



Title	植物組織におけるガスハイドレート形成とその影響
Author(s)	則竹(安藤), 寛子; 鈴木, 徹; 大下, 誠一
Citation	低温科学, 71, 97-104
Issue Date	2013-03-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/52359
Type	departmental bulletin paper
File Information	LTS71_011.pdf



植物組織における ガスハイドレートの形成とその影響

則竹(安藤)寛子¹⁾, 鈴木 徹¹⁾, 大下 誠²⁾

2012 年 9 月 16 日受付, 2012 年 12 月 17 日受理

植物組織におけるガスハイドレート形成プロセスの検討を目的に, 非破壊測定技術である NMR 法にてタマネギ組織内における Xe ハイドレート形成・成長の様子を観察した. ソリッドエコー法によるガスハイドレート形成割合および MRI 画像観察における組織内部構造の変化を観察した. その結果, ソリッドエコー法を用いることでタマネギ組織の内部に Xe が浸透・溶解した後, 試料管に衝撃を与えると組織表面に Xe ハイドレートが形成することを確認した. 形成した Xe ハイドレートは, 時間経過に伴いその量を増加させ, 組織表面のみならず組織の内部においても結晶を形成・成長させることを確認した. 併せて行った拡散係数の測定より観察される細胞膜の水透過性の変化の観察結果より, Xe ハイドレート形成・成長によって細胞膜はダメージを受け, その解離後, 細胞膜の水透過性は著しく増大することを示した.

Gas hydrate formation and effect for plant tissue.

Hiroko Noritake-Ando¹, Toru Suzuki¹, Seiichi Oshita²

For understanding the process of gas hydrate formation in plant tissue, onion tissue structure before and after Xe hydrate formation was investigated by using nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy, a non-destructive technique. The gas hydrate formation in the tissue was observed quantitatively by using solid echo method. And the cell structure change in the tissue depending on Xe hydrate formation was observed by using MRI measurement. As the results, it was confirmed that change of the tissue structure with Xe penetration and Xe hydrate formation was observed clearly by using MRI measurement. While Xe hydrate was increase in the onion tissue quantitatively, the growth of Xe hydrate was observed not only on the surface but also in the inter tissue. Furthermore, depending on the hydrate formation in the tissue, cell membrane in the tissue was caused damage significantly after Xe hydrate decomposition through observation of water diffusivity. It was suggested that the property of cell membrane changed significantly by formation of Xe hydrate in the tissue.

1. はじめに

ガスハイドレートの形成メカニズムは, 氷の形成や疎水性ガスの溶解に関する事項, またこれらの現象のコンピュータシミュレーションの結果より, 様々に検討されている (Salon and Koh, 2007). 生物組織においても麻酔のメカニズムに対する興味から, ガスハイドレートの形成に関する研究は行われてきた.

生物とガスハイドレートに関する研究は, 1961 年, Pauling がサイエンス誌でガスハイドレート微細結晶と動物の全身麻酔の関係を示唆した事に始まる. 彼は, 麻酔性のガスとして利用されている Xe などが水に溶解すると形成するガスハイドレートに着目した. そして, ガスハイドレートの微細結晶がタンパク質等の結合部位や脳内の水溶液中のイオンに結合することで, それらが発信する電気信号のネットワークに制限を与えると予測した (Pauling, 1961). また同年, Miller (1961) も全身麻酔メカニズムとして, Xe などの麻酔性ガス分子の周りで高度に構造化した水が形成し, 脳の活動電位や細胞膜の流動性の低下を起すことを示唆した. その後, ¹²⁹Xe 核の NMR による可視化技術によって (Raftery, 2006), Xe とタンパク質等の生体物質との結合に関する報告はなされたものの (Cherubini and Bifone,

1) 東京海洋大学海洋科学部食品生産学科

2) 東京大学大学院農学生命科学研究科

¹ Department of Food Science and Technology, Tokyo University of Marine Science and Technology, Tokyo, Japan

² Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, Tokyo, Japan

2003), 生体におけるガスハイドレートやいわゆる構造化した水の形成を示すには至っていない. また食品科学分野において, 長期保存法への利用の観点から食品素材を用いたハイドレートの形成に関する検討が行われた(Huang et al., 1965). ニンジン組織・牛筋肉組織の細胞構造を光学顕微鏡を用いて観察することで, ガスハイドレートの形成過程の観察が試みられた. しかし, 機械的な問題から組織を非破壊の状態を取り扱うことができず, 麻酔メカニズムに関する研究同様, 食品組織においてもガスハイドレートの形成を直接証明するには至らなかった.

そこで我々は, 生物組織におけるガスハイドレートの形成を実験的に確認することを目的に, 取り扱いが容易なタマネギ組織を用いてガスハイドレートの形成を観察してきた. その結果, 粉末X線回析測定より, 5°C, 0.8 MPaのXe分圧内にてタマネギ組織にXeハイドレートが形成することを確認した. またNMR緩和時間を観察することで, タマネギ組織におけるXeハイドレートの形成を, 組織を非破壊の状態において捉えることができることを確認した(Ando et al, 2009). これらの結果を踏まえて, 本研究では, タマネギ組織中におけるガスハイドレート形成プロセスを観察することを目的に, Xeハイドレート形成・成長に伴う量的な変化をソリッドエコー法による固体割合の測定を用いて検討した. 併せて, 組織内部の変化を観察するため, MRI測定を行った. またタマネギ組織におけるXeハイドレート形成による影響を理解するため, スティミュレティッドエコー法による拡散係数測定より細胞膜水透過性の変化を観察した. そして, これらの結果をもとに, タマネギ組織におけるガスハイドレートの形成プロセスおよび解離後の影響について論じることとした.

