示された。

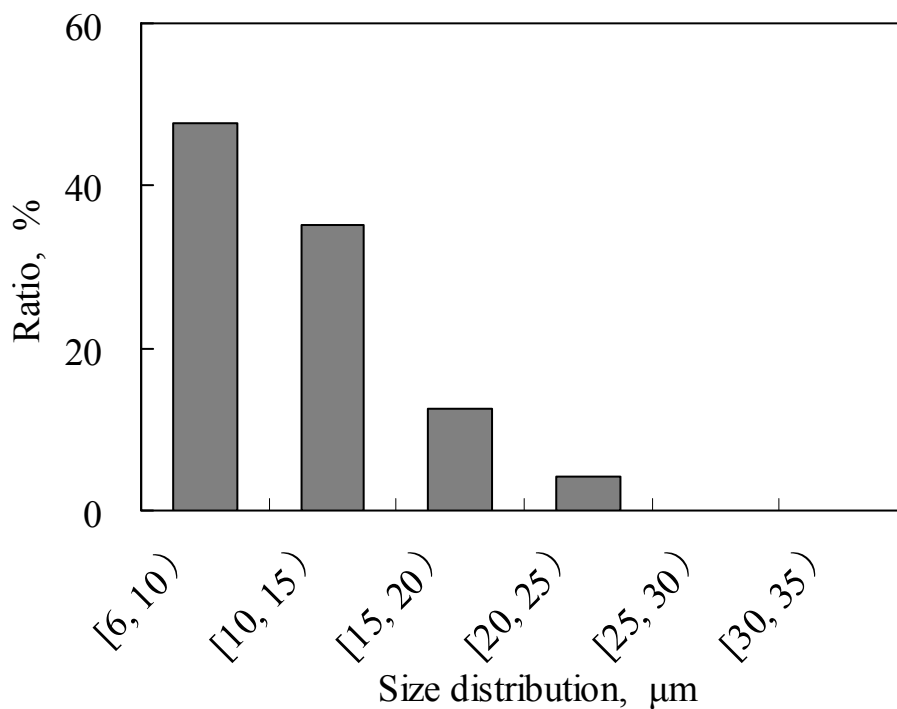


Fig. 2-9 Size distribution of 246 Xe hydrate crystals analyzed 1h after the onset of hydrate formation at 1°C and 1.0 MPa of Xe pressure.

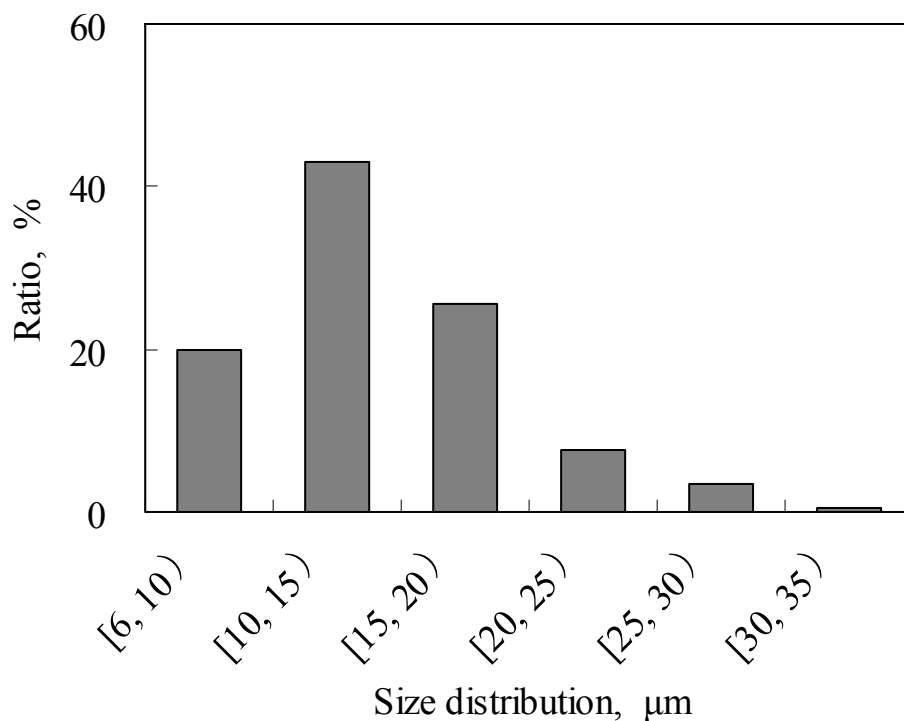


Fig. 2-10 Size distribution of 208 Xe hydrate crystals analyzed 1h after the onset of hydrate formation at 5°C and 1.0 MPa of Xe pressure.

Purwanto ら (2001) は、コーヒー溶液中に形成されたキセノン水和物結晶については、高温、低圧でサイズが大きいと報告されている。水中でも同様の傾向が期待されるため、小さいサイズの水和物を形成させるためには、圧力を高める必要がある。また、コーヒー溶液の濃度が高くなると、高いキセノン圧力が水和物の形成に必要であることが報告された。圧力が高いほど結晶サイズは小さくなる可能性があるが、実験で使用した容器の耐圧は 1.0 MPa が限界であるため、当該圧力よりも高い水準でのサイズ分布の検討は行っていない。そこで、温度一定の下で、圧力が水和物サイズ分布に及ぼす影響を調べるために、温度を 1°C に固定し、0.7 ~ 1.0 MPa の範囲で 0.1 MPa 刻みでキセノン水和物のサイズ分布を検討した (Fig. 2-11 結晶数 0.7 MPa, 294 個 ; 0.8 MPa, 309 個 ; 0.9 MPa, 244 個 ; 1.0 MPa, 246 個)。この場合も、水和物の形成開始から 1 h 後の顕微画像を処理した結果である。図からは、1.0 MPa の場合は、等価円直径が 6 ~ 10 μm の水和物が最も高い割合を占めた。これに対して、1.0 MPa 以外の場合は、最も高い水和物の割合は 11 ~ 15 μm の範囲にあった。したがって、圧力が高いほど結晶サイズが小さくなる傾向が示された。既往研究でも同様な傾向が見られ、原因としては、結晶成長の駆動力が大きければ、核生成数も多く、結晶成長も速いため、個々の結晶は小さくなると考えられた (Ewing *et al.*, 1974; Sakemoto *et al.*, 2010; Ohmura, 2004)。また、本研究で検討した範囲では、最も小さいサイズの水和物が形成される温度・圧力条件は 1°C, 1.0 MPa であることが示された。この条件下での水和物形成開始後 1 h, 24 h, 48 h における総数 646 個 (1 h, 246 個 ; 24 h, 232 個 ; 48 h, 168 個) の水和物サイズ分布の変化を Fig. 2-12 に示した。その結果、時間経過に伴い、小さいサイズの水和物の割合が減り、大きいサイズの割合が増え、時間とともにキセノン水和物が成長する傾向が示された。本実験で設定した他のすべての温度・圧力条件でも同様の傾向が認められた。これらの結果を考慮すると、1°C, 1.0 MPa の条件を細胞に適用すれば、

水和物結晶が形成されても、細胞への損傷が軽減できる可能性があると考えられた。

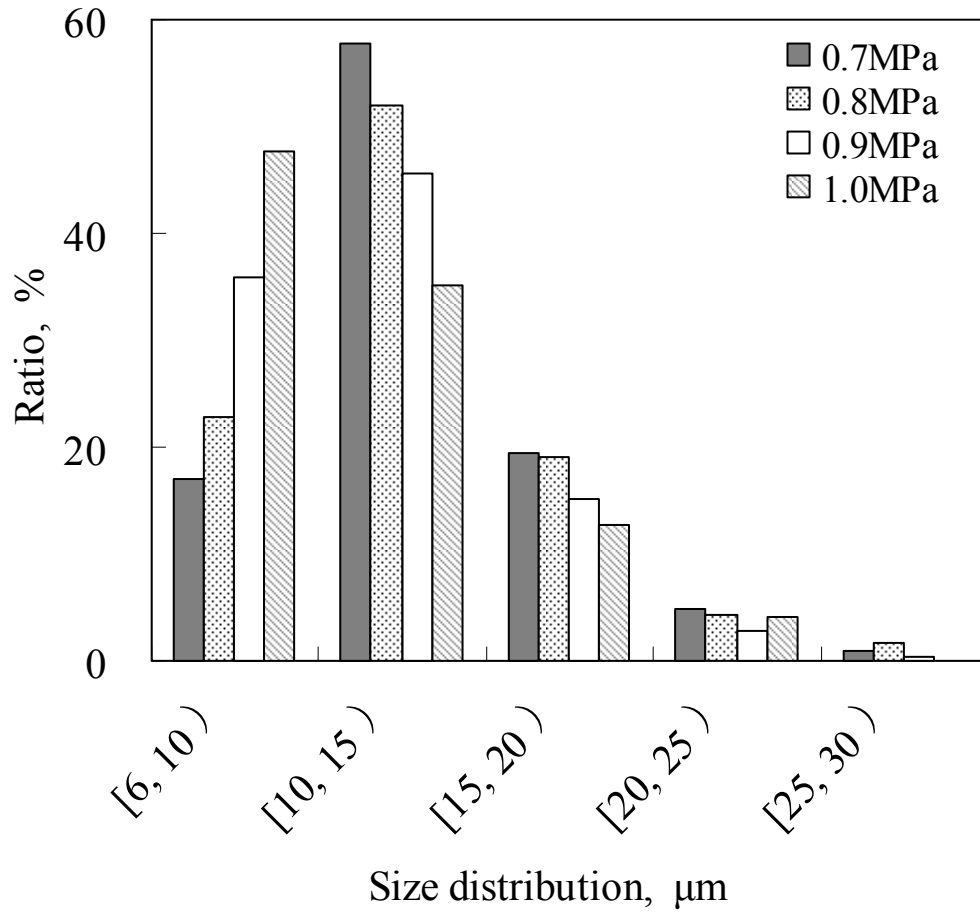


Fig. 2-11 Size distribution of Xe hydrate crystals analyzed 1h after the onset of hydrate formation at 1°C and the Xe pressure ranging from 0.7 to 1.0 MPa.

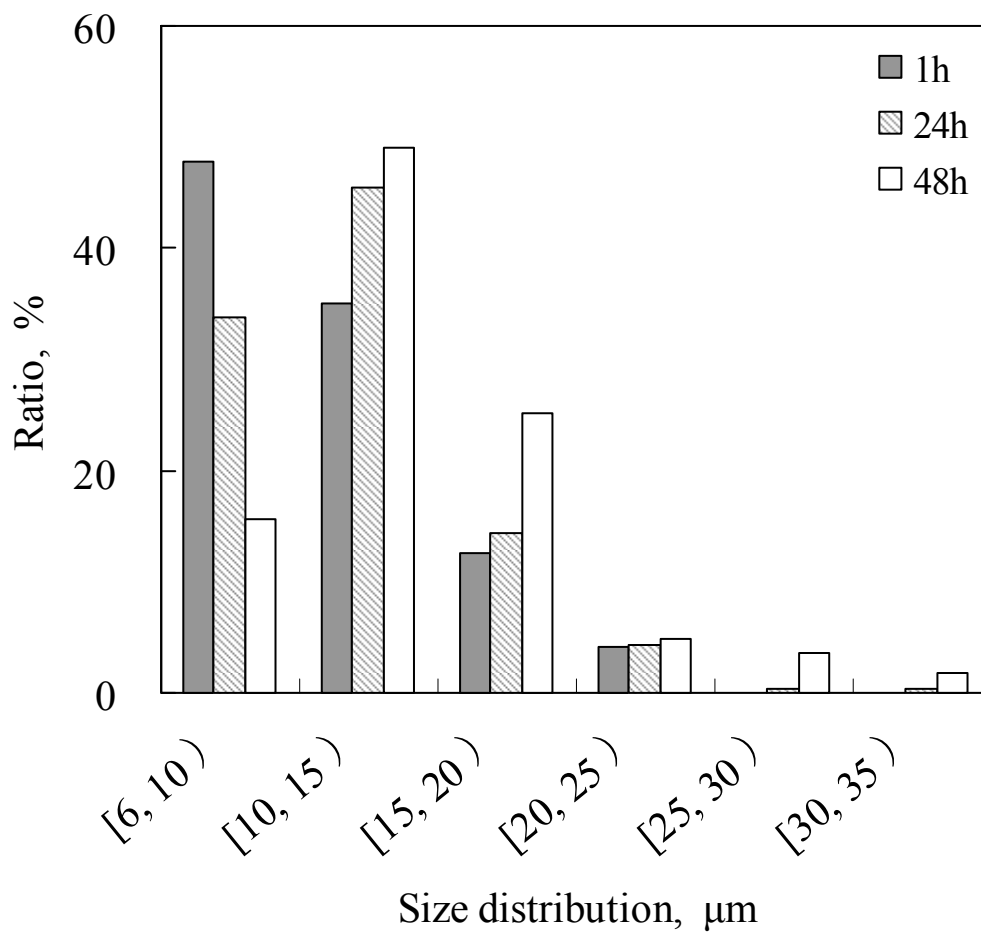


Fig. 2-12 Changes in size distribution of Xe hydrate crystals analyzed at 1°C and 1.0 MPa of Xe pressure over time.

2.3 オオムギ子葉鞘細胞の損傷評価

超純水を用いた実験から得られた、より小さな水和物結晶が形成する温度・圧力条件（1°C, 1.0 MPa）をオオムギ子葉鞘細胞に適用した。細胞内でも細胞より小さいサイズのキセノン水和物結晶が形成されるかについて、細胞膜の生存率を通して間接的に検討し、キセノン水和物による細胞膜の損傷について評価することを目的とする。そのため、-20°Cでの凍結保存区とキセノン処理区を比較し、細胞膜の損傷程度を細胞の生存率に基づいて評価した。なお、保存後の細胞の生死判定は原形質流動の有無を指標として行った。

ここで、原形質とは、細胞の微細構造が知られていなかった時代に作られた言葉で、細胞の中にある「生きている」と考えられていた物質のことである。具体的には核と細胞質（一般に細胞膜を含む）を指す。細胞の活動によって作られた「生きていない」物質、例えば細胞膜外の細胞壁や、細胞膜内の脂肪滴や澱粉粒などは原形質に含まず、後形質（副形質）と呼ぶ。原形質流動とは、生きている細胞の内部で、原形質が流れるように動く現象である。狭義には植物細胞で見られるような細胞の外形が変わらずに原形質のみが運動することを意味する（永井，1999）。

また、原形質流動は細胞内小器官に、種々の生体分子を輸送するための細胞運動である。ATPをエネルギー源とし、細胞骨格を形成しているマイクロ（アクチン）フィラメントとモータータンパク質（ミオシンなど）との相互作用によって流動力が生じる。これは動物の筋肉の収縮運動と機構的には極めてよく似ている。原形質流動の様式には細胞の種類により周回型、循環型、往復型がある（永井，1999）。

一方、植物細胞内の水はタンパク質、核酸、脂質、糖質などの生体高分子で構成される複雑な構造に取り込まれたコロイド系である。また、水よりも血液や生体タンパク質

などの生体成分に対して溶解度の高いキセノンは、これらの物質を介して組織内部にまで溶解・浸透可能であると考えられる (Cherubini and Bifone, 2003). より低い温度でゆっくり溶解させても組織の内部に水和物を形成させることが可能であると考えられる.

2.3.1 供試材料

実験材料には、実験室で栽培したオオムギ (品種名 コビンカタギ) を採用した. オオムギは栽培及び試料採取が容易であり, なおかつその子葉鞘細胞における原形質流動の観察が比較的容易である点を踏まえ, 測定に用いた.

まず, 種子をネットに入れ, インパーレスシーラー (富士インパルス (株) 製 FEP-II) で封をした. 25°Cに設定された恒温槽 EYEL 4 (東京理化工機 (株) 製 EYELA BATH SB-9) の水中に 24 h 浸漬後, 細かく砕いたバーミキュライトに播種した. 栽培に用いた容器は, 市販されているイチゴ用のプラスチック容器である. 1つの容器につき 20 個の種子を等間隔に播種した. 栽培は植物インキュベーター (東京理化工機株式会社製 アイラトロン FLI-301N) 中で行い, 明期 (約 18000 lx) 13 時間, 暗期 11 時間周期の下, 設定温度 20°Cとした. 養分として用いた KNOP 液の成分は, 蒸留水 100 g に硝酸カルシウム 0.5 g, 硝酸マグネシウム 1.0 g, 硝酸カリウム 0.5 g, リン酸二水素カリウム 0.5 g を溶解させた原液を蒸留水で 20 倍に希釈したものである. これを毎日適量供与し, 容器全体の質量を 350 g~400 g に維持した. 播種から 9 日~11 日目後に子葉鞘のみ (Fig. 2-13) を採取し, メス及びピンセットを用いて単層処理を施し, 観察に使用した.

ここで, 単層処理とは, 導管を傷つけないように二層からなる筒状の子葉鞘をメスで切り出し, 細く切ったテープを基部に貼って子葉鞘を平面状に固定した後, 層の隙間に鋭

利なピンセットを差し込んで外側の一層のみを剥がし，単層にする操作である (Fig. 2-14). 観察まで子葉鞘を乾燥させないように，単層処理し終わった子葉鞘を蒸留水の上に浮かべた．本処理によって細胞の重なりが解消されれば，顕微鏡下で透過光による原形質流動が観察しやすくなる．オオムギ子葉鞘は栽培が容易で，1つの細胞の平均的な大きさが $100\ \mu\text{m} \times 40\ \mu\text{m}$ で，比較的大きいため，光学顕微鏡を用いて原形質流動の観察が容易であることから，本実験の試料とした．

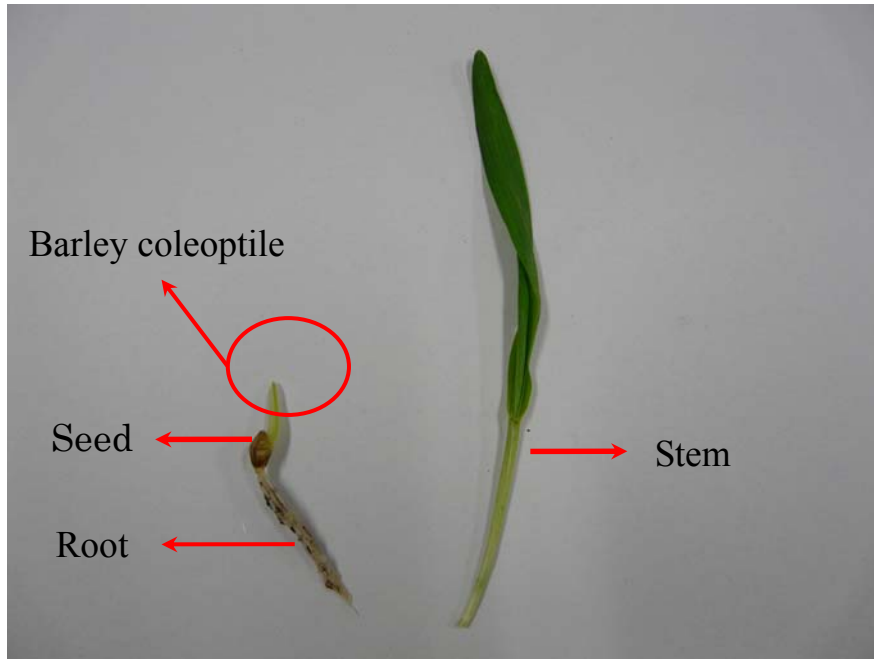


Fig. 2-13 Photograph of collected barley coleoptile.

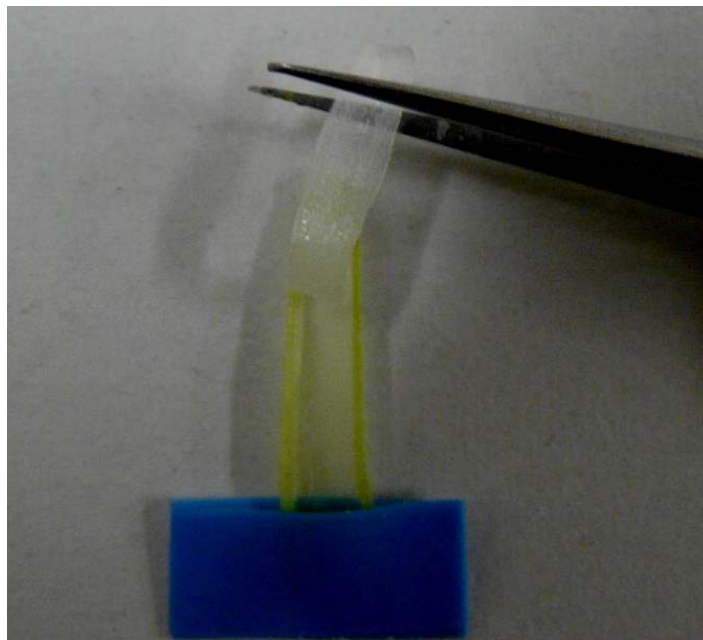


Fig. 2-14 Single-layer treatment of barley coleoptile.

2.3.2 オオムギ子葉鞘細胞の損傷評価方法

実験区には、結晶形成の影響を検討するために、キセノン処理区と凍結保存区を設定し、さらに凍結保存区を緩慢凍結保存区と急速凍結保存区に分けた。

キセノン処理区においては、前述したキセノン処理装置の試料室内にオオムギ子葉鞘組織片を静置した状態で、耐圧容器内を 1°C に設定し、少量のキセノンガスで容器内の空気を排除した後、 1.0 MPa のキセノンガスを圧入した。その後、核形成し、組織表面に水和物の結晶が出現するまでの過程を前述の高速ビデオカメラにより、 50 枚/s で記録した。顕微細胞像は 150 枚/s に設定すると暗いため、秒当たりの撮像数を減じて明度を上げた。その後、加圧したまま 1 h 、 5 h 、 9 h 、 12 h 保存し、温度を 20°C まで上げ、約 1 h かけて徐々にキセノンガスを放出し、水和物を解離させた。

緩慢凍結保存区では、子葉鞘組織片をシャーレ内に入れて、 -20°C の冷凍庫(SANYO製フリーザMDF-435)に静置した。その際、試料容器の温度を測定した結果、冷却速度は $-0.34^{\circ}\text{C min}^{-1}$ (-0.006 K s^{-1})であった。この速度で -20°C まで徐々に冷却し、凍結した。

急速凍結保存区では、クライオステージ(ジャパンハイテク製LK600PM)((株)(Fig. 2-15))を用いて $-5^{\circ}\text{C min}^{-1}$ (-0.08 K s^{-1})の冷却速度で -20°C まで冷却し、凍結した。



Fig. 2-15 Experimental setup in the experiment for the cryo stage.

緩慢凍結保存区 (-0.006 K s^{-1}) および急速凍結保存区 (-0.08 K s^{-1}) では、それぞれ2つのオオムギ子葉鞘組織片を用い、冷却開始後から1 h 保存し、その後 20°C で解凍した。同じ手順で5 h, 9 h, 12 h の保存実験を行った。

生存率については、キセノン処理区および凍結保存区とも、保存後に解離あるいは解凍した組織片を30 min, 20°C で蒸留水に浸した後、原形質流動が再開した細胞数の割合とした。この方法は、原形質流動が、細胞が健全な状態であれば活発に観測され、細胞の死後、観測されなくなることが知られていることを参考にした(大下ら, 1996; 町田, 2004)。細胞の観察は 20°C で、光学顕微鏡で行い、一つの子葉鞘組織片につき、先端部および中央部の各々二箇所、視野内の120~180個の細胞の原形質流動の有無

を確認するために、ビデオ撮影（1回につき3～5 min）を行った。原形質流動をすぐに確認できることも多いが、流動の速度が緩慢な場合は撮影した映像を早送りすることで、原形質流動の有無を確認することが容易になり、生死判別をより正確に行うことが可能となる。細胞の生存率（%）は、観察した全細胞数（a）に対する原形質流動が確認される細胞数（b）の割合（ b/a ） $\times 100$ により算出した。この生存率により細胞の損傷程度を評価した。実験の再現性を確認するため、各時間において二つのサンプルを用いる実験を行い、平均値を求めた。

2.3.3 結果および考察

Fig. 2-16 に透過型光学顕微鏡によるキセノン水和物形成前後のオオムギ子葉鞘細胞を示す。これらは、150 枚/s で高速撮影した画像の一例である。キセノンガスを封入する前のオオムギ子葉鞘細胞では、顆粒の活発な流動（原形質流動）が観測された。ここで、1°Cで1.0 MPaのキセノンガスを封入すると、キセノンガスの溶解により、十数分後に細胞内の原形質流動が停止することが観察された（Fig. 2-16-a）。この直後に、視野は暗化し、微細な結晶様の物質が形成されることが確認された（Fig. 2-16-b）。観察温度が1°Cであることから、細胞内に形成した結晶は、キセノン水和物であると考えられた。Fig. 2-16-a と Fig. 2-16-b の比較によると、図中の○印で囲まれた a と b の対応している部分では、原形質顆粒の位置が異なることが観察された。この理由は、細胞内部にガスが溶解し、水和物が形成されたために、顆粒が物理的に押されて動いた結果であると考えられた。したがって、細胞表面のみならず、細胞内にもキセノン水和物が形成されたと判断した。

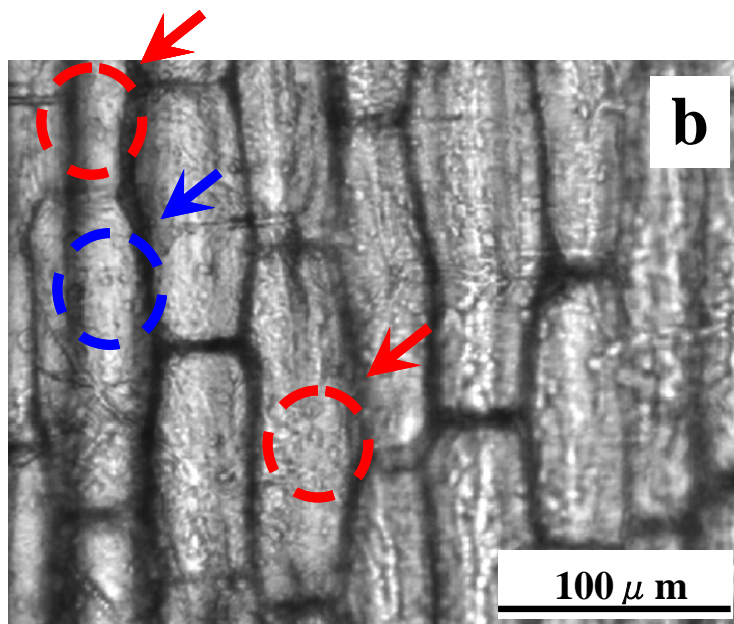
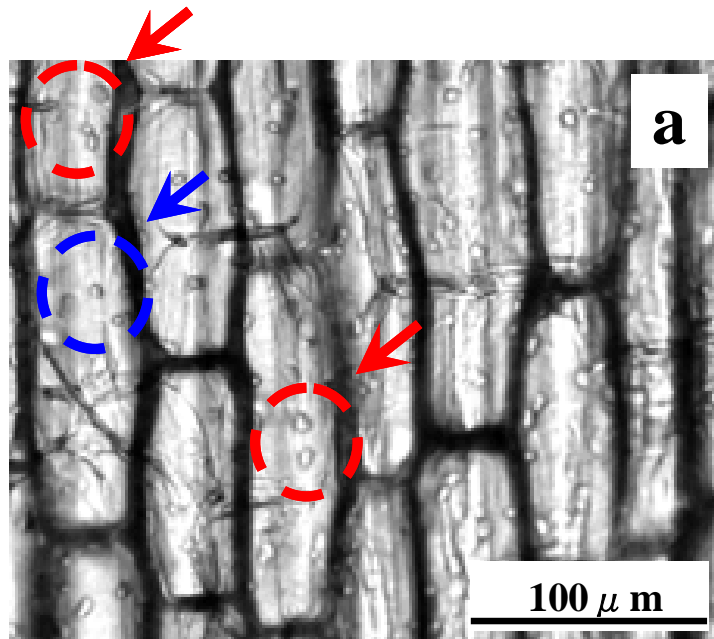


Fig. 2-16 Microscopic image of barley coleoptile cells before (a) and after (b) Xe hydrate formation. The arrows indicate granules in cells whose positions changed after the Xe hydrate formation.

また、キセノン処理区および凍結保存区の各処理時間後、子葉鞘を耐圧容器から取り出して、30 min 蒸留水中に浸した後、原形質流動を観察した。その結果、周回型、循環型の原形質流動が多く見られた。原形質流動の有無により細胞の生存率を計測した結果の一例として、1°C、1.0 MPa のキセノン保存区の 1 h 後に観察された原形質流動を有する細胞数及び生存率を Table 2-1 に示した。いずれの子葉鞘細胞でも流動が多数観察され、算出された生存率の平均値は 99%であった。

Table 2-1 Viable ratios of barley coleoptile cells 1h after Xe hydrate formation at 1°C and 1.0MPa of Xe pressure.

Sample 1	Total cells count (a)	Count of cells in flow (b)	Viable cell ratio (b/a)×100
Tip of coleoptile	35	34	97
Tip of coleoptile	37	37	100
Center of coleoptile	35	35	100
Center of coleoptile	31	31	100
Sample 2	Total cells count (a)	Count of cells in flow (b)	Viable cell ratio (b/a)×100
Tip of coleoptile	46	46	100
Tip of coleoptile	49	48	98
Center of coleoptile	42	42	100
Center of coleoptile	38	38	100

次に、Fig. 2-17 に、キセノン水和物を形成させた細胞、急速凍結および緩慢凍結により、 -20°C で氷結晶を形成させた細胞の生存率を示す。横軸は、水和物あるいは氷結晶が形成した後の経過時間である。Fig. 2-17 より、緩慢凍結 (-0.006 K s^{-1}) および急速凍結 (-0.08 K s^{-1}) 保存した組織片では、氷結晶形成から 1 h 後に、細胞の生存率は 30~40%まで低下することが示された。急速凍結 (-0.08 K s^{-1}) の方がより細胞の生存率が高く、細胞構造の破壊が緩慢凍結の場合より軽減された可能性がある。このような冷却速度と細胞構造の破壊の関係に関して、Roy ら (2001) は、ニンジン組織を -0.003 K s^{-1} で冷却・凍結処理すると、細胞構造の観察結果から細胞壁間に亀裂が生じることを示した。しかし、 -0.075 K s^{-1} 冷却・凍結処理した細胞壁間には亀裂が観察されず、細胞構造に変化がみられないと報告している。従って、本研究の冷却条件において、子葉鞘組織を -0.006 K s^{-1} で凍結するよりも -0.08 K s^{-1} で凍結した場合の方が、細胞構造の破壊が軽減された可能性が高いと考える。

一方、キセノン水和物を形成させた組織片では、9 h 後でも約 40%の細胞が生存していることが確認された。この結果から、凍結保存区よりキセノン処理区の方が細胞の損傷が軽減できることが示唆された。

キセノン処理区と凍結保存両区の生存率の間に差があるか検定を行った結果、1%水準で有意差があることが示された。すなわち、原形質流動の有無を生存率の基準とした場合において、キセノン処理区の生存率が有意に高いと考えられた。

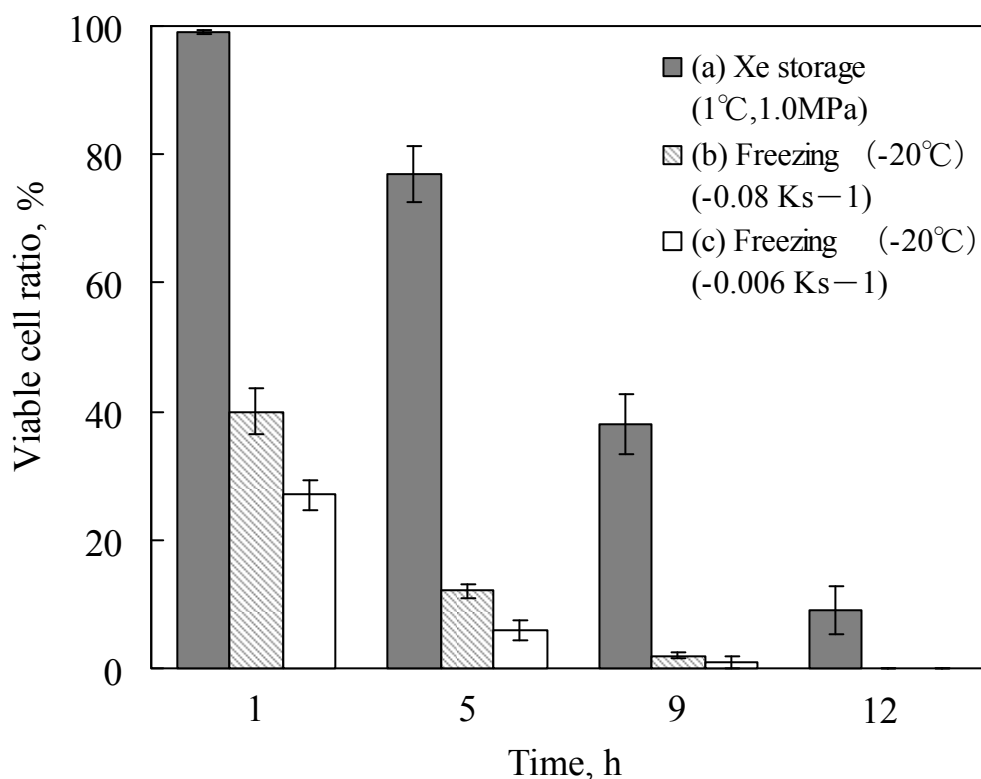


Fig. 2-17 Viable ratios of barley coleoptile cells at each preservation time.

- (a) preservation by Xe hydrate formation at 1°C and 1.0 MPa of Xe pressure, (b) frozen preservation at -20°C with freezing rate of -0.08 K s^{-1} and (c) frozen preservation at -20°C with freezing rate of -0.006 K s^{-1} .

この結果は次の2つの可能性を示唆する。(1) キセノン保存区では、細胞内の一部に水和物が形成されない領域がある。(2) 水和物は細胞の全域で形成されるが、氷結晶よりは細胞に与える損傷が少ない。本実験で用いた組織片は一層の細胞(1200~1500個)から構成されているので、キセノンガスは細胞内に容易に溶解すると考えられるが、細胞の全域における水和物の形成については、別途、実験的に確認する必要がある。

また、(1)の可能性についても検討の必要がある。安藤ら(2009)の報告によれば、

タマネギを 5°C, 0.8 MPa の下でキセノン中で保存した結果, 組織表面付近におけるキセノン水和物の形成と共に組織内部においても特定の部位でキセノン水和物が形成・成長したが, 保存 7 日後でも, 組織片全体の 48% しかキセノン水和物が形成されなかった. この報告では, 一層の細胞ではなく, 細胞組織の塊を用いているため, 本実験と直接の比較ができないが, 細胞内の水和物形成が全域にわたるのか一部に限定されるのかについては, 今後検討する必要がある.

いずれにしても, 細胞内水の構造化が比較的不均一に進行した結果, 水和物形成後 1 h では, Fig. 2-16-b において, 細胞内に微細な水和物が顕在化して見え, 水和物解離後の細胞生存率結果から細胞の変形や物理的な力による損傷が抑制された可能性が推察された. しかし, 2.1 で述べたように, 保存時間の経過とともに水和物結晶が成長し, 膜が破壊されたことにより, 生存率が低下したと考えられた. 一方, 凍結保存区でも, 氷結晶形成後の時間経過とともに生存率が低下したが, 同じ経過時間で比較すると, 生存率はキセノン保存区よりも低い値を示した. この理由は, 細胞より大きいサイズの氷結晶が形成されたために, 細胞膜の損傷が著しく生じたためと推察された.