2. 試料と実験方法

2.1 試料の調整

北海道産のタマネギ (*Allium cepa* L.) を購入後, 直ちに4 mm×4 mm×10 mmに切り出し, NMR用耐圧試料管(耐圧1.0 MPa)に入れた. Fig. 1に示す圧力付加ユニットを通して, 雰囲気温度5°Cにて, 試料管内に0.8 MPaのXe(99.995%, 岩谷産業株式会社)を封入・密閉した. Xeを封入後, 密閉された組織は, 雰囲気温度5°Cの低温庫に保存された. ただし, 本研究ではXe封入から3時間後, 試料管に衝撃を与えて, タマネギ組織におけるXeハイドレート微細結晶の形成を促した. また保存に伴うXe分圧の低下を防ぐため, 適宜, 試料管内にXeを封入した.

2.2 ガスハイドレート形成割合の測定

25 MHzの¹H-NMR装置(JNM-MU25A, 日本電子(株))を用いて, タマネギ組織中のXeハイドレート形成

割合の測定を行った. パルスシーケンスにはソリッドエコー法を用い繰り返し時間(TR)は30 s, 積算回数は16回とした.

試料に一定時間90°パルスを照射すると, その照射後, 試料中のプロトンの磁化の和Mは指数関数的に自由誘導減衰を起こす. この磁化MのFIDは, 信号強度(S)として観測される. しかし, 試料内に2つ異なる横緩和時間(T₂)を持つプロトンが存在する場合, ln(S) vs. 時間プロットは2つの異なる傾きを持つ直線を成すことが知られている. 従って式(1)より, 得られたNMR信号強度(S)を用いて試料中の固体を成すプロトンの割合が計算できる(Gribnau, 1992). 本研究では, この方法を用いてタマネギ組織中に形成したXeハイドレートの形成割合(組織中の水におけるXeハイドレートに変化した水の割合)を求めた.

$$\text{Solid Content, \%} = \frac{S-L}{S} \times 100 \quad (1)$$

ただし, 90°パルス照射直後の信号強度をS(試料中のプロトンの総量), Sと傾きの分岐点の信号強度をLとした.

2.3 組織内部構造の観察

イメージング用プローブを付属した400 MHzの¹H-NMRスペクトルメーター(AV400WB, Bruker)を用い, マルチスライススピンエコー(MSE)法による組織内部のT₂強調画像の測定を行った. 測定中, ガスハイドレートの解離を防ぐため, 液体窒素を用いて測定部の温度を5°Cに保った. 試料の内部画像は, 画像断面層の厚み0.5 mm, 待ち時間(TR)1500 ms, 繰り返し時間(TE)8 ms, 積算回数8回, 画像マトリックス128×128の条件で測定した.

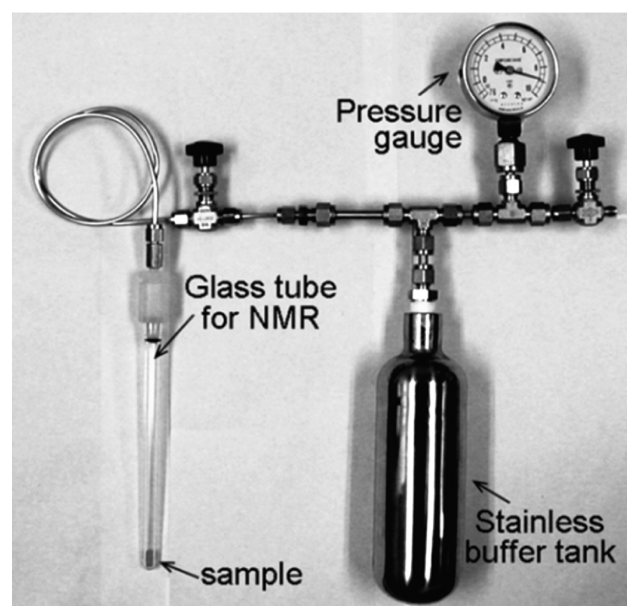


図1: 試料を調整するための圧力付加ユニット
Fig. 1 Pressure introduction unit for preparation the sample.

2.4 水分子の拡散係数の測定

傾斜磁場勾配パルス発生装置を付属した 25 MHz の NMR 装置 (MU25A, JEOL) を用い, スティミュレティッドエコー法による拡散係数の測定を行った. 拡散観測時間 Δ [ms] とパルス幅 δ [ms] を一定に保ちながら, 磁場勾配強度 g [Gauss $\cdot$ cm $^{-1}$] を変化させ, シグナルを観察すると, その強度 S は式 (2) に従って減衰する.

$$\ln(S) = \ln(S_0) - D(\gamma \cdot g \cdot \delta)^2 (\Delta - \delta/3) \quad (2)$$

ここで γ は ^1H の磁気回転比で 4258 Hz $\cdot$ Gauss $^{-1}$ である. $(\gamma \cdot \delta \cdot g)^2 (\Delta - \delta/3)$ に対して $\ln(R)$ をプロットして得られる直線の傾きから拡散観測時間 (Δ) における見かけの拡散係数 D [cm 2 $\cdot$ s $^{-1}$] を求めた. 本研究では, 磁場勾配強度は 21.0~49.2 Gauss $\cdot$ cm $^{-1}$, 拡散観測時間 Δ は 20~500 ms とした.