2.4 結言

キセノン水和物は、それを形成させる条件によって結晶のサイズが異なることが超純水を用いた実験で示された。検討した条件の範囲で最小サイズの水和物ができる条件は1℃、キセノン分圧 1.0 MPa であることが示された。

この条件でオオムギ子葉鞘細胞を処理したキセノン保存区での細胞生存率を凍結保存区と比較し、処理後の細胞の損傷程度を評価した。その結果、1 h 後のキセノン保存区では、いずれの子葉鞘でも極めて活発な原形質流動が観察され、平均生存率は 99% という高い値であった。また、すべての保存時間においてキセノン保存区の方が凍結保存区よりも高い生存率を示した。これは、細胞の変形や物理的な力による損傷が抑制されたためと考えられた。

また、保存時間の延長に伴い細胞生存率が徐々に低下することがキセノン処理区および凍結区とも観察された。これは、キセノン水和物と氷結晶が時間経過とともに成長したことで、子葉鞘細胞に損傷を与え、生存率が低下したのと考えられた。以上の検討結果から、細胞においてキセノン水和物が形成されることが確認された。また、キセノン保存区では凍結保存よりも細胞の生存率が高く維持され、細胞膜の損傷が抑制できる可能性が示唆された。本章では1℃、1.0 MPa において、組織保存にキセノン水和物が利用可能であることが示された。しかし、子葉鞘組織全域にわたって細胞を壊さない程度のキセノン水和物が形成しているのか、一部に大きなサイズの水和物が形成しているのかは不明である。今後キセノン水和物の形成割合を検討し、細胞膜への損傷を生じない条件を明確にする必要がある。

第3章 組織におけるキセノン水和物形成割合

3.1 緒言

キセノン水和物を利用した長期保存法の検討に先立って、前章において、組織に損傷を与えない適切な保存条件を見出すために、1°C、1.0 MPaにおける子葉鞘組織内のキセノン水和物の形成を確認し、細胞の損傷程度を保存後の生存率に基づいて評価した。その結果、保存時間に伴う生存率の低下、組織の損傷の増大が確認された。このように、野菜組織内でのキセノン水和物の形成・成長プロセスとその形成・解離処理後の細胞の損傷の原因について、安藤(2010)は次のように予測した。

“低温で、生鮮野菜組織をキセノンガス中に静置すると、ガス分子は組織内を拡散し、溶解度の高い細胞膜に多量に溶解を始める。その後、この細胞膜に溶けたガス分子から細胞内の水に溶解を始めるとともに、ガス分子の溶解によって細胞内の水は構造化を始める。そして、ガス濃度の勾配に従って、細胞内で水和物の形成が起きる（不均質水和物核形成プロセス）。この過程では、ガスの濃度勾配に従って、細胞膜と細胞内溶液界面に水和物が形成されるため、水和物の形成量の増加に伴い、細胞膜に対する損傷は増す。したがって、水和物の割合を制御することで組織テクスチャーの低下が抑制される。”

この予測からは、キセノン水和物も結晶であるため、その過剰な形成によって、農産物が損傷を受ける可能性があり、保存中の組織への損傷を最小限に抑えるためには、組織内の結晶化の割合を把握し、それを制御する方法を示すことが必要と考えられる。

一方、前章においては、キセノン処理または凍結処理したオオムギ子葉鞘細胞の生死は、解離または解凍後の原形質流動の有無により判定した。凍結障害発生の初発部位が細胞

膜であるとされることを考慮すると、原形質流動の有無は保存後の細胞膜機能を評価する良い指標であると考えられる。しかし、細胞膜機能の厳密な生死判定は原形質流動では難しいが、生死が不明であっても、細胞膜が物理的に損傷していなければ、食品としての品質が保持される可能性があると考えられる。そのため、長期保存の場合、生存率を基準に細胞膜の損傷程度を評価するのは困難であるが、新たな基準として細胞膜の状態と密接な関係を有する細胞内水の拡散係数および細胞膜の水透過性の変化で評価する方法が有効であると考えられる。

そこで、本章では、 1°C 、 1.0 MPa において、保存時間（キセノンに暴露する時間）に伴うキセノン水和物の形成割合を測定し、解離後の細胞膜の損傷程度を、生存率ではなく、細胞内水の拡散係数および細胞膜の水透過性の変化に基づいて評価した。

3.2 供試材料

播種から 9～11 日後のオオムギ（コビンカタギ）子葉鞘を採取し，単層処理を行った組織片 8 枚（0.05～0.08 g）を Fig. 3-1 に示した 1 本の NMR 用耐圧(1.0 MPa)試料管（ガラス製）に入れ，生鮮試料とキセノン保存試料をそれぞれ 2 本用意した．ここで，外径 10 mm に試料管の底から 15 mm を越えないように試料を入れた．また，オオムギ子葉鞘内に形成されるキセノン水和物の割合を，NMR を使用した Solid Echo 法による ^1H 緩和時間 T_2 のシグナル強度で判断した．このとき十分なシグナル強度を得るために，測定可能な子葉鞘の枚数を予め検討した結果，8 枚となった．なお，子葉鞘の水分含量を常圧加熱乾燥法により測定したところ，90.6%（w.b.）であった．



Fig. 3-1 Glass tube for NMR including eight pieces of barley coleoptile .

3.3 実験方法

Fig. 3-2 に示す圧力付加ユニットを通して、1.0 MPa のキセノンガスを NMR の耐圧試料管に封入し、処理温度を 1°C に維持した。この条件下で処理時間を調整し、NMR を使用した Solid Echo 法による ^1H 緩和時間 T_2 のシグナル強度から、1°C でのキセノン水和物形成割合を算出した後、それぞれの試料を 20°C で解離させた。試料における細胞内水の拡散係数および細胞膜の水透過係数を測定し、それらの結果に基づいて細胞膜の水透過性を評価した。ただし、解離条件として、ガス抜きによる細胞膜の損傷を避けるため、20°C の恒温機において、30 min で 0.1 MPa の速度 ($0.033 \text{ MPa min}^{-1}$) でキセノンガス分圧を 0 MPa になるまで減圧し、完全に解離させた。

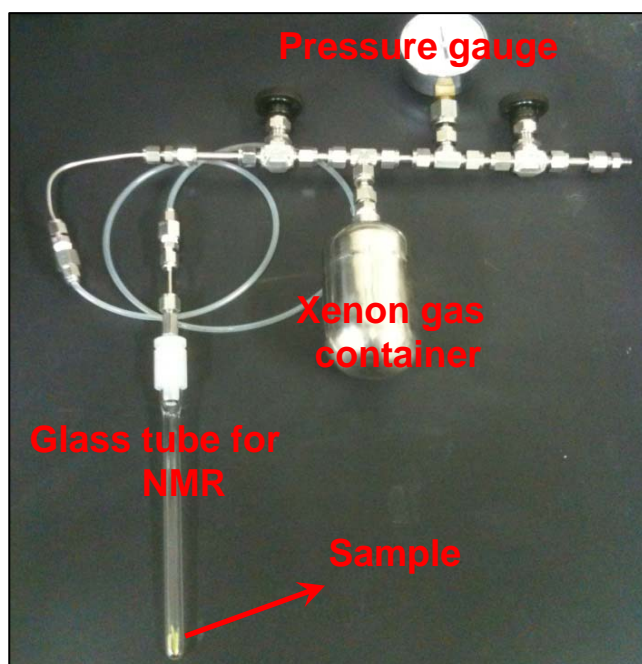


Fig. 3-2 Experimental setup for introducing Xe gas into NMR sample tube.

3.3.1 NMR を用いた水和物形成割合の測定

(1) NMR 装置の測定原理

NMR は ^1H の核磁気共鳴を利用し、その緩和時間から、試料の分子運動性を評価する装置である (Fig. 3-3).



Fig. 3-3 Photograph of the NMR spectrometer (JEOL, MU25A) in the experiment for content of Xe hydrate measurement.

NMR は原子核を持つ磁気モーメントを観測することをその原理としている。そしてその原子核の磁気モーメントの性質は、原子核スピンと関連する。原子核はひとつの独立した角運動量を持っているが、実際の測定では、試料中に存在する ^1H の磁気モーメントをひとつずつ観測することが不可能であるため、すべての磁気モーメントの和を観

測することになる。観測されるベクトルはすべてのベクトルの和で、磁化ベクトルと呼ぶ。

NMR では、測定の対象は磁化ベクトルの大きさではなく、その緩和過程であり、これを緩和時間という。緩和現象とは非平衡状態から平衡状態への回復である。これに対応して NMR シグナルも、はじめと同じ強度で観測できるようになる。この熱平衡に戻る緩和過程にはスピン - 格子緩和（縦緩和）とスピン - スピン緩和（横緩和）がある。

縦緩和は、エネルギーの高い系が余剰なエネルギーを放出して、エネルギーのより低い熱平衡状態へと回復していく過程と考えることができ、 T_1 をスピン - 格子緩和時間と呼ぶ。また、横緩和は個々のベクトルの位相が乱れることによってその総和として観測される横磁化が減衰していく過程である。すなわち、個々のベクトルが $x - y$ 平面上で展開して位相を失っていく現象で、 z 方向の変化を含まず、エネルギー的な変化は伴わない現象であり、 T_2 をスピン - スピン緩和時間と呼ぶ。 T_1 は主に液体試料の測定に利用されることが多く、 T_2 は固体試料の解析に非常に有効である（ラーマン, 1989）

(2) 水和物形成割合の測定

生鮮組織試料と同様の試料管 2 本を 1 組とし、キセノンガスを分圧が 1.0 MPa になるまで封入し、 1°C で 1, 5, 9, 12 h 保存したそれぞれ 1 組の試料について、25 MHz のパルス NMR 装置 (MU25A, JEOL) を用い、Solid echo 法より試料内の水の T_2 を測定し、NMR シグナル強度の観察を行った。

Solid echo 法はその名のとおり固体試料を対象にしているので、非常に速い横緩和現象が起きると予想される。Solid echo 法のパルスシーケンスを Fig. 3-4 に示す。繰り返し時間は 30 s, 積算回数は 16 回とした。測定された NMR シグナル強度(R)より式 (3-1) を用いて試料中の固相の T_2 を算出した (Zhang *et al.*, 2004)。なお、測定は 1°C で行

った。

$$R(t) = \sum_i F_i \exp \left[-\frac{1}{2} \left(\frac{t}{T_2} \right)^{WI} \right] \quad (3-1)$$

ここで F_i は各成分体積分率， WI はワイブル係数を示す。ただし，これらの計算は MU25A system program (MU25A, 日本電子株式会社) を使用して行った。

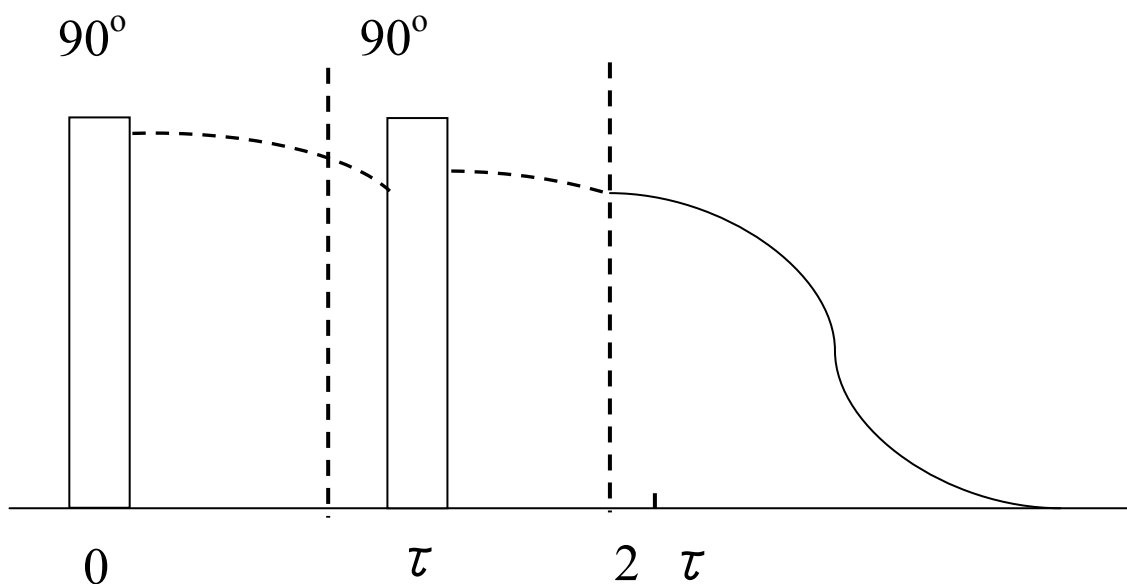


Fig. 3-4 Explanatory diagram of solid echo pulse sequence.

3.3.2 NMR を用いた細胞内水の拡散係数の測定

(1) 細胞内水の拡散係数の測定

並進の拡散には，自己拡散と相互拡散の2種がある。純液体や溶液，ゲル中の分子は乱雑な熱運動を行っており，そのため溶液中のある位置から r だけ離れた位置に， t 時

間後に到達する確率が存在する。もし、溶液中の濃度が不均一ならば、分子が濃度の高いほうから低いほうへと自発的に移動する確率が、逆方向への確率よりも大きいので、この方向への分子の流れが生ずる現象を相互拡散と呼ぶ。これに反して、上述の純液体または濃度が均一な溶液およびゲル中の分子の移動を自己拡散と呼ぶ(上平ら, 1989)。すなわち、自己拡散が起こる原因は分子の熱運動そのものであるから、自己拡散により分子の動的状態や溶液構造の影響などを知ることができる。そのため、本研究ではキセノン水和物により細胞膜の構造への影響を明らかにするために自己拡散係数の測定を行った。

自己拡散係数を測定する方法として、パルス磁場勾配法が広く用いられる。これはスピン系に時間 τ の間隔で 90° パルスと 180° パルスを与えるときに、 2τ 後に生ずるエコーの振幅が外部磁場勾配で与えられた磁場の不均一性によって小さくなる現象を利用して自己拡散係数を測定する方法である。この方法で測定可能な D の値はプロトンであれば $10^{-9} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ のオーダーであり、また T_2 の値が十分短い核の自己拡散係数を測定することができる。

本研究において、拡散係数の測定には、NMR装置の ^1H 磁場勾配Stimulated Echo法(Kimmich, 1997)を使用した。これは、 90° - 90° - 90° エコー系列を用いたパルス磁場勾配法である。その原理として、 $t=0$ と $t=\tau$ で $\pi/2$ および π パルスを与え、次に $0 < \Delta < \tau$ の間に、パルス幅 δ の勾配磁場 G を与え、もう一度 Δ 時間後 ($\tau < \Delta < 2\tau$) にパルス磁場を与えると、エコーシグナルは $t=2\tau$ 後に現れる。 τ または G の大きさは変えることができる。すなわち、2番目の 90° パルスから3番目の 90° パルスの間に T_1 は減衰する。Fig. 3-5に示すように、一回目の 90° パルスの直後と三回目 90° パルスの直後にそれぞれ磁場勾配強度 G 、パルス幅 δ の磁場勾配パルス G を挿入すると、得られたエコー強度 E は式3-2で表される(ファラー・ベッカー, 1976)。

$$\ln(E) = \ln(E_0) - D(\gamma G \delta)^2(\Delta - \delta/3) \quad (3-2)$$

ここで、 Δ (ms) は二つの磁場勾配パルスの間隔で、拡散観測時間、 γ は ^1H の磁気回転比で $4258 \text{ Hz Gauss}^{-1}$ である。 δ (ms) または G を変化させてエコー強度を測定し、 $\ln(E)$ を $(\gamma G \delta)^2 (\Delta - \delta/3)$ に対してプロットし、その勾配から拡散係数 $D(\text{m}^2 \text{ s}^{-1})$ を求めることができる。本研究では G を変化させて D を測定した。

この Stimulated Echo 法が有用となるような T_2 の短い系では T_1 が相対的に長いため、最初の励起からエコーを得るまでのシグナルの緩和をある程度抑制することができ、これにより Δ または δ を長く設定できる。

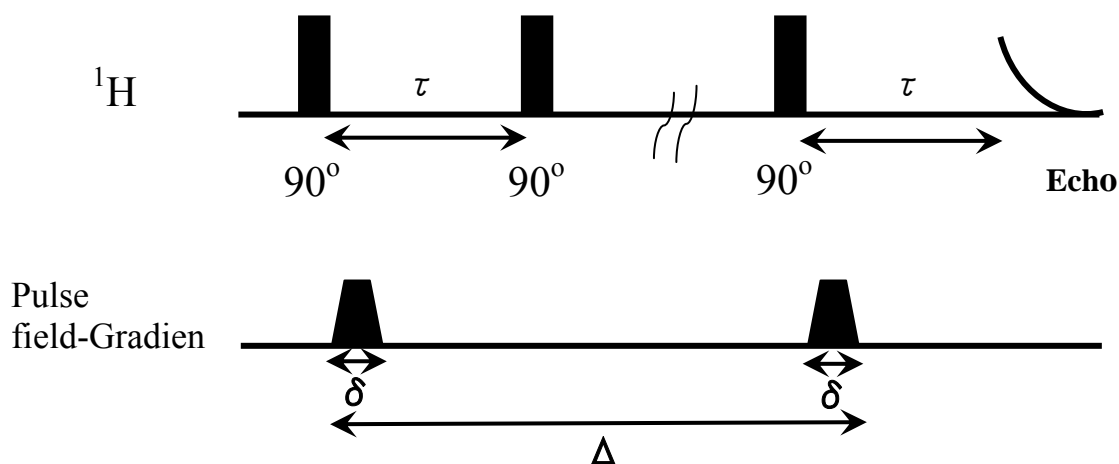


Fig. 3-5 Stimulated echo pulse sequence in NMR measurement.

(2) 制限拡散現象

生体系では、水は生体膜や細胞器官によって細分化されている。したがって、自己拡散係数の測定時間が長いと、水分子は障壁に衝突する。このため並進運動は阻害され、

結果として、実測される自己拡散係数が小さくなる。この効果を制限拡散と呼ぶ。NMRの応用的利用法として、水の拡散の測定から、試料の構造を把握する試みが行われてきた。Meerwall and Ferguson (1981)によると、NMR測定法を用いて水の拡散を観察した場合、細胞などの閉鎖的な系において、水分子の拡散が制限される現象、すなわち制限拡散が観察されることが知られている (Fig. 3-6)。

この制限拡散の場合、拡散係数は拡散観測時間の増加に伴い減少するが、無制限に減少することではなく、ある時間の経過後に一定値に収束する (Fig. 3-6 青線)。この現象は、生体組織などの細胞構造を持つ系では、細胞膜あるいは細胞壁に起因すると報告されている (Woessner, 1961 ; Woessner and Gutowsky, 1963)。しかし、細胞がなんらかの力によって破壊されると、細胞内水の拡散は制限されなくなり、自由拡散に近づくこととなる (Fig. 3-6 赤い点線)。本章で検討するキセノン水和物形成・解離後の子葉鞘組織では、大量のキセノン水和物結晶の形成による細胞膜の損傷などが原因となり、制限拡散が弱まることも予想される。

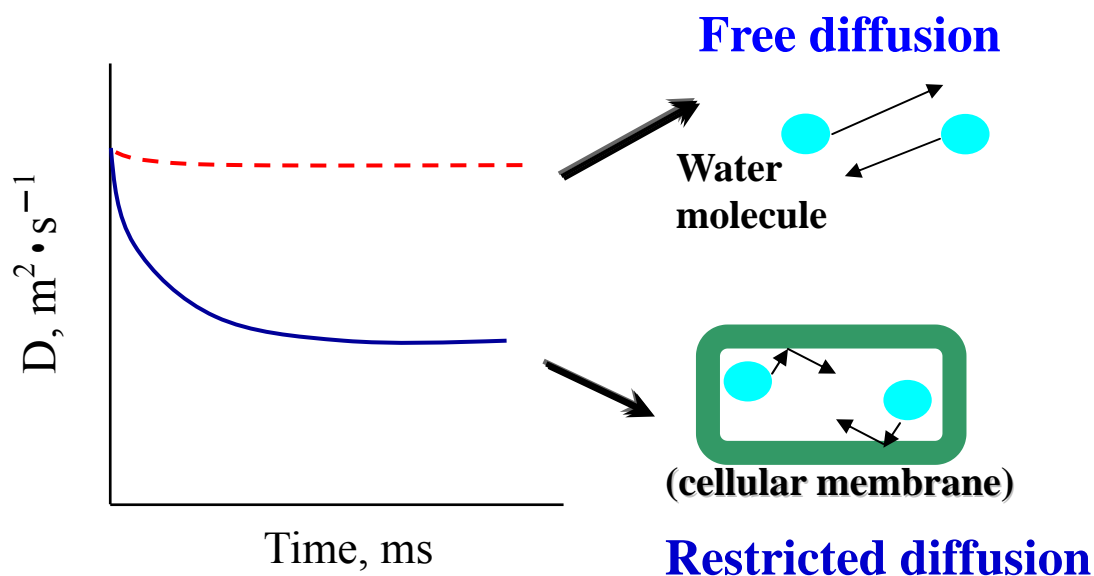


Fig. 3-6 Image of the restricted diffusion. When there are water molecules in free space, the diffusion coefficient of water molecules is constant and there is no change with time. Conversely, when there are water molecules are contained within a limited space, the diffusion coefficient is not constant and decrease with time.

本章では、前述の試料を用い、細胞膜の水拡散係数を、NMRの Stimulated Echo 法により求めたキセノン形成・解離後の細胞内水の拡散係数の経時変化から、制限拡散の有無を評価した。ただし、 Δt は 20~500 ms の範囲とし、磁場勾配強度 G を 21.1~49.5 Gauss cm^{-1} として、20°Cで測定を行った。

NMR シグナルの観察時間を長く取ると、細胞膜が健全であれば、拡散係数は小さくなる。これは細胞膜が障壁となって水分子の移動を物理的に防げるため、制限拡散現象が観察されれば、細胞膜が健全であると判断できる(Tanner, 1978)。

3.3.3 NMR を用いた細胞膜の水透過性の測定

上述したような NMR を用いた細胞内水の拡散係数の測定は可能である。この測定によって試料の構造を把握する試みが行われてきた。この制限拡散の観測によって細胞の構造状態変化を数 μm のスケールで把握でき、植物や動物組織の水分子の透過性の評価法として報告されている(Clark and Bihan, 2000)。

一方、NMR 測定法を用いた植物組織の細胞膜の水透過は、生鮮植物のプロトプラストを用いた T_2 の測定より検討されている (Sotome *et al.*, 2004)。しかし、キセノン水和物形成・解離処理をした試料からプロトプラストを調製することはできない。

細胞構造を持つ組織において、NMR 測定で得られた植物組織の水透過係数は約 10^{-5} m s^{-1} オーダーであると報告された(Anisimov *et al.*, 1998)。また、組織薄片の原形質分離の観察より算出された測定温度 20°C におけるタマネギ組織の細胞膜の水透過係数は $10^{-5} \sim 10^{-6} \text{ m s}^{-1}$ であることが報告されている(Kamiya and Tazawa, 1956)。

本章では、NMR 装置を用いて、Stimulate echo 法による拡散係数の測定を 20°C 行った。 Δ は $20 \sim 500 \text{ ms}$ の範囲とし、得られた拡散係数と拡散観測時間をプロットすることで制限拡散現象を観察し、式 3-3 より水透過係数 P_{ef} の算出を行った(Anisimov *et al.*, 1998)。

$$D_{\infty}^{-1} = D_0^{-1} + (P_{ef} \cdot a)^{-1} \quad (3-3)$$

ここで、拡散が最も制限されたとき D_{∞} は Δ が十分長いときの拡散係数、 D_0 は最も短い時の拡散係数、 a は障壁間距離を示す。ただし、本研究において水透過係数 P_{ef} の計算には、測定データの精度および NMR 装置の性能を考慮して $\Delta = 20 \text{ ms}$ で得られた D_0 および $\Delta = 500 \text{ ms}$ で得られた D_{∞} を用いた。障壁間距離 (細胞のサイズ) は光学顕

微鏡観察によって調べることができる。オオムギ子葉鞘の細胞サイズは約 $40\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$ であり、縦横比が違う細胞であるが、ここでは a を $40\ \mu\text{m}$ に固定し、水透過係数の算出を行うことで、キセノン水和物を形成・解離させた組織においても細胞膜の水透過性の増大の程度を定量的に推察できる。この推察から、細胞膜の水透過性の評価に基づいて、細胞膜の損傷程度が推察できる。

3.4 結果および考察

パルス NMR 測定では、高次構造（不均質性）に対応した緩和現象を観察することができる。すなわち、 T_2 など各種の緩和時間の測定により、系の分子運動性と緩和時間に対応したシグナルの成分量を直接評価できる。そこで、NMR シグナル強度により、試料中の固体部分と液体部分に存在するプロトンの割合の評価を試みた。

一定時間 90° パルス照射した後、試料中のすべてのプロトンの磁化ベクトルの和 M は指数関係的に自由誘導減衰(FID)を起こす。この M の FID はシグナル強度(R)として観測される。したがって、 90° パルス照射直後のシグナル強度 S は、試料中のプロトンの総量を示すと言える。試料内に 2 つ異なる T_2 を持つプロトンが存在する場合、Fig. 3-7 の 1°C 、 1.0 MPa でキセノンガス処理 9 h のオオムギ子葉鞘組織に含まれるシグナル強度の測定結果に示したように、 $\ln(R)$ vs. 時間プロットは 2 つの異なる傾きを持つ直線から成る。 S と傾きの分岐点のシグナル強度 L より、式 3-4 で示すように、短い成分に対応するプロトン（試料全体の固体部分）の割合が計算できる(Gribnau, 1992)。この割合から試料中の固形分の割合（約 9.4%）を差し引いた割合を、形成されたキセノン水和物の割合として算出した。

$$\text{Solid Content}(\%) = \frac{S - L}{S} \times 100 \quad (3-4)$$

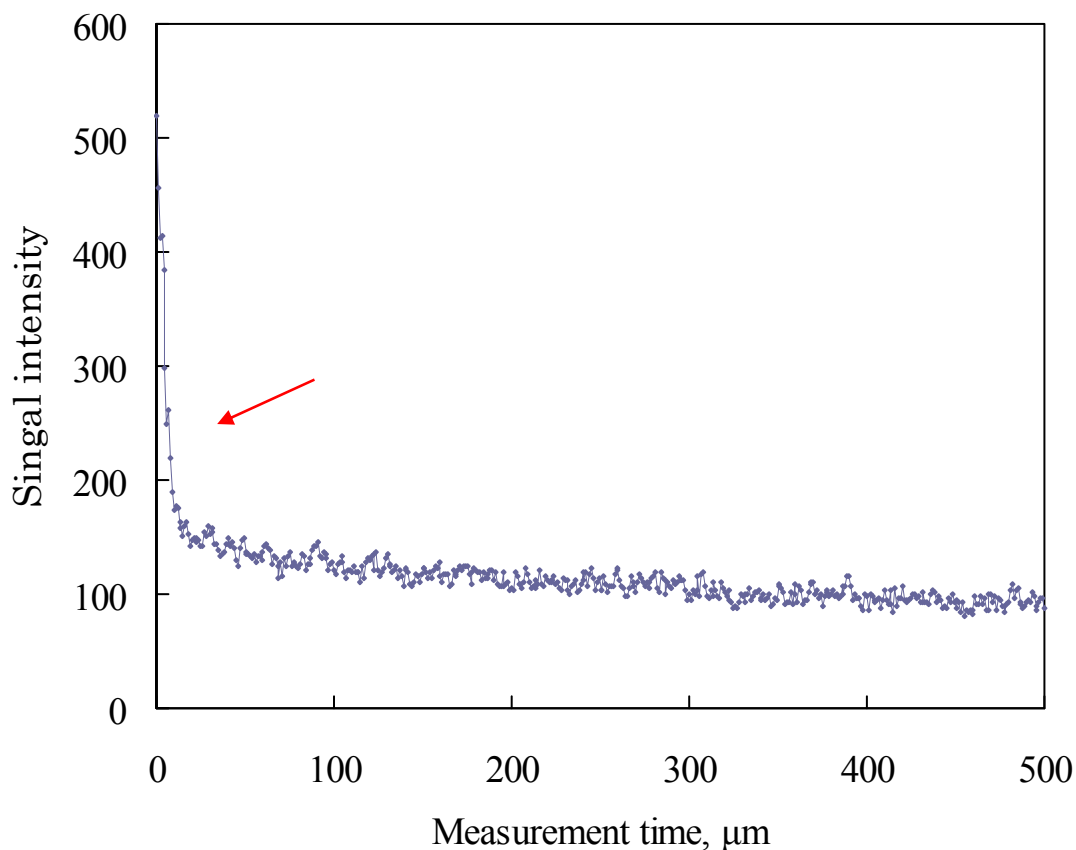


Fig. 3-7 NMR signal intensity in barley coleoptile tissue with time after Xe pressurization for 9 h.

Fig. 3-8 に 1°C 、 1.0 MPa でのキセノン処理時間の経過に伴う、子葉鞘組織におけるキセノン水和物の形成割合の変化を示す. 保存 30 min 後の試料では約 10% のキセノン水和物が形成していた. 1 h 後の試料では約 20% のキセノン水和物が形成していた. 保存 3 h 後の試料では約 30% のキセノン水和物が形成していた. そして、保存 5 h 後の試料には 40% のキセノン水和物が形成されていることが示された. この形成割合はキセノンガス処理時間の増加に伴い増加し、保存 12 h には約 70% となることが示された.

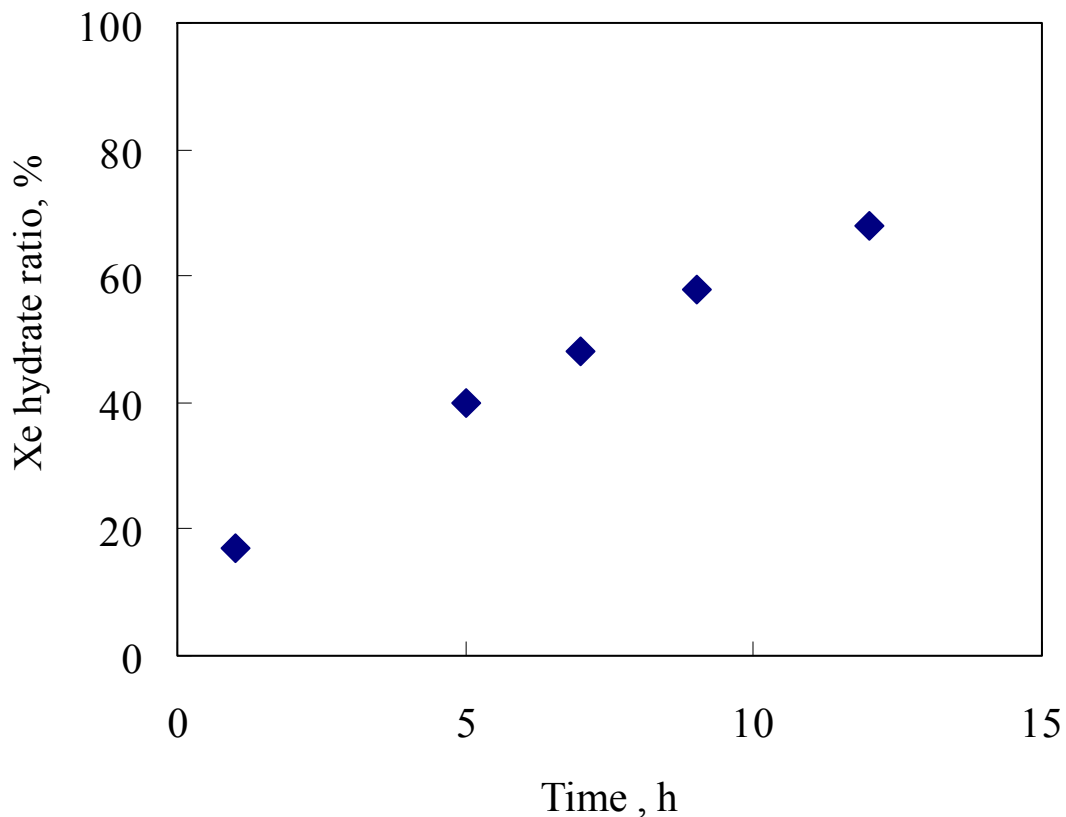


Fig. 3-8 Xe hydrate ratio of barley coleoptile tissue at each treatment time.

Fig. 3-9 に、生鮮試料と水和物形成後に解離させた試料の拡散係数を示す。生鮮組織では、 Δ の経過とともに拡散係数が減少する制限拡散現象が観察された。この現象は、7 h 保存された試料(50%のキセノン水和物が形成された組織)でも同様に観察された。しかしその後、60%以上のキセノン水和物が形成されると、制限拡散が徐々に弱まり、特に、保存 12 h (70%のキセノン水和物が形成された組織)では、ほとんど観察されなくなることが確認された。これはキセノン水和物自体の体積膨張(氷結晶の約 1.2 倍)によるものと考えられた。また、50%のキセノン水和物が形成された組織と 60%のキセノン水和物が形成された組織の拡散係数の測定結果に明瞭な差が見られたことから、キセノン水和物の部分的な形成を利用した凍結プロセスの制御を検討するには、キセノン水和物の割合が 60%を超えないように制御する必要があると考えられる。

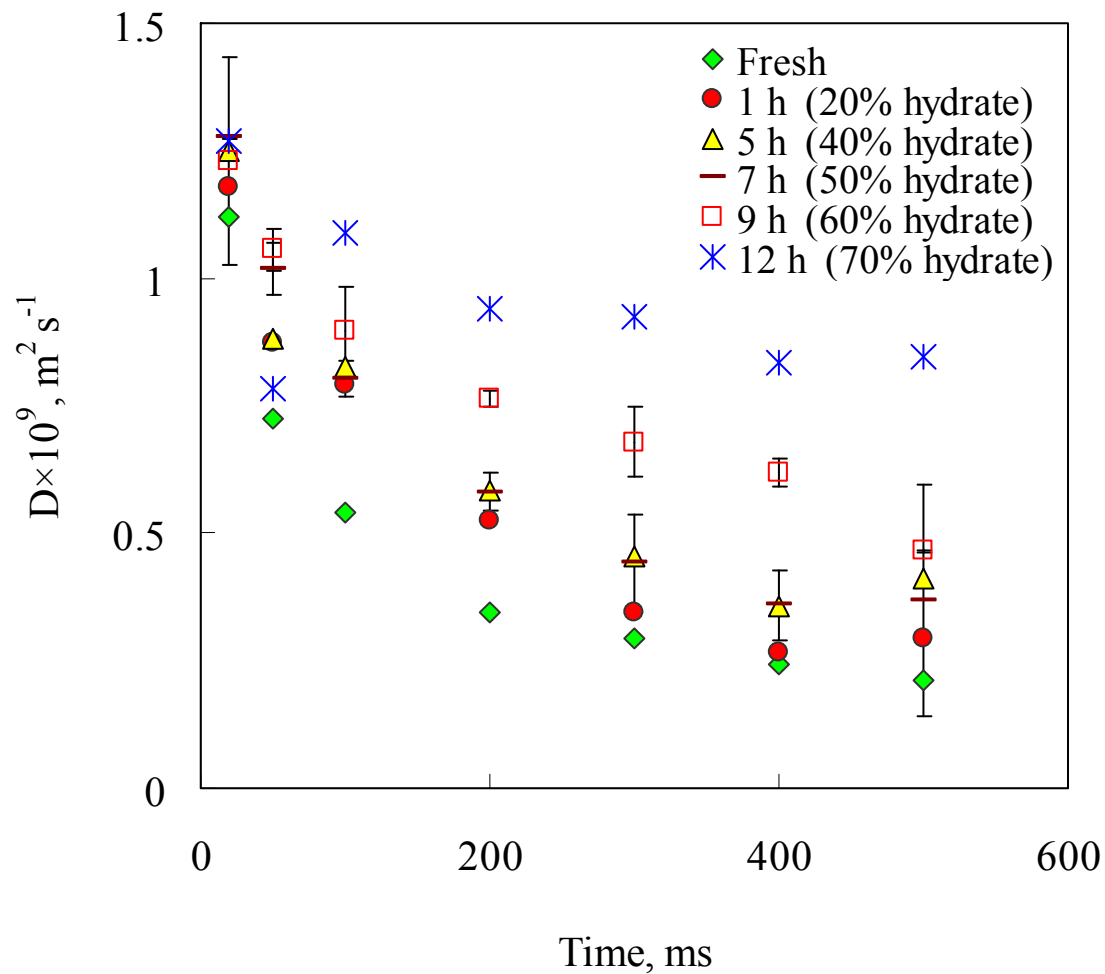


Fig. 3-9 Self-diffusion coefficient (D) of water in barley coleoptile cell at each treatment time.

Fig. 3-10 に生鮮試料と水和物形成後に解離させた試料の細胞膜水透過係数の計算結果を示す。生鮮試料の P_{ef} は $4.8 \times 10^{-6} \text{ m s}^{-1}$ であり、キセノン処理については、保存時間の経過に伴い当該係数が増加していることが示された。保存 12 h、すなわち 70% のキセノン水和物が形成された組織において、 P_{ef} は $6.7 \times 10^{-5} \text{ m s}^{-1}$ となり、細胞膜の水透過性は増大し、生鮮組織との間には明らかな差がみられた。

なお、 P_{ef} の測定結果では、50% のキセノン水和物が形成された組織と 60% のキセノ

ン水和物が形成された組織の間で、明らかな差がみられなかった。本研究において水透過係数の計算には、NMR装置の性能により最大500 msまでの観測時間で得られた実測値を D_0 しか用いられなかった。これによって計算された水透過係数には誤差が存在する可能性がある。一方、各観測時間で得られた拡散係数は実測値であり、50%と60%のキセノン水和物が形成された組織における拡散係数の傾向には、明らかに差が認められた。

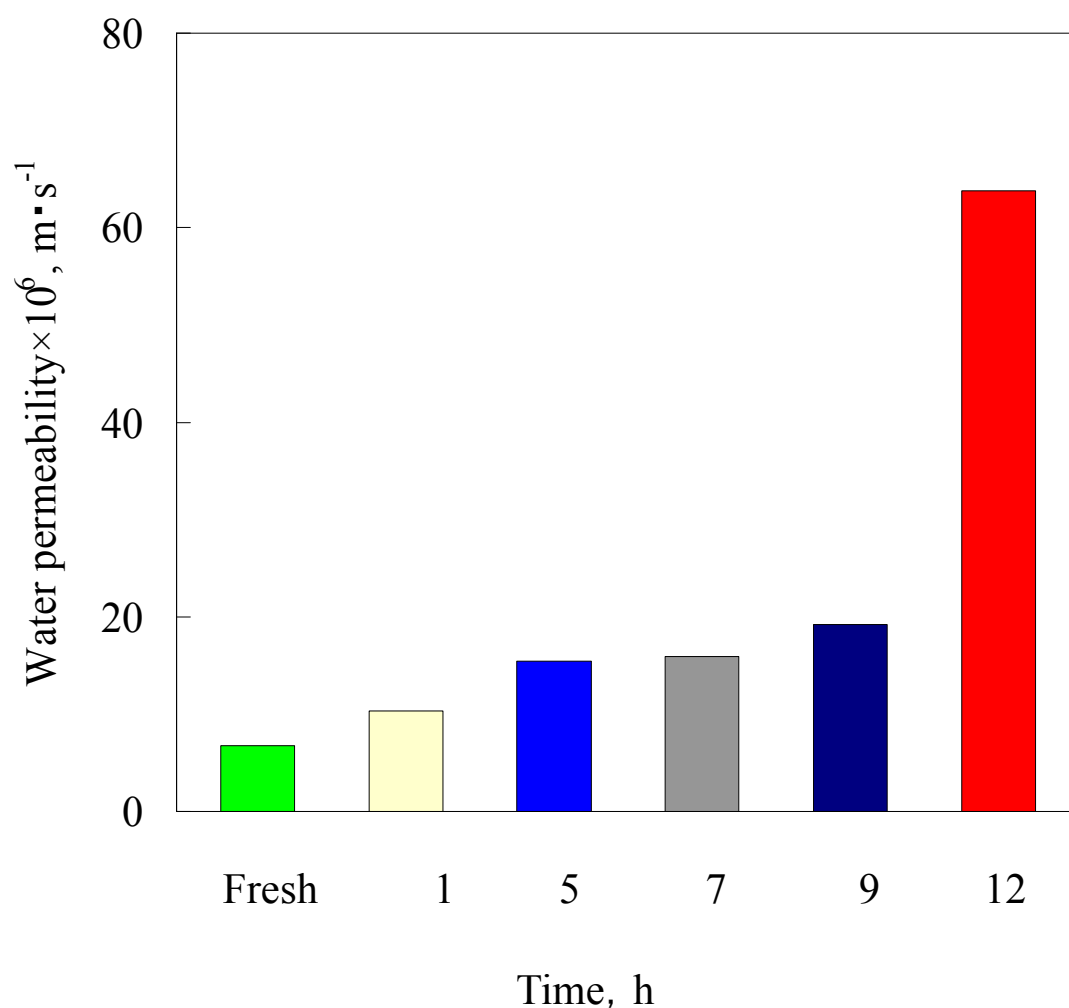


Fig. 3-10 Water permeability of cell membrane in barley coleoptile tissue at each treatment time.