3. 結果

3.1 Xe ハイドレート形成・成長の量的な変化

Xe 封入・保存に伴うタマネギ組織の外観の変化を Fig. 2 に示す. Xe 封入から 3 時間後, タマネギ組織 (Fig 2 (2)) の表面に固体様の物質が形成した. すでに X 線回折より, タマネギ組織に形成する固体様物質が Xe ハイドレートであることを確認している (Ando et al, 2009). 本研究で使用したタマネギ組織においても, Xe 封入から 3 時間後, Xe ハイドレートが形成することが確認された.

測定された信号強度 (S) と時間の関係を Fig. 3 に示す. 使用した NMR 装置の測定精度を考慮して, 得られた NMR 信号強度において割合 10%未満の成分は, 誤差と判断した. 生鮮組織 (Fig. 3 (1)) および Xe 封入直後の組織 (Fig. 3 (2)) では, 1 つの傾きからなる直線が観察された. しかし, 外観の変化より Xe ハイドレ-

ートの形成が確認された Xe 封入から 3 時間後の組織 (Fig. 3 (3)) では, 2 つの傾きからなる直線に変化した. 従って, タマネギ組織には, 異なる 2 つの運動性を持ったプロトンが存在することが確認された. 早い傾きを持つプロトンの T_2 を計算した結果, 7 μ s であった. 測定に用いた NMR 装置は, 90 $^\circ$ パルス照射後, NMR 信号が検出されるまで 10 μ s の時間を要する (デットタイム). この様に非常に短い T_2 は, 石中に含まれる水 (Collett et al., 2006) や氷 (Overloop and Gerven, 1993) など固体試料において観察される. また, 既往の研究において I 型のメタンガスハイドレートのプロトンの T_2 は, 10 μ s 以下であることが示されている (Ripmeester and Ratcliff, 1989; Kleinberg et al., 2003). 従って, タマネギ組織で観察された試料中の $T_2 = 7 \mu$ s であるプロトンは, 形成した Xe ハイドレートに由来していると考えらる.

これらの結果を踏まえて NMR 信号強度より, 試料中の固体相と液体相に存在するプロトンの割合を算出した. 本研究では, 固体相の割合を Xe ハイドレート形成割合とした. その結果を Fig. 4 に示す. Fig. 4 より, Xe ハイドレート形成直後, すなわち Xe 封入から 3 時間後の組織には 19% の Xe ハイドレートが形成することが示された. この組織をそのまま保存すると, 保存 1

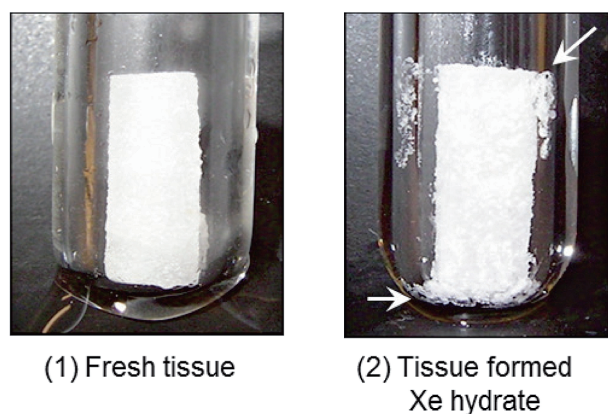


図 2: 5 $^\circ$ C, 0.8 MPa の Xe 分圧封入前後におけるタマネギ組織の外観変化

Fig. 2 Visible change of onion tissue before and after introduction of 0.8 MPa Xe pressure at 5 $^\circ$ C.

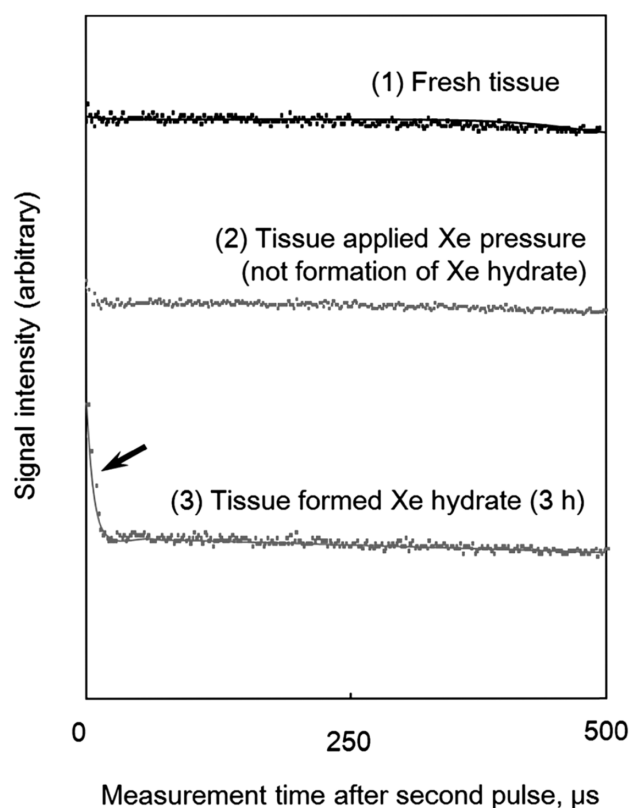


図 3: ソリッドエコーパルスシーケンスを用いた NMR 測定によって得られた Xe ハイドレート形成前後の NMR シグナルパターンの変化.