以上の結果と制限拡散の観測結果から、制限拡散は細胞膜の水透過性に関係すると考えられた。また、キセノン処理時間の経過に伴い、組織の表面のみならず、組織内部でもキセノン水和物の形成割合が増大し、細胞膜に損傷を与えることで、細胞膜の水透過性に関する機能の低下が推察された。ただし、NMRで細胞内外のキセノン水和物を区別することが困難であるため、キセノン水和物の形成割合は細胞内外のトータルの水和物の割合であると考えられる。

これらの結果から以下のことが推測される。

(1)まず細胞外に水和物が形成され、時間経過とともに、細胞内から外へ水が浸透圧の差によって細胞外に引き寄せられる。水和物の塊が大きく成長するとともに隣り合う水和物同士の合着も考えられる。一方、細胞内にも一部に水和物の塊が形成される領域がある。従って、細胞内外のトータルの水和物割合が増大すると、細胞膜に損傷を与える可能性があり、細胞膜の水透過性に関する機能が低下すると推測した。

(2)組織にキセノンを溶解させると、ガス分子は組織内を拡散し、溶解度の高い細胞膜に多量に溶解を始める。その後、この細胞膜に溶けたガス分子から細胞内の水へ溶解を始めるとともに、組織内の水は構造化を始める。ガス濃度の勾配に従って、溶存しているキセノンガスの濃度は比較的不均一で、細胞内外にキセノン水和物は分散的に形成される。細胞膜と細胞内溶液界面付近に水和物が形成されるため(安藤, 2010)、時間の経過に伴い水和物量が増加していることから、細胞膜損傷が生じる可能性があるとして推測した。

いずれにしても、実験の結果から、細胞内外のトータルの水和物割合が50%以下の場合には、細胞膜の損傷がほとんど観察されなかった。しかし、70%以上形成されると、水和物自体の体積膨張によって細胞膜に損傷を与えている可能性が示された。そのため、今後は様々な温度・圧力条件を用いて、細胞への損傷を伴わない保存条件を検討する必

要がある。

また、キセノン水和物の部分的な形成を利用した凍結プロセスの制御の検討にあたって、形成された水和物の周囲では氷結晶に変化する水の量が減り、限られた空間内において氷結晶が大きく成長することが抑制できることが期待される。また、氷結晶の形成・成長を考慮すると、キセノン水和物の形成割合が 60%を超えないように制御する必要があると考えられた。

3.5 結言

1°C, 1.0 MPa での処理時間に伴うキセノン水和物の形成割合の変化について検討した。その結果、キセノンガスで処理 1 h では約 20%, 5 h では 40%, 9 h では約 60%, 12 h では約 70%のキセノン水和物が形成された。従って、一定の温度圧力条件でキセノンガスの処理時間を調整することにより、キセノン水和物の形成割合の制御が可能であることが示唆された。

その後、それぞれ 20°Cで解離させた試料の拡散係数を検討した結果、生鮮組織では、拡散観測時間 Δ の増加と共に拡散係数が減少する制限拡散現象が観察された。この制限拡散は水和物の形成割合の増大に伴って弱まり、70%の水和物が形成された試料では自由拡散に近く、細胞膜機能の損傷が推察された。これらの結果から、キセノンガス処理時間の調整により、キセノン水和物の形成割合を 60%以下に制御することで細胞膜の損傷が抑制できると考えられた。

以上より、本研究でキセノン水和物の部分的な形成さによる氷結晶の形成制御保存法を検討するにあたって、細胞膜機能低下を抑制するために、キセノン水和物の形成割合を 60%以下に制御することが必要であると考えられる。

第 4 章 キセノン水和物の部分的な形成を利用した

凍結プロセスの制御

4.1 緒言

先の章において述べたように、キセノン水和物の形成割合変化による細胞膜損傷程度の変化を検討した結果より、水和物が 60%以上形成されると、水和物自体の体積膨張による細胞膜の損傷が生じ、細胞膜の水透過性に関する機能が低下したことが推察された。このため、水和物の部分的な形成を利用した保存には、キセノン水和物の形成割合が 60%を超えないように制御する必要があると考えられる。

そこで、本章では、キセノン水和物の形成割合を制御した上で凍結させ、細胞膜の損傷が抑制できるか否かを検討することを目的とした。具体的には、キセノン水和物の形成割合を、60%を超えないように制御した上 5 日間、さらに長期間の 20 日間凍結させることで、細胞内水の拡散係数および水透過係数の測定により細胞膜の水透過性に関する機能を評価した。また、X 線イメージングを用いた、組織におけるキセノン水和物の形成観察を行った。

4.2 キセノン水和物の部分的な形成を利用した長期保存法

4.2.1 供試材料

播種から 9～11 日後のオオムギ（コビンカタギ）子葉鞘を採取し，単層処理を行った組織片 8 枚（0.05～0.08 g）を，NMR 用耐圧試料管に入れ，この試料管 2 本を 1 組の生鮮組織試料とした．ただし，子葉鞘の水分含量は常圧加熱乾燥法により測定し，90.6%（w.b.）であり，第 3 章で使用した試料と同様であった．

ここで，正確な水和物の割合を測定するために，子葉鞘表面の水分をキムワイプで軽く拭き取った後，実験に供した．

4.2.2 実験方法

1.0 MPa, 1°C で保持する時間の調整により，キセノン水和物形成割合を 10%，20%，30%，40%，50%，60% に制御し，その後 -20°C の冷凍庫に入れ (-0.006 K s^{-1}) 5 日間保存した．その後，キセノンガスの圧力を 0 MPa になるまで $0.033\text{ MPa min}^{-1}$ の速度で減圧し， 20°C で解離・解凍した試料の拡散係数を測定して制限拡散の有無から細胞膜機能を評価した．5 日間の保存期間を設定した理由は，5 日で氷結晶と水和物のトータルの割合が位一定（約 90%）に達し，これ以上変化しないためである．更に保存 20 日間についても検討した．その際，凍結後 5 日に -20°C でキセノンガス圧力を減圧した．20 日間凍結保存の途中で放出することで，5 日間の凍結保存と比較することを可能にした．

処理時間の調整による水和物形成割合の制御

生鮮組織試料を 4 組用意し，キセノンガスを分圧が 1.0 MPa になるまで封入し， 1°C

でキセノンガスで処理したそれぞれ 1 組の試料について、第 3 章で示した Solid echo 法により試料内の水の T_2 を測定し、NMR シグナル強度の観察することによってキセノン水和物の形成割合を評価した。1.0 MPa, 1°C で保持する時間の調整により、処理 30 min におけるキセノン水和物の形成割合を 10% に、処理 1 h におけるキセノン水和物の形成割合を 20% に、処理 3 h 後キセノン水和物の形成割合を 30% に、処理 5 h 後キセノン水和物の形成割合を 40% に、処理 7 h 後キセノン水和物の形成割合を 50% に、処理 9 h 後キセノン水和物の形成割合を 60% に調整した。ただし、測定は 1°C で行った。

細胞内水の拡散係数および水透過係数の測定

横緩和時間 T_2 の測定に用いた 8 組の試料を、それぞれの保存時間後に 20°C で解離させ、これと 20°C 大気下で密封した 2 組の生鮮試料について、Stimulate echo 法による拡散係数の測定を行った。 Δ は 20~500 ms の範囲とし、 G を 21.1~49.5 Gauss cm⁻¹ として、20°C で測定を行った。

得られた拡散係数と拡散観測時間をプロットすることで制限拡散現象を観察し、式 3-3 より水透過係数 P_{ef} の算出を行った。

4.2.3 結果および考察

Fig. 4-1 にキセノン水和物と氷結晶の併用保存前後の試料の拡散係数を示す。生鮮組織では、 Δ の増加と共に拡散係数が減少する制限拡散現象が観察された。この制限拡散現象は、30~50% のキセノン水和物を形成させた後に、-20°C 凍結・解凍した試料でも同様に観察された。しかし、10%、20% のキセノン水和物を形成させた後に、-20°C 凍結・解凍した試料および単に -20°C 凍結・解凍した試料では、制限拡散は弱まっていることが確認された。この結果は第 3 章のキセノン水和物のみの検討結果と異なった。

この要因としては、以下のように推測された。

(1)20%以下のキセノン水和物が形成された組織では、細胞外から水和物が形成され、細胞内まで水和物の形成が至らず、 -20°C まで下げることによって、既に形成された水和物の周辺領域の水は構造化程度が弱く、容易に氷結晶へ変化し、細胞は脱水かつ押しつぶされ、物理的障害が引き起こされた。

(2)細胞内でも溶存しているキセノンガスの濃度分布があり、細胞内に形成された水和物があっても、その周囲の水はある程度構造化した状態が維持されていたと考える。従って、30%~50%の水和物が形成された組織では、水和物が分散的に形成し、試料温度を -20°C まで下げても、その領域に細胞を壊さない程度の氷結晶が形成された。

(3) 60%のキセノン水和物を形成させた試料においては、試料温度を -20°C まで下げることによって、水和物の自体の体積膨張（膨張率は氷結晶の約1.2倍）による細胞膜の損傷が生じた。また、単に -20°C で凍結させた試料においては、氷結晶が大きく成長したことで細胞膜の損傷が生じた。

従って、30~50%の水和物を形成させた後 -20°C で凍結させた組織では、単に -20°C で凍結させた場合よりも細胞膜の損傷が抑制されたと考えられた。これは、水中に水和物が形成される場合、周囲の水中のキセノンガスが水和物に引き寄せられるため、構造化していた水が自由水に近くなるが、細胞内の水はタンパク質、核酸、脂質、糖質などの生体高分子で構成される複雑な構造に取り込まれたコロイド系であるため、通常の水の場合と比較して、血液や生体タンパク質などの生体成分に対して溶解度の高いキセノンは、これらの物質を介して組織内部にまで溶解・浸透可能であると考えられる (Cherubini and Bifone, 2003)。また、キセノンが脂質膜に溶け込む量が多いということも考えられるため、キセノン周囲の水中のキセノンガスが水和物に引き寄せられる速度が遅くなり、水和物周囲は構造化していた水が残る可能性が高いと推察した。このた

め、キセノン水和物の形成が一定の量に達すれば、残りの周囲の水の構造化が比較的不均一に進むと考えられる。従って -20°C まで下げた場合、氷核が分散的に形成され、細胞を壊さない程度の氷結晶が形成しやすいと推察された。これらにより、5日間という比較的短い凍結保存時間においては、細胞膜の損傷抑制には、水和物の部分的な形成の利用が効果的であることが明らかになった。

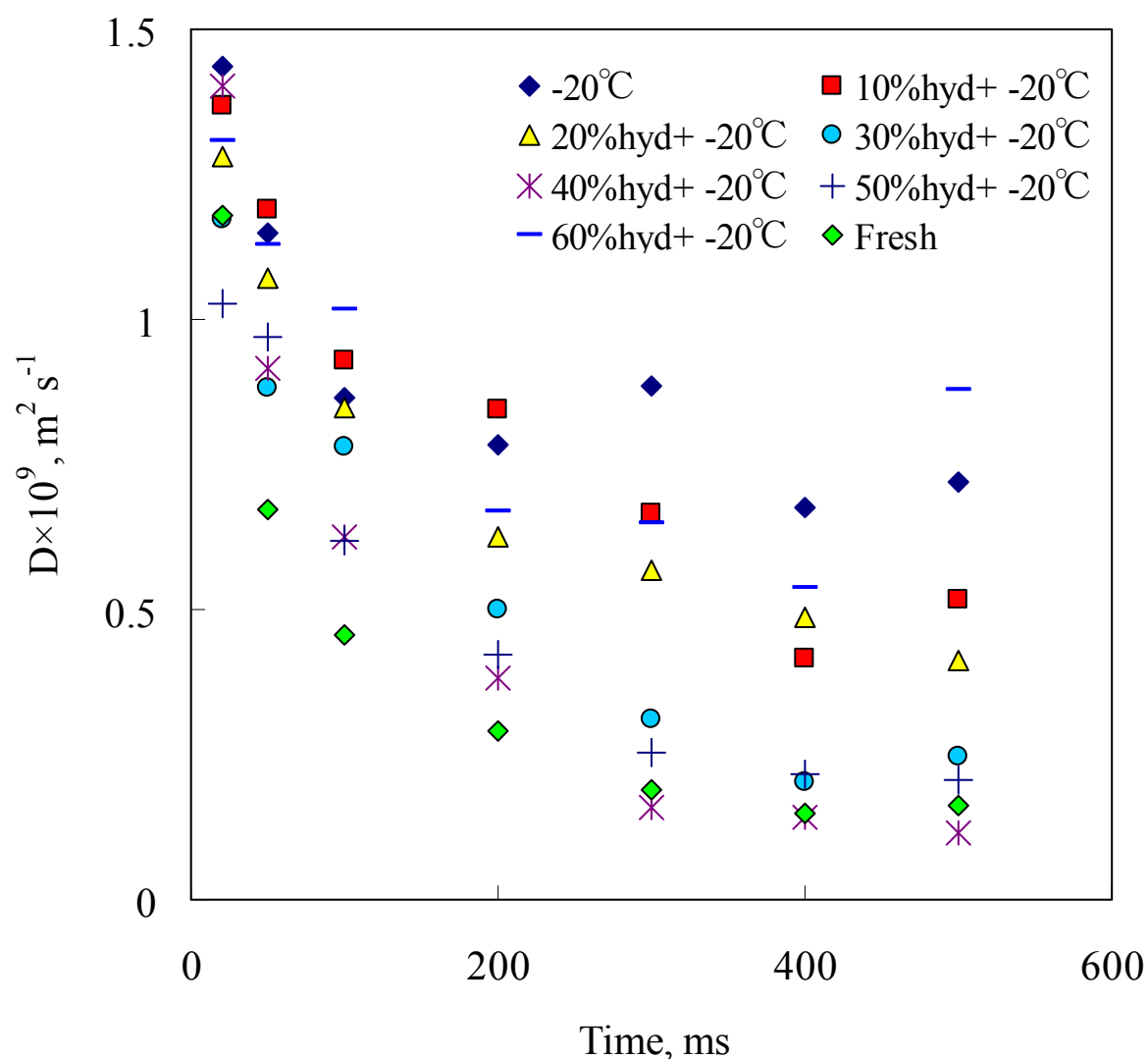


Fig. 4-1 Self-diffusion coefficient (D) of water in barley coleoptile which was fresh or frozen at -20°C for 5 days and frozen for 5 days at -20°C after Xe hydrate formation.

Fig. 4-2 に生鮮試料，凍結・解凍させた試料および水和物形成後に凍結・解凍させた試料の細胞内水の水透過係数の計算結果を示す．生鮮組織の P_{ef} は $4.8 \times 10^{-6} \text{ m s}^{-1}$ が得られたが，これに対して，20%以下のキセノン水和物を形成させて凍結・解凍した組織の水透過性に関する機能は低下し，生鮮組織と比較して，約4倍も水透過性が増大した．60%のキセノン水和物を形成させて凍結・解凍した組織の P_{ef} は $6.7 \times 10^{-5} \text{ m s}^{-1}$ となり， -20°C で凍結・解凍した組織の水透過係数とほぼ同じであり，生鮮組織と比較して，約13倍も水透過性が増大した．

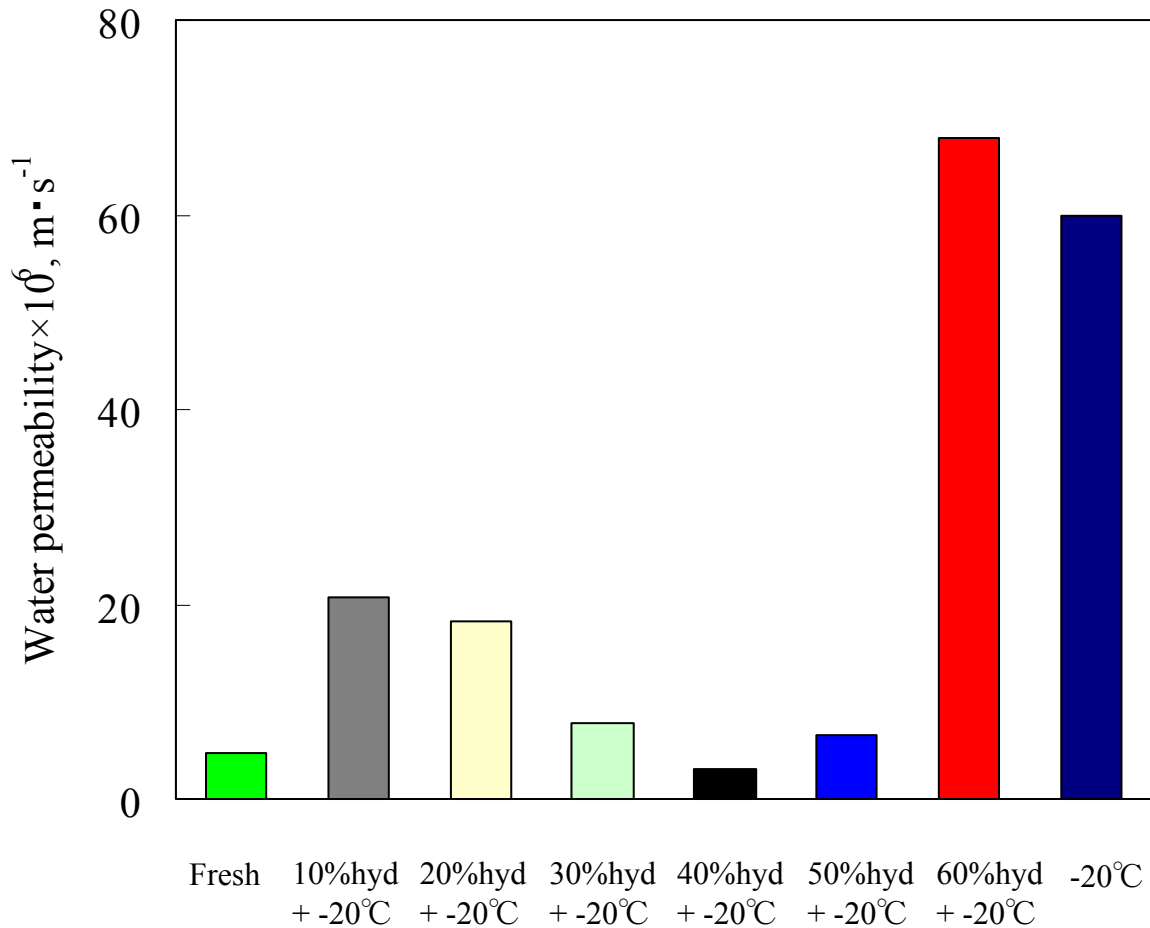


Fig. 4-2 Water permeability of cell membrane in barley coleoptile tissue which was fresh or frozen at -20°C for 5 days and frozen for 5 days at -20°C after Xe hydrate formation.

以上のように、キセノン水和物の形成割合を調整した上、5日間での凍結保存を検討した結果、30%~50%の水和物形成は、細胞膜の損傷抑制に効果的であることが示された。この検討から、保存に適切と考えられたキセノン水和物形成割合である30%、40%、50%に制御し、20日間凍結した試料の拡散係数の測定結果をFig. 4-3に示した。その結果、水和物が30%~50%の組織では、生鮮試料と同様の制限拡散現象が観察され、細胞膜の水透過性に関する機能がほぼ保持された。従って、長期間の凍結保存においても、キセノン水和物が30%~50%の組織では、Fig. 4-4に示した細胞膜の水透過係数の測定結果からも、細胞膜損傷の抑制に効果的であることが示された。ここで、5日間および20日間凍結させた試料における氷と水和物のトータルの割合をNMRにより測定した結果、ほぼ同様であった。20日間の保存では、5日目に-20℃でのキセノンガスの圧力を減圧したが、この温度下でキセノン水和物は解離していない可能性もあり、結果的には5日間の凍結保存と変わらない可能性も推測される。また、-20℃でキセノンガスの圧力を減圧したが、この温度下では水和物は解離していない可能性があり、その後20℃まで昇温して解凍させた際に、キセノンガスが一気に放出され、細胞膜にダメージを与えた可能性も考えられたため、今後は、低温(-20℃)で減圧せず、20℃まで昇温させて氷を溶かした後、水和物をゆっくり解離させると、細胞膜への損傷が一層抑制される可能性がある。

これらの結果を踏まえて、通常の凍結保存と違い、本凍結保存法においてキセノン水和物はどのような働きをしているかについて、50%の水和物が形成された組織を用いて検討し、以下の3つの仮説を考えた。

(1)組織内の水の50%が結晶化し、キセノン水和物が形成されると、周囲の水中のキセノンガスが水和物に引き寄せられるため、構造化していた水が自由水に近くなる。しかし、凍結温度まで下げ、凍らない水を除いて、残された自由水の量を考えると、氷結

晶が形成されても、細胞を破壊しない程度の自由水の量である。

(2)溶存しているガス濃度局所的に異なるため 50%のキセノン水和物が組織内で分散的に形成されると、凍結により、水和物の隙間という限られた空間内に、細胞を破壊しない程度の小さいサイズの氷結晶が形成される。

(3)組織内で 50%のキセノン水和物が分散的に形成され、水和物の周囲の水はある程度構造化した状態が維持され、凍結することで、この構造化した水に氷核が生成しにくく、残された自由水領域に形成された氷結晶のサイズが制限され、小さくなる。

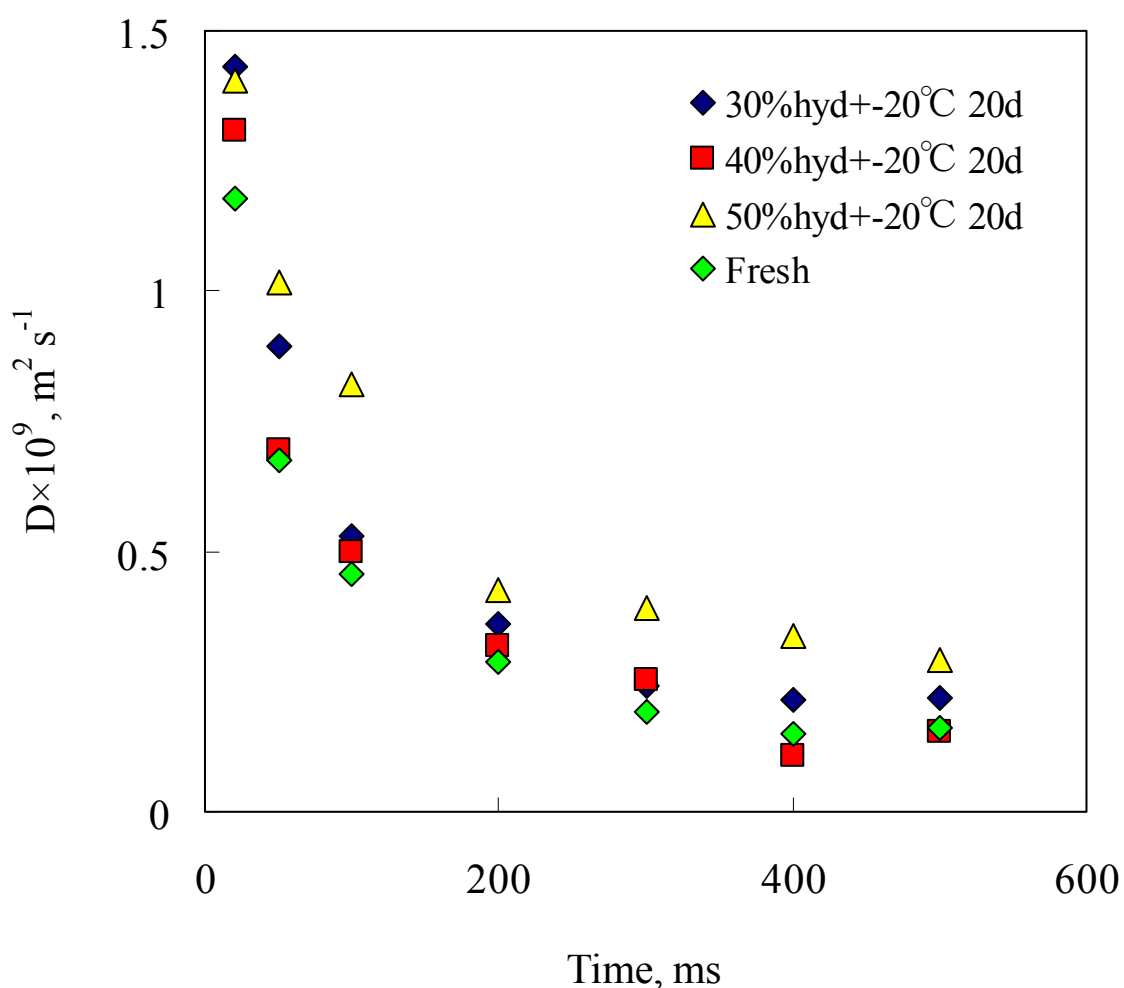


Fig. 4-3 Self-diffusion coefficient (D) of water in barley coleoptile cells which was fresh and frozen for 20 days at -20°C after Xe hydrate formation.

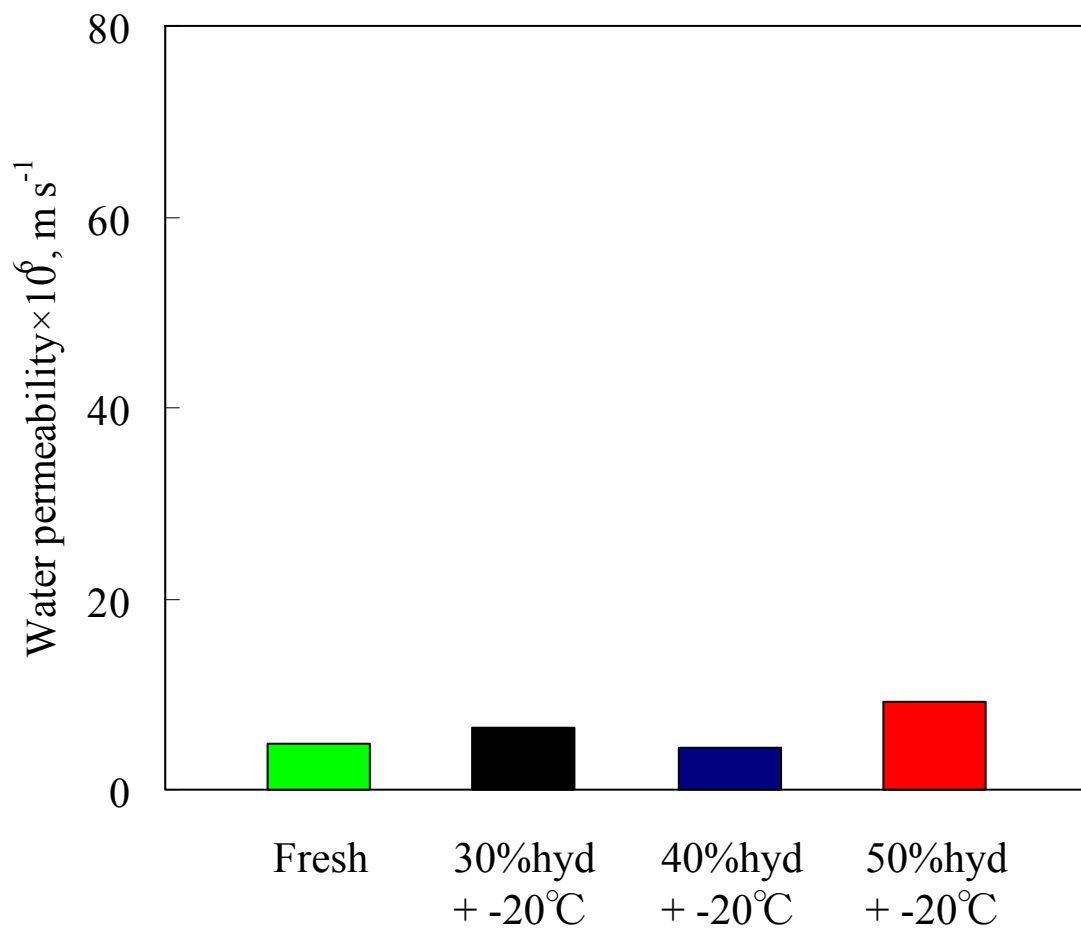


Fig. 4-4 Water permeability of cell membrane in barley coleoptile tissue before and after frozen for 20 days at -20°C after Xe hydrate formation.

4.3 X線イメージングを用いたキセノン水和物の形成確認

4.3.1 供試材料

試料には、播種から 9~11 日後のオオムギ（コビンカタギ）子葉鞘を用い、組織片 1 個を NMR 用耐圧（1.0 MPa）試料管に入れ、生鮮組織試料とした。子葉鞘細胞の大きさは長軸約 100 μm 、短軸約 40 μm で、子葉鞘の大きさは幅約 3 mm、長さ約 7~8 mm であった。

第 3 章と同じく圧力付加ユニットを通して、温度 1°C、ガス分圧 1.0 MPa でキセノンガスを試料管内に封入・密閉した。キセノンガスで 1 h 処理し、キセノン水和物の形成割合を 20%に調整した。ただし水和物の形成割合は細胞内外のトータルの割合である。次に、-20°Cまで下げ 7 日間凍結保存した。その後、組織を素早く取り出して液体窒素温度で保存し、X線イメージング法の測定に供試した。

4.3.2 実験方法

X線吸収法による測定

X線吸収分光法 (XAS) は、物質の電子状態や局所構造を求めるために使われている手法である。測定対象となる物質は、気体、固体、液体、溶液などと幅広い。X線吸収の測定は、結晶分光器や回折格子分光器によって物質に照射するX線のエネルギーを変化させながら吸収係数を測定することで行われる。透過率が高いエネルギー領域のX線、あるいは試料を薄膜などのように薄くすることが可能な場合、あるいは試料が気体である場合には、可視光領域の吸収測定とおなじ物質を透過させることによる光の減衰を直接観測する透過法による測定がおこなわれる。

今回の測定では、35 keVの単色光を照射する垂直ウィグラービームラインでのシン

クロトロンX線源 (BL-14C) を使用し、画像の空間分解能は、およそ50 μm である。照射時間は2 sとし、測定温度は -80°C とした。ただし、氷と氷中のキセノン水和物結晶を観察するため、試料表面 (固・気界面) での密度差による散乱を防ぐ目的で、試料を酢酸メチル (密度 $0.9 \sim 1.0 \text{ g cm}^{-3}$) 中に浸漬して測定した。また、観察領域は25 mm \times 35 mmであった(Yoneyama *et al.*, 2004 ; Yoneyama *et al.*, 2008)。

位相差 X 線法による測定

X 線が透過率の高い物質 (酸素, 窒素, 水素等の軽元素で構成される物質) を通過した場合、強度はほとんど変化しないが、位相は大きくシフト (屈折) する。このシフトを強度に変換して検出すれば、軽元素で構成される物質に関しても、高感度な観察を可能となる。位相コントラスト X 線イメージング手法の一種である屈折コントラスト (DEI) 法を用い、氷中にエアハイドレートと気泡が共存する状態での X 線イメージングによる氷中のエアハイドレートを非破壊三次元可視化した報告がある (竹谷, 2011)。このDEI法は、位相コントラスト法の一種で、密度分解能は低めながら、密度のダイナミックレンジが広いのが特徴である。

今回の実験においては、位相シフトを検出する方法として、試料を透過した X 線を、アナライザー結晶とよばれる単結晶の回折により、位相シフトの空間微分である試料の屈折角度分布を測定する DEI 法を用いた。Fig. 4-5 に今回の測定で用いた DEI 法の光学系を示す (Takeya *et al.*, 2011)。図に示すように、DEI の測定において、入射単色(35 keV) X線源は非対称の Si (220)結晶と横方向にクライオセルに入れたサンプルを照射する。サンプルを通過した X線源は Si (220)アナライザー結晶によって回折し、画像として測定された。Fig. 4-6 に今回の測定で用いた DEI 法 X線イメージングシステム (Yoneyama *et al.*, 2004)のクライオチャンバー (Takeya *et al.*, 2010 ; Takeya *et*

al., 2011) の概略を示す. クライオチャンバーは断熱層, 液体容器, 冷却装置, 温調ユニットから構成されており, 液体窒素の供給により, 数時間~数日に渡ってサンプルを液体 (酢酸メチル) に浸けた状態で ± 1 K の精度で温度 (温度範囲: $-85 \sim +100^{\circ}\text{C}$) を保つことができる. ここで, 今回の測定において, 画像の空間分解能は, およそ $50 \mu\text{m}$ である. 測定温度を -80°C (酢酸メチル中) に保った. 照射時間は 2 s であった. 観察領域は $25 \text{ mm} \times 35 \text{ mm}$ である (Yoneyama *et al.*, 2004).

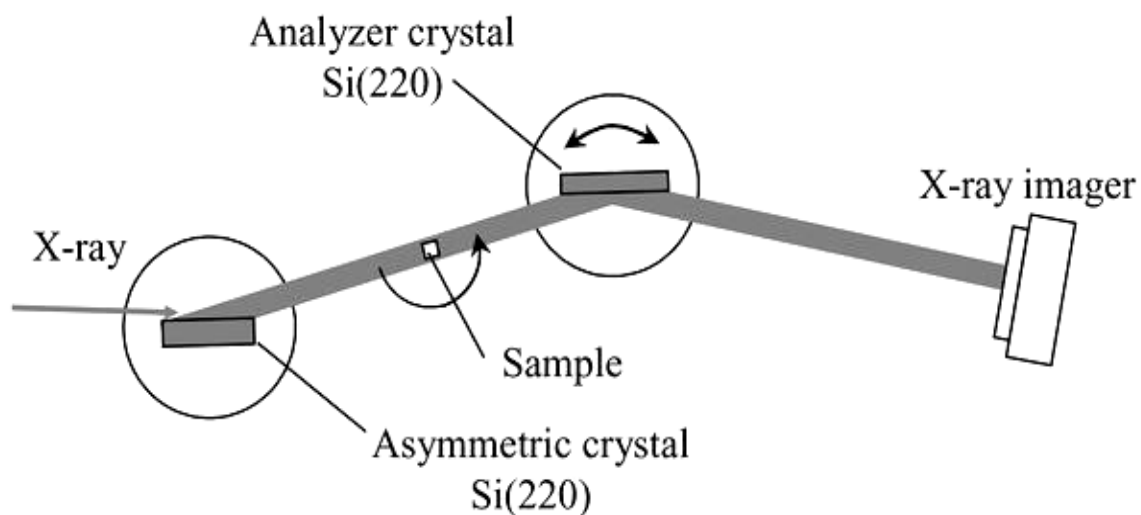


Fig. 4-5 Schematic diagram of the experimental setup for phase contrast X-ray-imaging. Top view of the setup of DEI. Incident X-rays were enlarged horizontally by an asymmetric Si(220) crystal (Taketa *et al.*,2011) .