Fig. 3 Change of NMR signal pattern in onion tissue before and after introduction of Xe pressure by NMR measurement with solid echo pulse sequence.

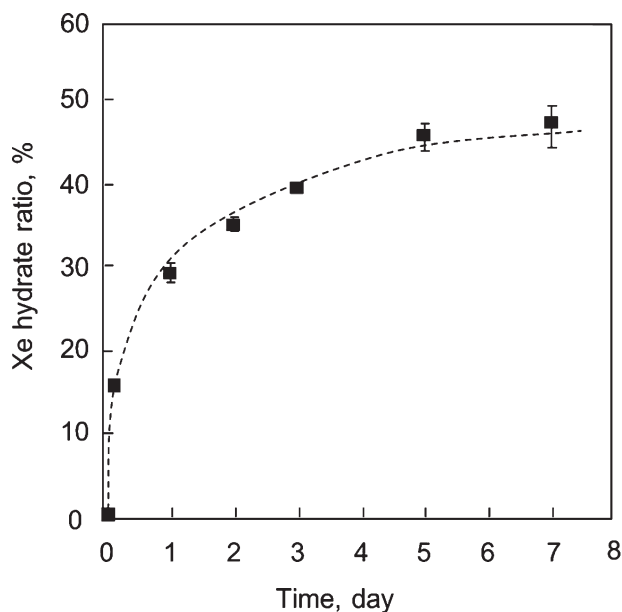


図4：保存に伴うタマネギ組織におけるXeハイドレート形成割合の変化。エラーバーは測定値の最小および最大を示す (n=3)。

Fig. 4 Change of Xe hydrate formation ratio in onion tissue depending on preservation time. Error bar shows maximum and minimum values (n=3).

日後, Xeハイドレート形成割合は30%まで増加し, 保存5日後の組織は46%の組織内の水がXeハイドレートへと変化していることがわかった。その後, その形成割合の増加は収束し, 保存7日たっても48%であっ

た。

3.2 Xeハイドレート形成に伴う組織内部構造の変化

Fig. 5にXeハイドレートの形成に伴う組織内部の変化を観察したMRI画像を示す。MRI画像は, 液状の水が多い部分は白色, 少ない又はない部分は黒色で示される。そのため, 固体状の水であるガスハイドレートが形成すると黒色で示される。

Xe圧力付加前の生鮮タマネギ組織には, 組織内部に細胞構造に由来した構造が見られた。すなわち, 細胞コンパートメントに沿って水の少ない黒い箇所が観測された。MRI画像において, 生鮮植物組織内の細胞コンパートメントが観察されることは既に示されている (Köckenberger, 2001)。従って, 生鮮タマネギ組織においてもMRI画像より細胞コンパートメントを観察できたと考えられる。

MRI画像で観察された組織内部の細胞構造は, 0.8 MPaのXeを付加してから1時間後(Xeハイドレート形成前)観測されにくくなった。既往の研究において, Xeは水よりも, 脂質に溶解しやすいことが報告されている (Cherubinia and Bifone, 2003)。そのため, この変化は, Xeの細胞膜(リン脂質)への溶解と関係した変化と考えられる。一方, Fig. 6に示す窒素にて0.8 MPaの圧力を付加した組織には, 圧力を3時間付加しても組織の内部構造にこのような変化は見られなかった。従って, 物理的な圧力を付加しても細胞構造は喪失しな