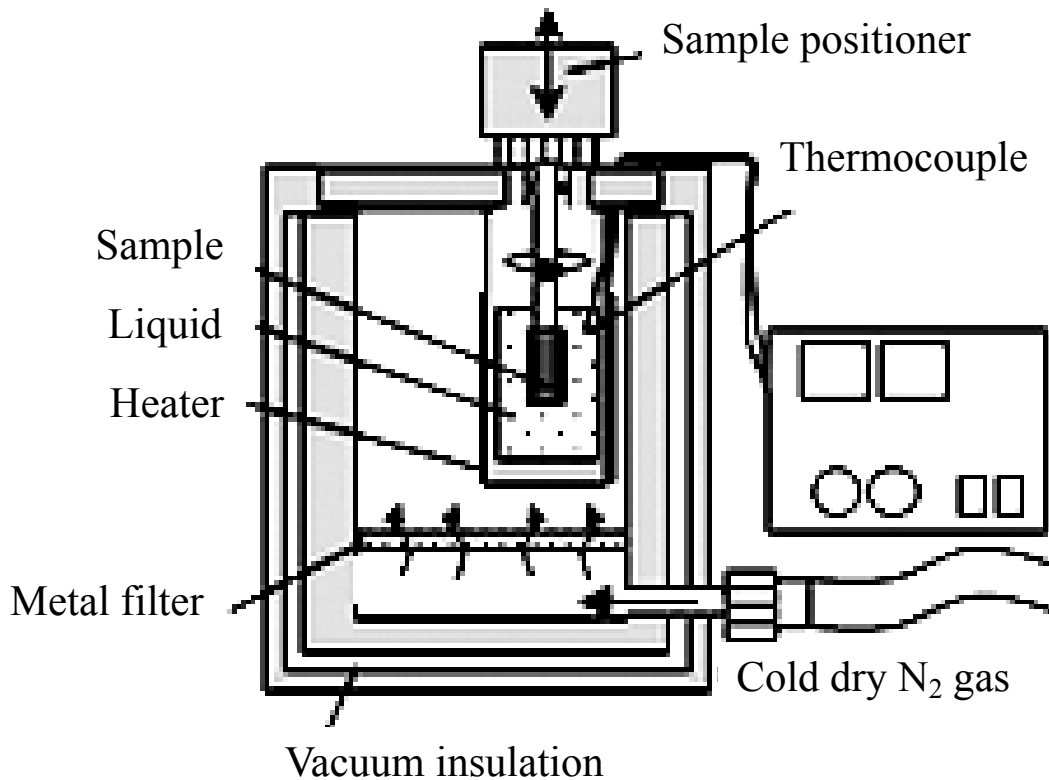


Fig. 4-6 Schematic diagram of the sample chamber parallel to the direction of X-ray radiation (Taketa *et al.*,2011) .

4. 3. 3 結果および考察

Fig. 4-7 に 20%キセノン水和物を形成し、 -20°C 凍結保存 7 日間後の子葉鞘組織の X 線吸収法(XAS, a)と位相差 X 線法(DEI, b)測定において、子葉鞘の正面から 45°C に回転した状態で撮影された画像を示す。ここでは、白い部分は氷結晶、黒い部分は水和物を示す。XAS, DEI とともに、組織周囲と内部にキセノン水和物が形成されたことが観察された。

XAS 画像では、組織の輪郭が強調されたイメージとなっていた。試料の右端に見える黒い塊で示されているキセノン水和物について、細胞中にあると考えれば少し大きい

ため、細胞外にある水和物の塊であると推定した。これは細胞外にある隣り合う水和物塊同士が接合することで大きく成長していたものと考えられた。一方、試料の左側の子葉鞘細胞付近に分散している細かい黒い点は、細胞内に生成されたキセノン水和物であると推定した。これは組織内の細胞コンパートメントという制限空間に小さい水和物が分散的に形成され、 -20°C まで温度を下げても、水和物同士が接合することなく、水和物の成長が抑制された可能性があると考えられた。しかし、細かい黒い点にある箇所の大きさと生鮮組織の顕微鏡画像(Fig. 4-8)で確認された細胞のサイズを比較した結果、細胞境界である可能性が高いと考えられた。

DEI 画像では、組織の輪郭が強調されたため、キセノン水和物のように X 線の吸収が大きいものでは、逆に組織内部が見にくくなってしまうことが確認された。試料の右端に見える黒い塊は組織表面に形成された水和物が大きく成長したものであることが確認された。Fig. 4-8 に示した生鮮組織の顕微鏡観察の画像と比較し、細かい黒い点の大きさや並び方から、子葉鞘細胞の大きさや並び方に近く見え、細胞内外に形成されたキセノン水和物である能性が高いと考えられた。また、導管にキセノン水和物が形成されていないことについては、導管は他の細胞に比べて厚いので、キセノンガスの浸透に時間がかかったと推察した。

従って、温度 1°C 、分圧が 1.0 MPa の圧力でキセノン溶解させることで、細胞内外にキセノン水和物が形成され、このキセノン水和物は凍結保存 7 日後に組織の表面で大きく成長することが確認された。

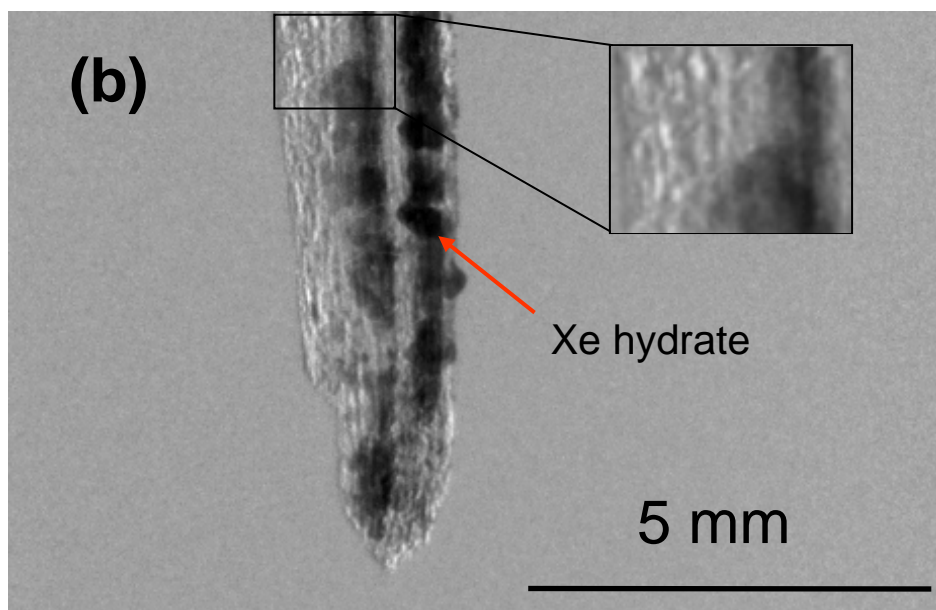
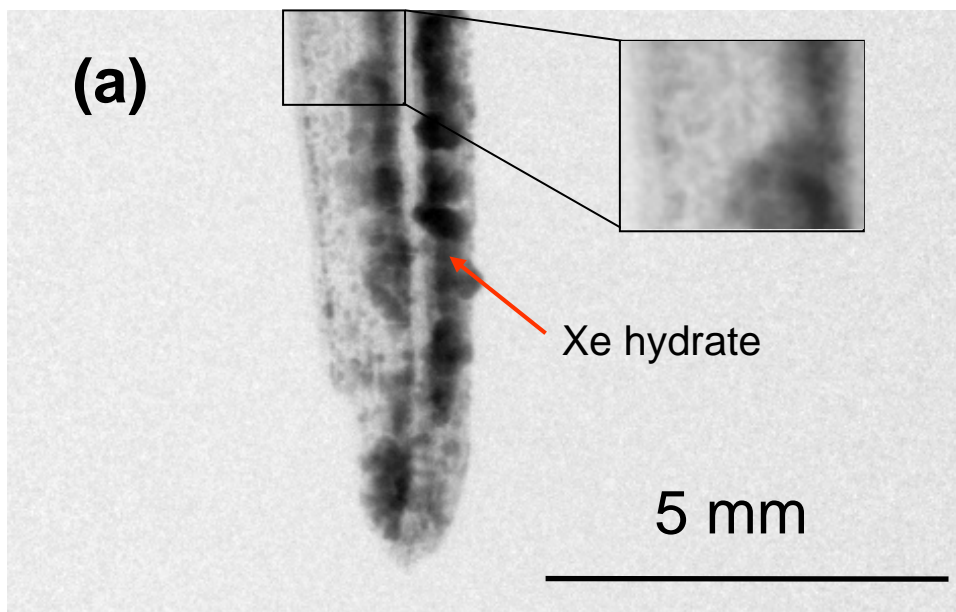


Fig. 4-7 XAS (a) and DEI (b) images of barley coleoptile frozen for 7 days at -20°C after Xe hydrate formation.

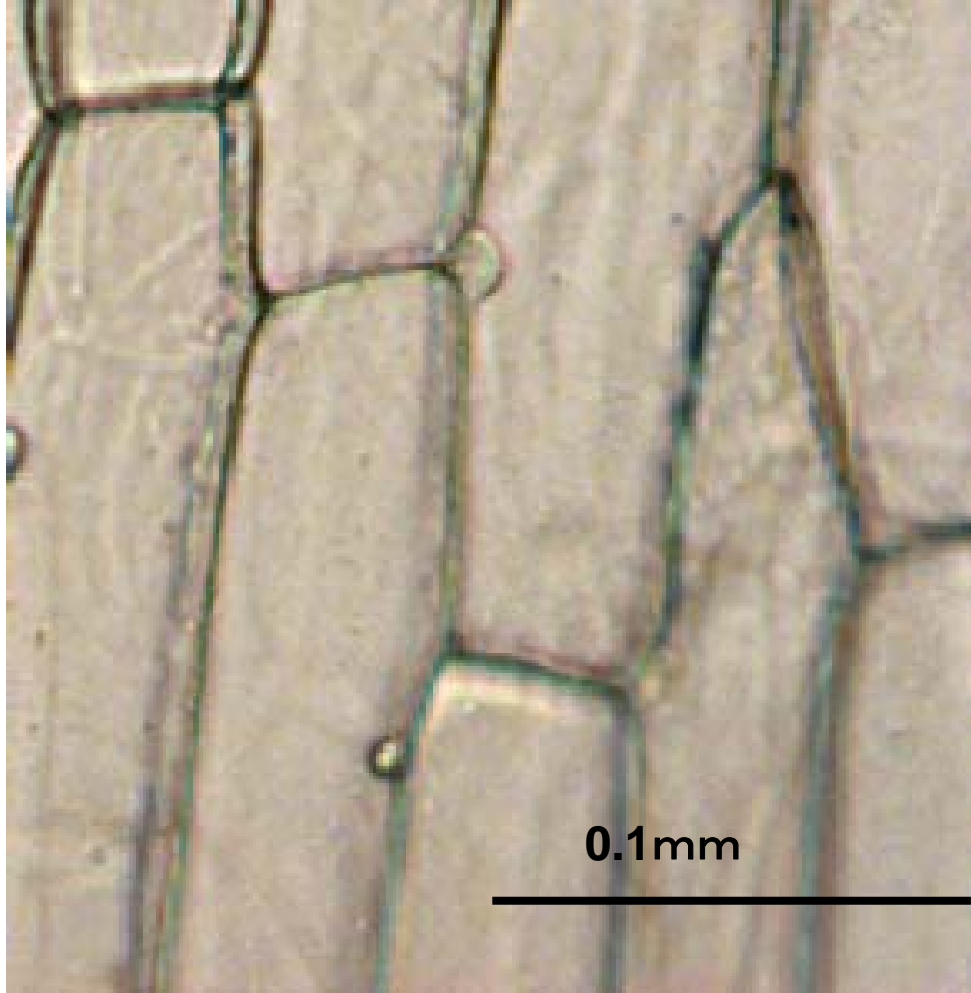


Fig. 4-8 Microscope image of fresh barley coleoptile cells.

4.4 結言

キセノン水和物の部分的な形成を利用した農産物の長期保存法の効果を検討することを目的に、まず、時間をパラメータにして水和物形成割合を 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%に制御した上、5 日間凍結保存後、解凍したの組織における拡散係数および水透過係数の測定を行い、細胞膜の水透過性に関する機能の評価を行った。その結果、水和物が 20%以下の組織では、水和物周囲の水の構造化の程度が弱く、大きな氷結晶を形成しやすいことが示された。また、水和物が 60%以上の組織では、水和物自体の体積膨張により、細胞膜の損傷が生じ、細胞膜の水透過係数を増大させたことが示された。すなわち、キセノン水和物が 30%~50%の組織では、細胞膜損傷が抑制されたことが示された。

さらに、得られた最適な保存条件である 30~50%にキセノン水和物の形成割合を調整した子葉鞘組織を 20 日間保存した。その結果、NMR を用いた拡散係数の測定より、凍結・解凍処理後の組織において、保存期間を延長しても、細胞膜の水透過性に関する機能がほぼ維持され、細胞膜の損傷が抑制されたことが確認された。従って、細胞膜の水透過性の変化を評価することで、保存後の細胞膜に関する損傷の程度を推定できると考えられた。また、キセノン水和物の部分的な形成を利用した上での凍結保存は、解凍した時に見られるドリップなどの発生を抑制する意味で、“生きたまま”の保存ではなくても、細胞膜の損傷等の抑制には有効である可能性があると推察された。

また、X 線イメージングを用いた組織におけるキセノン水和物の形成確認から、温度 1°C、分圧が 1.0 MPa の圧力でキセノン溶解させ、水和物結晶の形成割合を制御することで、細胞内外にキセノン水和物が分散的に形成される可能性が示された。

第5章 結論

5.1 摘要

本研究では新しい保存技術として、キセノン水和物を利用した長期保存法の確立を目的に、最適な処理条件について検討した。

第1章の序論では、既往研究における問題点の指摘と本研究の目的を記した。

第2章では、まず水中キセノン水和物の形成過程および結晶サイズ分布を検討した。そのため、異なる温度・圧力条件におけるキセノン水和物結晶のサイズの測定を行った。以上の検討より、実験条件の範囲においては、1°Cで0.7～1.0 MPa、5°Cで0.9および1.0 MPaの温度・圧力条件の中で最小サイズの水和物ができる条件は1°C、キセノン分圧1.0 MPaであることが示された。

次に、この条件をオオムギ子葉鞘細胞に適用し、水和物結晶形成による細胞の損傷を氷結晶の形成と比較して検討した。そのため、細胞の損傷程度の評価指標となる生存率を、キセノン保存区と凍結保存区での保存後に測定した。その結果、キセノン保存区では凍結保存よりも細胞の生存率が高く維持され、細胞膜の損傷が抑制できる可能性が示された。すなわち、1°C、1.0 MPaの条件が、組織保存へのキセノン水和物の形成に利用可能であることが示された。しかし、キセノン水和物の形成は子葉鞘組織全域か、一部に限定されているかは不明であった。さらに、保存時間の延長に伴い細胞生存率が徐々に低下することがキセノン保存区および凍結保存区とも観察された。これは、キセノン水和物と氷結晶は時間経過とともに成長し、子葉鞘細胞に損傷を与えたため、生存率が低下したものと考えられた。このため、今後キセノン水和物の形成割合を検討し、細胞膜への損傷が抑制できる条件を明らかにする必要があると考えられた。

第3章では、1°C、1.0 MPa で形成されたキセノン水和物の割合と細胞膜の損傷程度の関係について検討した。まず、キセノンガスの処理時間に伴うキセノン水和物の形成割合の変化について測定を行った。その結果、1°C、1.0 MPa の条件で、処理時間の調整により、キセノン水和物の形成割合の制御が可能であることが示された。次に、キセノン水和物の形成割合の変化に伴うキセノン水和物形成・解離後の細胞膜の水透過性に関する機能の評価を細胞内水の拡散係数および水透過係数に基づいて行った。その結果、60%以下のキセノン水和物が形成された組織において、細胞膜の水透過性に関する機能の低下が抑制されたことが示された。従って、処理時間調整により、キセノン水和物の形成割合を60%以下に制御することで、細胞膜の損傷が抑制できることが明らかになった。

第4章では、キセノンによる処理時間を制御することで、細胞内外でのキセノン水和物の形成割合を調整できることが示された。また、キセノン水和物の部分的な形成を利用した農産物の長期保存法の効果について検討した。まず、キセノン水和物形成割合を60%以下に制御した上、5日間凍結保存・解凍後の組織における細胞内水の拡散係数および水透過係数の測定に基づいて細胞膜の水透過性に関する機能の評価を行った。その結果、水和物が20%以下の組織では、水和物周囲の水の構造化の程度が弱く、大きな氷結晶を形成しやすいことが示された。また、水和物が60%以上の組織では、水和物自体の体積膨張により細胞膜の損傷が生じたことが示された。水和物が30~50%の組織では、細胞膜損傷が抑制されることが示されたことから、30%~50%のキセノン水和物の形成割合を調整・保存した子葉鞘組織において20日間の保存を行い、保存・解凍後の細胞内水の拡散係数および細胞膜の水透過係数について測定した。その結果、保存期間が20日間に延長しても、細胞膜の損傷が抑制されることが確認された。さらに、X線イメージングを用いた組織におけるキセノン水和物の形成を確認したところ、20%に水和物形成を制御した上で凍結保存した組織においても、細胞内に小さい水和物

が分散的に形成された可能性が示された。これらの結果より、キセノン水和物の形成割合の制御が細胞・組織レベルでの長期保存に有効である可能性を示すことができた。

第 5 章では、本論文で得られた知見を結論としてまとめた。

以上、本論文は、組織内の一部にのみキセノン水和物を形成させる条件を示すとともに、このキセノン水和物の部分的な形成を利用した凍結プロセスの制御が、細胞・組織レベルの長期保存において、細胞膜の損傷を軽減する上で有効であることを示したものであった。また、ここで得られた知見から、農産物の長期保存法として、キセノン水和物の形成割合を制御し、その後凍結することにより、細胞膜の物理的な損傷を抑制して長期保存が可能であることも示唆したもので、新たな農産物の長期保存法に道を拓くものと考えられる。

5.2 結論

本研究では、キセノン水和物の部分的な形成を利用した凍結プロセスの制御による農産物の長期保存法の確立を目的とし、基礎的知見を提示するために、細胞・組織レベルでの長期保存法について検討した。そのため、

まず、部分的なキセノン水和物の形成条件の検討からは、

1. 超純水を用いた実験で温度と圧力条件を調整することにより、小さな水和物を形成させる条件を明らかにした。また、その条件をオオムギ子葉鞘細胞に適用したところ、キセノン保存区では凍結保存よりも細胞の生存率が高く維持され、細胞膜の損傷が抑制できる可能性が示された。

2. 一定の温度・圧力条件で、キセノンガスの処理時間の調整により、オオムギ子葉鞘細胞内に形成されるキセノン水和物の割合が制御できることが示された。

3. キセノン水和物形成割合の制御を利用して、子葉鞘細胞の損傷を抑制できる可能性を示した。

そして、部分的なキセノン水和物の形成を利用した凍結プロセスの制御の検討からは、

1. キセノンガスの処理時間をパラメータにして結晶化の割合を制御することで、オオムギ子葉鞘組織内形成されたキセノン水和物の割合を 30~50%に制御することで、長期間の保存においても、細胞膜の損傷抑制に効果的であることが示された。

2. X線イメージングの測定により 20%水和物に制御した上で、7日間凍結保存した組織においても、細胞内にキセノン水和物が分散的に形成された可能性が示された。

3. キセノン水和物の形成割合を制御した上で凍結させることが、細胞膜の損傷抑制に有効であり、細胞・組織の長期保存の可能性を示した。

従って、キセノン水和物を用いて新しい長期保存法として利用できる可能性が示され

たとえられる。すなわち、凍結プロセスの制御という観点から、“生きたまま”の保存ではないものの、細胞膜の損傷による解凍時のドリップ発生の抑制に有効である可能性があり、ここのは、農産物の長期保存のメカニズムを検討する上で一つの手がかりになるものとする。

5.3 長期保存法としての実用化への今後の課題

生鮮農産物の保存法へのキセノンの利用に関する既往の研究は、水の構造化にのみ着目し、水和物自体を利用する着想がなかった。そのため、品質の保持期間を数週間延長できるに過ぎなかった。一方、従来の凍結保存に関する研究は、凍結速度の制御によるガラス化を目指すものか、あるいは、凍結防御物質の適用による凍結防止を目指したものであった。そこで、本研究ではキセノン水和物の部分的な形成を利用した凍結プロセスの制御を目指し、新たな農産物の長期保存法について検討を行った結果、細胞膜の損傷が抑制されたことなど、その長期保存法としての有効性について示すことができた。今後、X線回析法を用いたCH₄水和物の構造解析および水和物と氷の体積分率 (Takeya *et al.*, 2001 ; Takeya *et al.*, 2011 ; Izumi *et al.*, 2000) に関する報告から得られた知見から、X線回析測定法で得られた画像データより、水における水和物の形成モデルと比較・考察し、組織内におけるキセノン水和物と氷結晶の分布および体積分率を検討することで、生体組織に特有なキセノン水和物の形成モデルを提案する。これは、広く生物全般の保存法に対する応用・進展に貢献することが期待できるのみならず、本保存法のメカニズム、すなわち細胞におけるキセノン水和物の形成・成長プロセスが、より詳細に解明されることにも期待が持てる。

今後、1°Cで、1.0 MPa以下のキセノン圧力条件におけるキセノン水和物の形成割合と形成・解離後の組織の変化の程度の関係を検討する必要がある。この検討結果より、組織へのダメージが最小限に抑えられるキセノン水和物の形成割合を明らかにするとともに、本長期保存に適した操作条件を検討する必要がある。

本保存法を検討していく過程で得られる知見は、部分的にキセノン水和物を利用した凍結プロセスの制御のメカニズムを明らかにするため、新しい技術として食品への適用

可能性を見出すための助けとなり、食品産業への大きな貢献を果たすと考えられる。ここでは、主にキセノンガスを用いた検討を行うが、長期保存法の実用化への課題として、本研究で使用したキセノン以外のガスの検討も必要と考えられる。より安価な二酸化炭素などを代替物として使用することができれば、本保存法の改変技術として実用化が容易になるものとする。また、麻酔に使用されるキセノンを用いた本研究の成果は、脂質を多く含む卵子などの保存法への応用に役立つと考えられる。よって、本研究で得られた知見が、農産物保存の観点のみならず、医学分野においても利用可能な知見を与え、インパクトのある技術になると考えられる。

参考文献

安藤寛子, 鈴木徹, 川越義則, 牧野義雄, 大下誠一: キセノンガスを用いた野菜組織内の水の構造化とクラスレート水和物の形成 -MR によるプロトン緩和時間の観察-, 日本冷凍空調学会論文集, 25 (4), 299 (2008).

安藤寛子: 氷及びガスハイドレートを利用した生鮮野菜の長期保存法に関する基礎研究, 博士論文 (2010).

上村松生, 中川原千早, 河村幸男, 吉田静夫, 江藤剛治, 竹原幸生: 低温顕微鏡と高速ビデオカメラを組み合わせた細胞内凍結過程の解析, 低温生物工学会誌, 48 (2), 129-133 (2002) .

上村松生: 冷凍, 79 (915) , 18-23 (2004) .

上平恒, 逢坂昭: 生体系の水, 講談社, 151 (1989) .

上平恒 (阿曾弘一, 隅田幸男編) : 低温医学, 朝倉書店, 13 (1983) .

内田努: 環境問題とガスハイドレート結晶成長研究, 日本結晶成長学会誌, 28 (2) , 70-76 (2001) .

内田努, 伊藤英之助: 「氷, 水およびクラスレート水和物の物性に関する研究集会」に見るクラスレート水和物に関する物性の研究の発展, 低温科学, 64, 173-181 (2005).

内田努: 水とハイドレート生成物質との界面張力・粘性, 分離技術, 37(2), 93(2007).

海老沼考郎: ガスハイドレートの特性と天然ガス貯蔵・輸送への応用, 日本エネルギー学会誌, 81 (10), 908-918 (2002).

大垣一成, 守時正人: CO₂・Hydrate の生成・分解時の顕微鏡観察, 化学工学論文集,

20 (2), 317-319 (1994).

大下誠一, 橋本篤, 瀬尾康久: 水の構造化による代謝抑制 (第1報), 農機誌, 58 (6), 31-38 (1996).

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

奥田努, 塩川久男訳: モダンサイエンスシリーズ不活性気体, 共立出版, 141 (1981).

加美山隆, 鬼柳善明, 岩佐浩克, 内田努, 海老沼考郎, 成田英夫, S. M. Bennington: 中性子散乱で見るメタンハイドレートの動的構造, 低温科学, 64, 215-230 (2005).

加藤舜郎: 食品冷凍の理論と応用, 光琳, 東京, 7-8 (1971).

佐々木重雄, 清水広晏: 顕微観察および高圧マラン散乱測定によるガスハイドレートの圧力勇氣相転移とケージ占有性の研究, 低温科学, 64, 199-214 (2005).

相良泰行, 荒木徹也: マイクロスライサ画像処理システムによる氷結晶3次元計測法の開発, 冷凍, 83 (965), 3-8 (2008).

鈴木啓三: 水および水溶液, 共立出版, 202-208 (1982).

鈴木卓: 低温生物工学会誌, 48 (2), 139-143 (2002).

鈴木徹: 第1章食品冷凍総論, 新版食品冷凍技術 (食品冷凍技術編集委員会 編), 社団法人日本冷凍空調学会, 東京, 1-17 (2009).

竹谷敏, 後藤義人, 米山明男, 上田和浩, 宮本淳, 本堂武夫, 堀彰, 兵藤一行, 武田徹: 位相コントラストX線イメージング法を用いた氷床コア中におけるエアハイドレートの三次元分布解析, 第2回極域科学シンポジウム, 東京, 22S (2011).

寺倉清之，池田隆司： Maruo Boero: 第一分子動力学法による水の物理・化学的性質のシミュレーション～超臨界水と高圧下メタンハイドレート～，低温科学，64，57-69 (2005) .

永井玲子： 原形質流動，植物の化学調節，34(2), 236-248 (1999).

日本冷凍食品協会： 日本冷凍食品辞典，朝倉書店，27，25-98 (1975) .

橋本 篤，大下誠一： 水の構造化を利用した野菜の貯蔵，農業機械学会誌，158 (5)，38-41 (1996).

橋本 篤，大下誠一： 疎水性ガス圧力下における食品モデル中の細菌の増殖抑制効果，農業機械学会誌，60，83-88 (1998).

町田功，田中学，大須賀敏明，小林雅之，菱田誠： 低温下における玉葱表皮細胞の生存率，低温生物工学会誌，50 (2) ，55-61 (2004) .

松嶋卯月： 疎水性ガスを利用したカーネーション切花の保存に関する研究，東京大学博士論文 (2000).

ファーラー T. C., ベッカー E. D. (赤坂一久，元敏明 訳)：パルスおよびフーリエ変換 NMR，吉岡書店，京都，215 (1976).

フランク F. (村瀬則郎，片桐千仞 訳)：低温の生物物理と生化学，北海道大学図書刊行会，北海道，253 (1989).

山室修： アモルファス状態の氷およびクラスレート水和物の構造とダイナミクス，低温科学，64，115-120 (2005).

ラーマン著(通元夫，廣田洋訳)：最新 NMR，シュプリンガー・フェアラーク東京(1989).

Anisimov A. V., Sorokina N. Y. and Dautova N. R. : Water diffusion in biological

- porous systems: aNMR approach, *Magn.Res. Imaging*, 16, 565-568 (1998).
- Baumert J. : Structure, Lattice Dynamics and Guest Vibration of Methane and Xenon Hydrate, Kiel, Universitat, Dissertation (2004).
- Bertie J. E., Calvert L. D. and Whalley E. : *ibid.*, 38, 840 (1963).
- Chrystele S., Ho-Kwang M. and Russell J. H. : High-pressure transformations in xenon hydrates, *PNAS*, 99 (1), 25-28 (2002).
- Cherubini A. and Bifone A. : Hyperpolarised xenon in biology, *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 42, 1-30 (2003).
- Clark C. A. and Bihan D. L. : Water diffusion compartmentation and anisotropy at high b values in the human brain, *Magnetic Resonance in Medicine*, 44, 852-859 (2000) .
- Davidson D. W. : *Water*, vol.2 (ed. Franks, F.), Plenum Press, New York-London, 115 (1973).
- Davidson D. W., Garg S. K. and Ripmeester J. A. : NMR behavior of the clathrate hydrate of tetrahydrofuran. II. Deuterium measurements, *Journal of Magnetic Resonance*, 31 (3), 399-410 (1978).
- Ewing G. J. and Ionescu L. G. : Dissociation pressure and other thermodynamic properties of xenon-water clathrate, *J. Chem. Eng. Data*, 19, 367-369 (1974).
- Fennema O., Powrie W. D. and Marth E. L. : Low-temperature preservation of food and living matter, Marcel dekker INC, New York, 598 (1973) .
- Gribnau M. C. M. : Determination of solid/liquid ratios of fats and oils by low-resolution pulsed NMR, *Trend in Food Science and Technology*, 31, 186-190

- (1992) .
- Huo Z., Freer E., Lamar M., Sannigrahi B., Knauss D. M. and Sloan E. D. : Hydrate plug prevention by anti-agglomeration, *Chemical Engineering Science*, 56, 4979 (2001) .
- Hulle G. V. and Fennema O. : Gas hydrates in aqueous-organic systems. V. Effects of ethylene oxide and ethylene oxide hydrate in animal tissue, *Cryobiology*, 7, 4 (1971).
- Itoh H., Chazallon B., Schober H., Kawamura K. and Kuhs W. F. : Inelastic neutron scattering and molecular dynamics studies on low-frequency modes of clathrate hydrates, *Canadian Journal of Physics*, 81, 493-501 (2003).
- Izumi F. and Ikeda T. : A Rietveld-analysis program RIETAN-98 and its application to zeolites, *Mater. Sci. Forum Vols.*, 321-323 (2000).
- Kamb B. : *Physics and Chemistry of Ice* (ed. Whalley, E.) Roy. Soc. Canada, Ottawa, 28 (1973).
- Long J. P. and Sloan E. D. : Hydrates in the ocean and evidence for the location of hydrate formation, *International Journal of Thermophysics*, 17,1 (1996) .
- Lide D. A. : *HANDBOOK of CHEMISTRY and PHYSICS*, 74th edition, Section 6, CRC PRESS (1993) .
- Martion M. N. and Zaritzky N. E. : Ice Crystal Size Modifications during Frozen Beef Storage, *J. of Food Sci*, 53 (6), 1631-1637 (1988).
- Makogon T. Y., Metha A. P. and Sloan E. D. : Structure H and Structure I Hydrate Equilibrium Data for 2,2-Dimethylbutane with Methane and Xenon, *Journal of Chemical and Engineering Data*, 41, 315 (1996).

- Mazur P. : The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates, *Cryobiology*, 14 (3), 251-272 (1977).
- Meerwall E. V. and Ferguson R. D. : Interpreting pulsed-gradient spin-echo diffusion experiment with permeable membrane, *J. Chem. Phys.*, 74, 6956-6959 (1981).
- Morris G. J. and Clarke A. (Eds) : Effect of low temperatures on biological membranes, Academic Press, London (1981) .
- Ohmura R. : Clathrate hydrate crystal growth in liquid water saturated with a hydrate-forming substance: variation in crystal morphology, 84 (1), 1-16 (2004).
- Ohgaki K., Sugahra T. and Suzuki M. : Phase behavior of xenon hydrate system, *Fluid Phase Equilibria*, 175, 1-6 (2000).
- Pauling L. : A molecular theory of general anesthesia, *Science*, 124, 15-21 (1961).
- Purwanto Y. A., Oshita S., Seo Y. and Kawagoe Y. : Concentration of liquid foods by the use of gas hydrate, *Journal of Food Engineering*, 47, 133 (2001) .
- Rice S. A. : *Topics in Current Chemistry*, 28, 107 (1975) .
- Roy S. S., Taylor T. A. and Kramer H. L. : Textural and ultrastructural changes in carrot tissue as affected by blanching and freezing, *J. Food Sci.*, 66, 176-180 (2001) .
- Sakemoto R., Sakamoto H., Shiraiwa K., Ohmura R. and Uchida T. : Clathrate Hydrate Crystal Growth at the Seawater/Hydrophobic-Guest-Liquid Interface, *Crystal Growth & Design*, 10 (3) , 1296-1300 (2010) .
- Sloan E. D. JR: Clathrate Hydrate: The other common solid water phase, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 39 (9), 3123-3129 (2000).

- Sloan E. D. JR. and Koh C. A. : Clathrate hydrate of natural gases, Third Edition, 720, CRC Press, New York (2007).
- Stern L. A., Kirby S. H. and Durham W. B. : Peculiarities of Methane Clathrate Hydrate Formation and Solid-State Deformation, Including Possible Superheating of Water Ice, *Science* , 273 (5283), 1843-1848 (1996).
- Shimada N., Sugahara K., Sugahara T. and Ohgaki A. : Phase transition from structure-H to structure-I in the methylcyclohexane+ xenon hydrate system, *Fluid Phase Equilibria*, 205 (1), 17-23 (2003).
- Sotome I., Oshita S., Kawagoe Y., Torii T. and Seo Y. : Measurement of membrane hydraulic conductivity by a newly development method, *Transaction of the ASAE*, 47, 1208-1213 (2004).
- Takeya S., Shimada W., Kamate Y., Ebinuma T., Uchida T., Nagao J. and Narita H. : In situ X-ray diffraction measurements of the self-preservation, *Chemical Engineering Science*, 60, 1383-1387 (2001).
- Takeya S., Uchida T., Nagao J., Ohmura R., Shimada W., Kamate Y., Ebinuma T., and Narita H. : Particle size effect of CH₄ hydrate., *J. Phys Chem. A*, 105, 9756-9759 (2005).
- Takeya S., Honda K., Yoneyama A., Hirai Y., Okuyama J. : Observation of low-temperature object by phase-contrast x-ray imaging: Nondestructive imaging of air clathrate hydrates at 233 K, *Rev. Sci. Instrum*, 77, 053705-1-4 (2006).
- Takeya S., Yoneyama A., Miyamoto J., Gotoh Y., Ueda K., Hyodo K. and Takeda T. : Phase-contrast X-ray imaging of the gas diffusion layer of fuel cells, *J. Ynchrotron Rad*, 17, 813–816 (2010) .
- Takeya S., Yoneyama A., Ued K., Hyodo K., Takeda T., Mimachi H., Takahashi M.,

- Iwasaki T., Sano K., Yamawaki H., and Gotoh Y. : Nondestructive imaging of anomalously preserved methane clathrate hydrate by phase contrast X-ray imaging, *J. Phys. Chem C*, 115, 16193-16199 (2011).
- Tanner J. E. : Transient diffusion in a system partitioned by permeable barriers, Application to NMR measurements with a pulsed field gradient, *J. Chem. Phys.*, 69, 1748-1754 (1978).
- Tiphaine L., François M., Sandra D. and Dominique L. R. : Water, ice and sucrose behavior in frozen sucrose-protein solutions as studied by ^1H NMR, *Food Chemistry*, 84 (1) , 77-89 (2004) .
- Uchida T., Nagayama M., Shibayama T. and Gohara K. : Morphological investigations of disaccharide molecules for growth inhibition of ice crystals., *Journal of Crystal Growth*, 299 (1), 125-135 (2007).
- Woessner D. E. : Effects of diffusion in nuclear magnetic resonance spin-echo experiments, *J Chem. Phys.*, 34, 2057-2061 (1961).
- Woessner D. E. and Gutowsky H. S. : Nuclear Pure quadruple relaxation and its temperature dependence in solids, *J. Chem Phys.*, 39, 440-456 (1963).
- Yoneyama A., Takeda T., Tsuchiya Y., Jin W., Lwin T.T., Koizumi A., Hyodo K. and Itai Y. : A phase-contrast X-ray imaging system-with a $60 \times 30\text{mm}$ field of view-based on a skew-symmetric two-crystal X-ray interferometer, *Nucl. Instrum. Meth. A* 523, 217-222 (2004) .
- Yoneyama A., Jin W., Hyodo K. and Takeda T. : Quantitative comparison of imaging performance of x-ray interferometric imaging and diffraction enhanced imaging, *Med. Phys* , 35, 4724-4734 (2008) .
- Zhan Z. G. and Zhang M. : Effects of inert gases on enzyme activity and inspiration

of Cucumber, *Journal of food and Biotechnology*, 24 (3), 16-18 (2005).

Zhang M., Zhan Z. G., Wang S. J. and Tang M. J. : Extending the shelf-life of asparagus spears with a compressed mix of argon and xenon gases, *LWT - Food Science and Technology*, 41 (4), 686-691 (2008).

謝辞

本論文をまとめるにあたり、多くの方々からご指導、ご助言、激励を頂きました。ここに心からお礼を申し上げます。

東京大学大学院農学生命科学研究科生物・環境工学専攻の大下誠一教授には、指導教官として本研究を行う貴重な機会を与えて頂き、修士から長きに渡って、適切なご指導、ご助言を頂きました。

東京大学大学院農学生命科学研究科生物・環境工学専攻の牧野義雄准教授には、ゼミなどの討論を通じて、研究について常に身近な立場から適切なご指導ご助言をして頂きました。

東京大学大学院農学生命科学研究科生物・環境工学専攻の川越義則助教には、統計的手法、実験装置の使用法、研究方法などに関して適切なご指導、ご助言を頂きました。また同専攻の富士原和宏教授ならび芋生憲司教授には、論文審査委員として本論文の内容に関して多大なご教授を頂きました。

東京工科大学応用生物学部の安藤寛子助教には、NMRに関する研究を行うにあたり、適切なご指導、ご助言を頂きました。

オオムギ種子は、愛媛大学農学部の山岡直人教授の御厚意で譲渡していただきました。

独立行政法人 産業技術総合研究所の竹谷敏主任研究員には、X線イメージング測定にご協力頂き、適切なご指導・ご助言を頂きました。

榊前川製作所には、クライオステージを貸与して頂きました。

北海道大学大学院工学研究科応用物理学専攻の内田努准教授には、学会などの活動を通じて、キセノン水和物に関する研究を行うにあたり、適切なご指導、ご助言を頂きました。さらに論文審査委員として、中間発表の段階から数多くのご指摘ならびにご助言をいただき、論文の内容を充実させることができました。心より感謝申し上げます。

東京大学大学院農学生命科学研究科生物・環境工学専攻生物プロセス工学研究室の秘書目時美穂子氏には、研究生活を過ごす中で常に細やかな気配りをして頂いたことに心から感謝しております。また、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に所属されておりました方々からは、研究生活でのあらゆる場面において、常に丁寧なご指導を頂き、温かいご助言を頂きました。最後に、私事ではありますが、研究生活を物心両面で支えてくれた家族や友人たちに、心から感謝の意を表します。

多くの人々の支えによって、本論文は完成するに至りました。重ねて心からお礼を申し上げます。