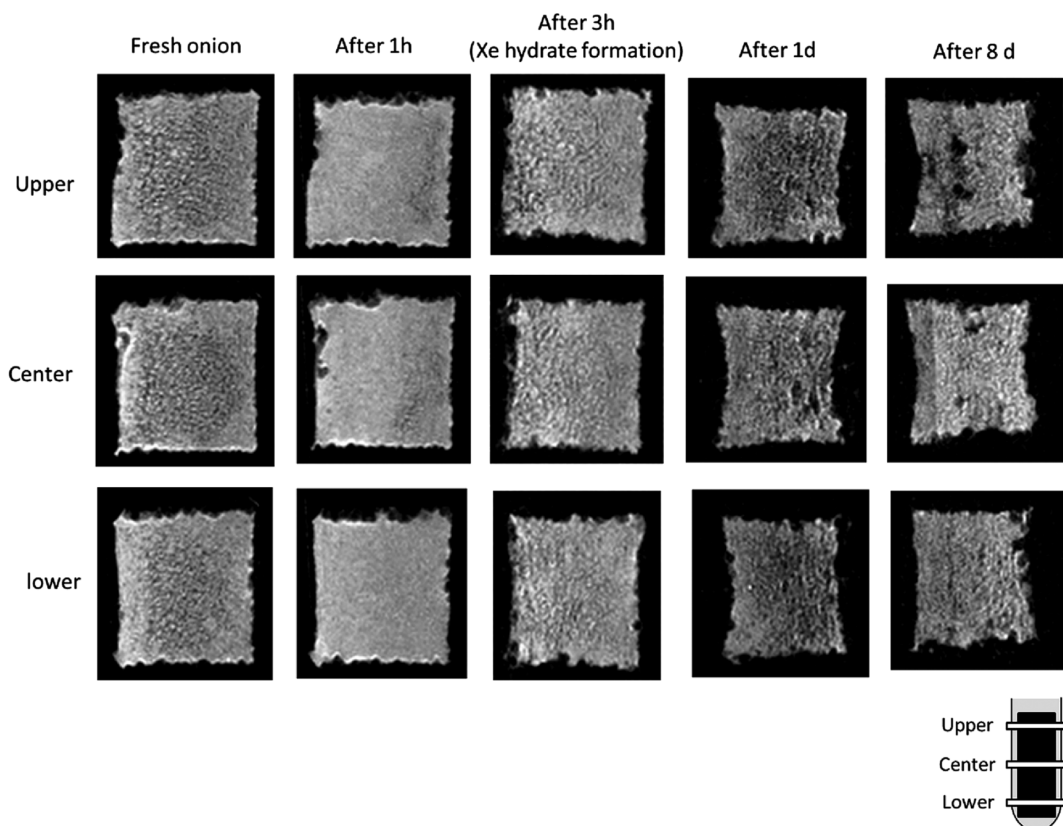


図5：Xeハイドレート形成前後のタマネギ組織内部のMRI画像。

Fig. 5 MRI image in inner onion tissue before and after Xe hydrate formation

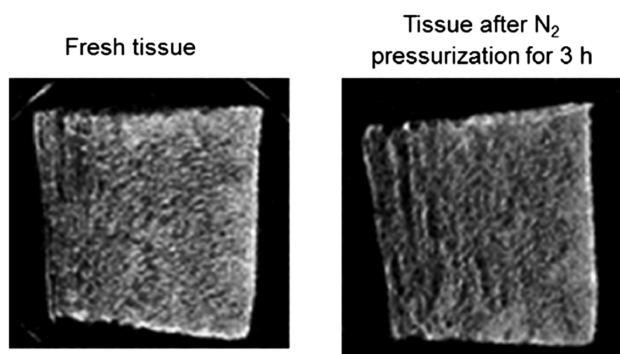


図6：MRI測定によって得られたタマネギ組織内部構造に対する0.8 MPaの窒素圧の影響。

Fig. 6 Effect of 0.8MPa N_2 pressure for internal structure in onion tissue measured by MRI.

いことが示された。よって観察された変化は、Xeの溶解に由来した変化であると考えられた。しかし、組織にXeハイドレートが形成すると（Xe付加より3時間後の組織）、再び、細胞構造に似た構造が観測されることが確認された。その後、Xeハイドレートの形成・成長と共に、組織内部の特定の部位で黒いスポットの様な構造が観察されるようになった。保存8日後の組織では、そのスポットは非常に大きく成長していた。このような黒いスポットは、組織中の液体の水がXeハイドレートに変化し、その運動性が低下したために観察されたと考えられた。また保存8日後の組織では、タマネギ組織の四角い外形が変形していた。これは組織表面の水が多量のXeハイドレートへと変化したために観察されたと考えられる。このようなタマネギ組織へのXeの溶解およびXeハイドレート形成に伴う内部構造の変化は、組織の上部・中心部・下部のすべての場所で観察された。これらの結果より、本研究の実験条件においてXeハイドレ

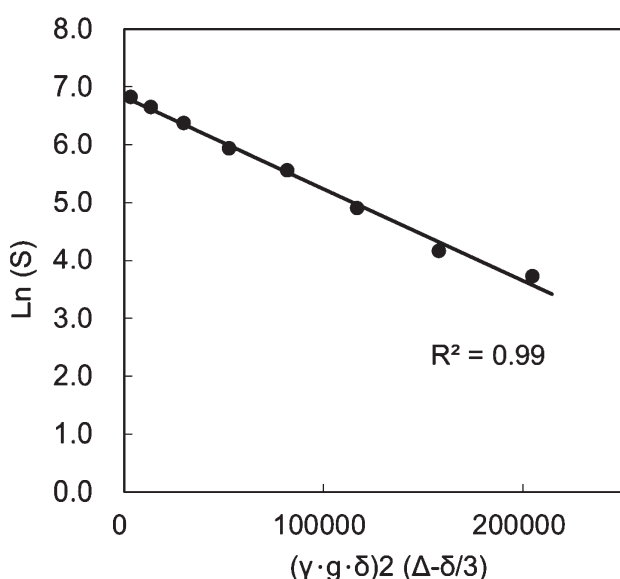


図7： $\Delta=20$ ms時の生鮮タマネギ組織における $\ln(R)$ と $(\gamma g \delta)^2 (\Delta - \delta/3)$ の関係。

Fig. 7 Relationship between $\ln(R)$ vs. $(\gamma g \delta)^2 (\Delta - \delta/3)$ in fresh onion tissue at diffusion time $\Delta=20$ ms.

トは組織の表面だけでなく、組織の内部にも形成することが示された。

以上の結果より、タマネギ組織をXe分圧内に静置することで、まず組織内にXeが十分に溶解し、その後、Xeハイドレートの微細結晶が組織内部に様に形成することが示された。そして、保存に伴い、組織の表面だけでなく内部においてもXeハイドレートは成長することが確認された。

3.3 Xeハイドレート形成・解離による細胞膜への影響

Fig. 7に、スティミュレティッドエコー法を用いたNMR測定において、拡散観測時間 $\Delta=20$ msの条件で測定された生鮮組織のNMR信号強度 $\ln(S)$ vs. $(\gamma \cdot g \cdot \delta)^2 (\Delta - \delta/3)$ をプロットした結果を示す。タマネギ組織中の水の拡散係数 D は、この直線の傾きである。本研究において、このような $\ln(S)$ vs. $(\gamma \cdot g \cdot \delta)^2 (\Delta - \delta/3)$ プロットの直線関係は、Xeハイドレート形成後の組織においても、すべての拡散観測時間（ $\Delta=20 \sim 500$ ms）で観測された。

Fig. 8に得られた D と Δ の関係を示す。ただし、制限拡散の程度を比較しやすくするため、 $\Delta=20 \sim 500$ msの条件で測定された拡散係数(D)を、それぞれ $\Delta=20$ msの条件で測定された拡散係数(D_0)で割った値を

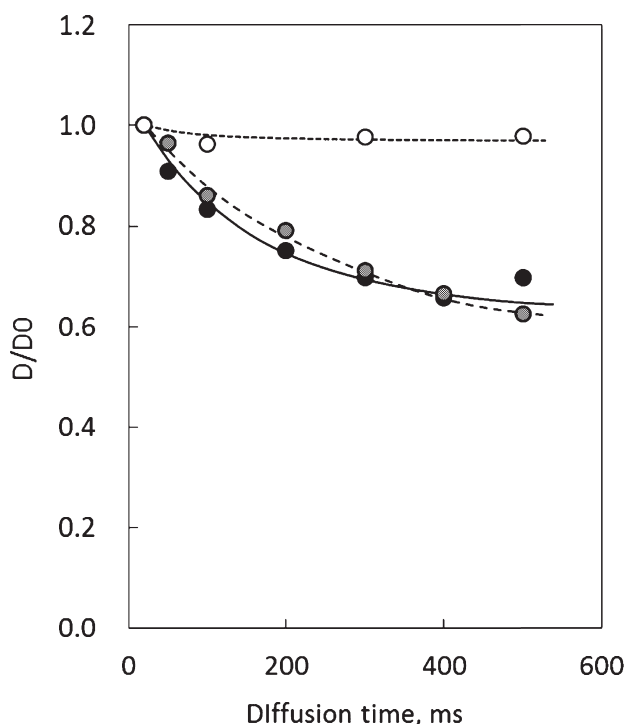


図8：Xeハイドレート形成・解離後のタマネギ組織における水分子の制限拡散程度の変化。生鮮組織（●）；Xeハイドレート（8日間保存）形成・解離後の組織（○）；0.8 MPa窒素分圧内に保存した組織（●）。

Fig. 8 Change of restricted diffusion degree in water molecules of onion tissue before and after Xe hydrate formation and decomposition. Fresh tissue (●); Tissue after Xe hydrate formation (8 d) and decomposition (○); Tissue after pressurized 0.8MPa N_2 pressure (●).

用いた。NMRを用いた拡散係数の測定において、細胞など水分子の自由な拡散が制限される系では拡散観測時間 (Δ) の増加に伴って、見かけの拡散係数が減少し、やがて一定値となる制限拡散現象が観察される。植物や動物組織において、細胞内に水分子の拡散が制限されている場合、この制限拡散現象が観測されることが知られている (Anisimov et al., 1998; Clark and Bihan, 2000; Kinsey et al., 1999)。本研究で使用したタマネギにおいても生鮮組織 (●) で、 Δ の増加に伴って見かけの拡散係数が減少する制限拡散現象が観測された。すなわち、 $\Delta = 20$ ms の時、 D は、 $1.56 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ であったが、 $\Delta = 500$ ms で $1.05 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ となった。このような制限拡散は、 5°C 、 0.8 MPa の N_2 分圧内にて7日間静置された組織 (●)、すなわち、物理的に圧力を付加された環境で保存された組織においても観測された。従って、保存や物理的な圧力付加によって組織中の細胞膜の水透過性に関する機能は変化しないことが示された。

一方、Xeハイドレート形成・解離後 (保存期間7日)、組織 (○) の制限拡散現象はほとんど観察されなくなった。拡散係数は拡散観測時間 (Δ) に関わらず、約 $1.26 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ と一定値を推移していた。このような制限拡散の消失は、生鮮野菜組織を凍結・解凍処理したときに観察されることが知られている。既往の研究によれば、生鮮組織において水透過性の低い細胞膜は、凍結・解凍処理に伴う水移動現象に伴い著しい損傷を受けるといわれている (Ando et al, 2011)。同様に、ガスハイドレート形成・解離処理も、組織内の細胞膜に著しいダメージを与え、細胞膜の機能が低下したため組織の水透過性が増大したと考えられた。

4. 考察

本研究の結果より、 5°C 、 0.8 MPa の Xe 分圧内にてタマネギ組織は、組織内の水を徐々に Xe ハイドレートへと変化させることが確認された。本研究ではその量的な変化だけでなく、組織表面・内部において形成・成長していくことを確認した。既往の研究において、Moudrakovski ら (2004) は、MRI 測定にてイソペンタン中の微小な水滴におけるメタンガスハイドレートの形成過程について報告した。彼らは、水とガスが直接接触することのない系においても、ガスハイドレートは水滴表面より形成し始め、表面より内側に徐々に形成していくことを示した。しかし、液滴サイズが非常に小さい系では、液滴内部より突然、ガスハイドレートが形成する場合もあるとしている。このような W/O 型エマルションは、細胞からなる組織モデルとして凍結保存に関する研究でも使用される形態である (フランクス, 1989)。一方、酸化エチレン (EO) 水溶液を用いたニンジン組織および牛筋肉組織における EO ハイドレートの形成・成

長を観察した結果、ガスハイドレートは細胞の周囲に形成・成長することが示唆されている (Hulle and Fennema, 1971A, B)。そして、彼らは、ガスハイドレートの形成は緩慢凍結時に見られる細胞外凍結と同様に、細胞外より結晶が形成すると考察し、ガスハイドレートが形成・成長することで細胞構造をゆがめるとした。

本研究では試料管に衝撃をあえることで、組織中で Xe ハイドレート核の形成を促す操作を行い、Xe ハイドレートを形成・成長させた。また、タマネギ組織内の細胞のサイズは約 $150 \mu\text{m}$ と大きい。既往の研究の結果やこれらのことを考慮すると、本研究で使用したタマネギ組織では、細胞外部などの細胞膜近傍より Xe ハイドレートの形成が起こったと考えられる。タマネギ組織の MRI 測定において、Xe ハイドレート形成直後の組織に、生鮮組織で観察されたような細胞構造が再び観察された理由は、組織内の細胞膜近傍に微細なハイドレートが形成したためと考えられる。また Xe ハイドレート形成割合の検討より (Fig. 3)、本研究の実験条件である 5°C 、 0.8 MPa の Xe 分圧中では組織内の水の約 50% しか Xe ハイドレートへと変化させることができなかった。既往の研究において、コーヒー水溶液における Xe ハイドレート形成の観察が行われ、Xe ハイドレートの形成に伴いコーヒー成分が濃縮されるという報告がなされた (Purwanto et al., 2001)。従って、タマネギ組織においてもその形成に伴い組織内溶液が濃縮し、Xe ハイドレート形成に必要な温度・圧力の条件が変わったと考えられる。

緩慢凍結における既往の結果を考慮すると (フランクス, 1989)、組織内部において Xe ハイドレートが形成・成長すると組織の細胞構造にゆがみを与えると考えられる。ゆがみの影響は、制限拡散現象の観察によって示された解離後の細胞膜の水透過性の変化として観察された。Xe ハイドレートの解離中、組織から Xe の泡が組織外部へ激しく流出する。そのため、Xe ハイドレート形成・解離後の組織の細胞膜水透過性の増大は、Xe ハイドレートの形成だけによって引き起こされた変化ではないと考えられるが、その形成過程を観察した結果、Xe ハイドレートの形成・成長に伴う影響も大きいと考えられた。

本研究の結果を総合的に考察し、タマネギ組織における Xe ハイドレート形成プロセスを Fig. 9 の様に仮説づけた。低温で、タマネギ組織を Xe 分圧中に静置すると、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へ溶解を始めると共に、ガス分子の溶解によって組織内の水は構造化を始める。ここで振動などの外的刺激が加わると、凍結過程で観察される過冷却解消に似た現象が起こるため、ガス濃度の勾配に従って、細胞内でガスハイドレートの形成が起こる (不均質

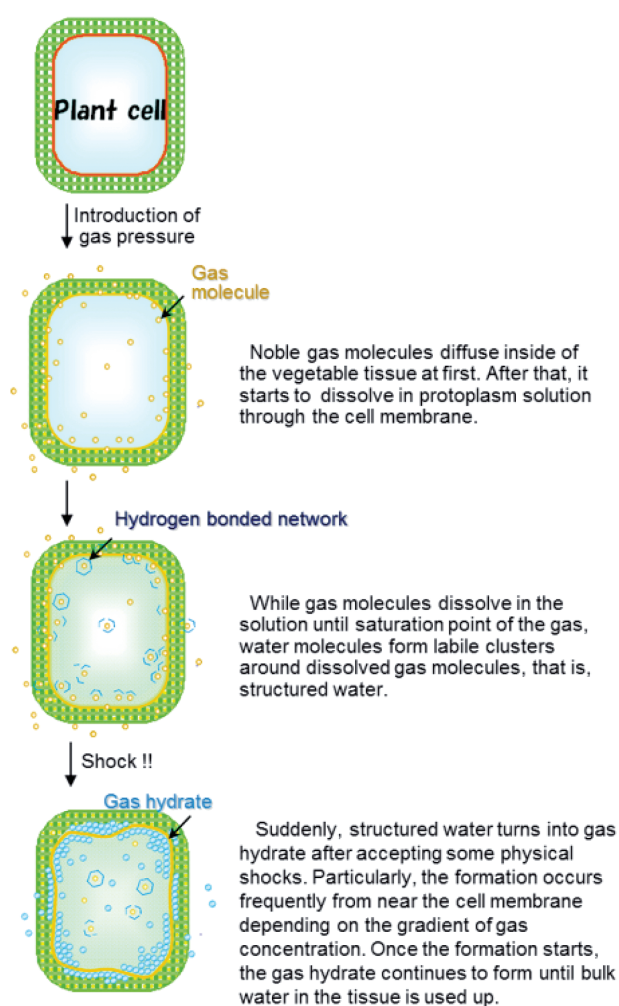


図9：植物組織におけるガスハイドレート形成メカニズムの仮説

Fig. 9 Hypothesis of the gas hydrate formation mechanism in plant tissue.

ガスハイドレート核形成プロセス)。この過程では、ガス濃度の勾配に従って、細胞膜と細胞内溶液界面付近にガスハイドレートが形成されるため、ガスハイドレート形成に伴い細胞膜に対するダメージが生じてしまうと考えられる。しかし、本研究ではプロトンの測定のみを行っているため、Xeが細胞のどの部分に局在化しているかといった情報に言及することはできない。そのため、今後、Xe分子にも着目した検討を行うことで、生体組織におけるガスハイドレート形成プロセスをより詳細に示すことができると考える。

参考文献

- Ando H., Kajiwar K., Oshita S. and Suzuki T. (2011) The effect of osmotic dehydrofreezing on the role of the cell membrane in carrot texture softening after freeze-thawing. *J. Food Eng.*, **108**, 473-479.
- Ando H., Suzuki T., Kawagoe Y., Makino Y. and Oshita S. (2009) Detection of Xenon gas hydrate formation in

onion tissue for the application to chilling temperature storage. *5th International Technical Symposium on Food Processing, Monitoring Technology in Bioprocesses and Food Quality Management*, p3, Germany.

- Anisimov A. V., Sorokina N. Y. and Dautova N. R. (1998) Water diffusion in biological porous systems: a NMR approach. *Magn. Res. Imaging*, **16**, 565-568.
- Cherubini A. and Bifone A. (2003) Hyperpolarised xenon in biology. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, **42**, 1-30.
- Clark C. A. and Bihan D. L. (2000) Water diffusion compartmentation and anisotropy at high b values in the human brain. *Magnetic Resonance in Medicine*, **44**, 852-859.
- Collett T. S., Lee M. W., Goldberg D. S., Rack F. R. and Williams T. (2006) Data Report: nuclear magnetic resonance logging while drilling, ODP Leg 204, "Proceedings of the ocean drilling program. *Scientific results volume 204* (Eds. by Tréhu A. M., Bohrmann G., Torres M. E. and Colwell F. S.)", pp.1-22, ODP, Texas.
- Gribnau M. C. M. (1992) Determination of solid/liquid ratios of fats and oils by low-resolution pulsed NMR, *Trend in Food Science and Technology*, **31**, 186-190.
- Huang C. P., Fennema O. and Powrie W. D. (1965) Gas hydrates in aqueous-organic systems. I. Preliminary studies, *Cryobiology*, **2**, 109-115.
- Hulle G. V. and Fennema O. (1971A). Gas hydrates in aqueous-organic systems. V. Effects of ethylene oxide and ethylene oxide hydrate in animal tissue. *Cryobiology*, **7**, 4-6.
- Hulle G. and Fennema O. (1971B). Gas hydrates in aqueous-organic systems. VI. Effects of hydrate formers and hydrate crystals in carrot tissue. *Cryobiology*, **8**, 91-103.
- Kinsey S. T., Locke B. R., Penke B. and Moerland T. S. (1999) Diffusional anisotropy is induced by subcellular barriers in skeletal muscle. *NMR in Biomedicine*, **12**, 1-7.
- Kleinberg R. L., Flaum C., Straley C., Brewer P. G., Malby G. E., Peltzer E. T., Friederich G. and Yesinowski J. P. (2003) Seafloor nuclear magnetic resonance assay of methane hydrate in sediment and rock. *J. Geophys. Res.*, **108**, 1-13.
- Köckenberger W. (2001) Nuclear magnetic resonance micro-imaging in the investigation of plant cell metabolism. *Journal of Experimental Botany*, **52**, 641-652.
- Moudrakovski I. L., McLaurin G. E., Ratcliffe C. I. and Ripmeester J. A. (2004) Methane and carbon dioxide hydrate formation in water droplets: Spatially resolved measurements from magnetic resonance microimaging. *J. Phys. Chem. B*, **108**, 17591-17595.
- Overloop K. and Gerven L. V. (1993) Freezing phenomena in adsorbed water as studied by NMR. *J. Magn. Res. Series A*, **101**, 179-187.
- Purwanto Y. A., Oshita S., Seo Y., Kawagoe Y. (2001) Concentration of liquid foods by the use of gas hydrate. *J. Food Eng.*, **47**, 133-138.
- Ripmeester J. A. and Ratcliffe C. I. N. (1989) Solid-state

- NMR studies of inclusion compounds. *Res. Counc. Can.*, *NRCC*, 1181-1189.
- Raftery D. (2006) Xenon NMR Spectroscopy, *Ann. Rep. NMR Spec.*, **57**, 207-270.
- Pauling L. (1961) A molecular theory of general anesthesia, *Science*, **124**, 15-21.
- Salon E. D. and Koh C. A. (Eds). (2007) *Clathrate hydrate of natural gases 3rd*, 720pp, CRC press, New York.
- フランク ス F. (村瀬則郎, 片桐千仞 訳). (1989). 低温の生物物理と生化学, 253 pp, 北海道大学図書刊行会, 北海道.