琉球大学学術リポジトリ

無極性ガスを利用したカーネーション切り花の保存に関する研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 琉球大学農学部 公開日: 2008-02-14 キーワード (Ja): カーネーション, 無極性ガス, 保存, キセノンガス, 水の構造化 キーワード (En): Carnation, non-polar gas, preservation, xenon gas, structured water 作成者: 松嶋, 卯月, Matsushima, Uzuki メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/3641

無極性ガスを利用したカーネーション切り花の保存に関する研究

松　嶋　卯　月*

Uzuki Matsushima: Studies on the preservation of cut carnations by applying non-polar gas

キーワード：カーネーション，無極性ガス，保存，キセノンガス，水の構造化
Key Words : Carnation, non-polar gas, preservation, xenon gas, structured water

目　　次

第１章　緒論 ……5
　第１節　本研究の背景 ……5
　第２節　カーネーション切り花の保存に関する研究の概略 ……5
　第３節　無極性ガスによる保存処理に関する研究の概略 ……6
　第４節　本研究の目的および論文の構成 ……7
第２章　切り花からの無極性ガスの脱離速度 ……8
　第１節　緒言 ……8
　第２節　供試ガスと実験方法 ……8
　　1　供試ガス ……8
　　2　脱離速度の解析方法 ……9
　　3　実験方法……10
　第３節　実験結果および考察……12
　　1　実験結果と解析結果の比較……12
　　2　脱離過程と脱離表面との関係……12
　第４節　摘要……13
第３章　切り花内部における水の動的状態……13
　第１節　緒言……13
　第２節　実験方法……14
　　1　供試材料と保存処理方法……14
　　2　^{1}H-NMR による縦緩和時間 T_1 の測定 ……14
　第３節　実験結果および考察……15
　　1　解析方法の検討……15
　　2　縦緩和時間 T_1 ……15
　　3　水の動的状態への影響……18
　第４節　摘要……19
第４章　無極性ガスによる水ストレス抑制効果……19
　第１節　緒言……19
　第２節　中性子イメージングによる水分分布の測定……19
　　1　原理……19

* 琉球大学農学部生物生産学科
琉球大学農学部学術報告　48: 1 ～ 37 (2001)

2 実験方法……20
第3節 実験結果および考察……22
第4節 摘要……24
第5章 無極性ガスによる処理を行った切り花の生理的応答……24
第1節 緒言……25
第2節 供試材料および実験方法……25
1 供試材料およびキセノン処理方法……25
2 キセノン処理条件および実験手順……25
第3節 呼吸速度・水収支計測システム……25
1 呼吸速度・水収支の計測……26
2 チャンバ内の換気および湿度調整……27
第4節 呼吸速度の変化……28
第5節 水収支の変化……29
1 老化の過程と水収支……29
2 無極性ガスによる水収支の変化……30
第6節 本保存法の市場への適用性……31
第7節 摘 要……31
第6章 結 論……32
第1節 本研究で得られた結果……32
1 切り花からの無極性ガスの脱離速度(第2章要約)……32
2 切り花内部における水の動的状態(第3章要約)……32
3 無極性ガスによる水ストレスの抑制効果(第4章要約)……33
4 無極性ガスによる処理を行った切り花の生理的応答(第5章要約)……33
第2節 結論および今後に残された課題……33
謝 辞……34
記 号 表……35
参 考 文 献……35

Summary

Chapter 1

Cut carnations are very popular in the Japanese market. The amount of sold cut carnations in the wholesale market ranked second in 1999. But the demand of cut carnations shows a large seasonal change. Thus the longevity of vase life of cut carnations is a very important problem. Flowers are exposed to water stress, caused by increased water loss and limited water uptake, immediately after picking. Water stress has been shown to accelerate senescence and to reduce the longevity of cut flowers. Thus water status in plant tissue is important to the maintenance of the quality of cut flowers. Most postharvest handling of cut carnations depends on chemicals that is the inhibitor of ethylene action in plant tissue. Attempts of postharvest handling by gene recombination are also reported. However it is supposed that those methods have a negative effect on the environment or human life. Thus the establishment of a safer and more effective preservation method is important.

The authors have studied a preservation method for cut carnation flowers that uses non-polar gas. The dissolution of xenon gas, a non-polar gas, produces a change in water structure to a clathrate-like structure and yields an increase in the number of hydrogen-bonded water molecules.

Since the viscosity of water is closely related to intermolecular potential energy, the increase in hydrogen-bonded water molecules could be interpreted as an increase in water viscosity. This increase in water viscosity could reduce the mobility of intracellular water. Water in this state is called "structured", and "structured water" is the term used to describe water with a large population of hydrogen-bound water molecules. Structured water is supposed to effect the water stress of cut flowers, because it would be closely related to the intermolecular potential of plants. The objective of this study is to investigate the effect of structured water on the intermolecular water of cut carnations, and to derive the possibility of a new preservation method by using non-polar gas.

Chapter 2

Carnation flowers (*Dianthus caryophyllus* L. cv. Francesco) were obtained from a commercial grower in Chiba prefecture and transported in a dry state within 24 h to the University of Tokyo. Upon arrival, the stems was trimmed under water, and the flowers were placed in distilled water. Flowers were kept in a constant temperature room at 293 K in darkness for 24 h. Samples at the same stage of opening were then chosen and the stems were recut to a length of 10 cm. After recutting, samples were placed in a flask with distilled water. Among the non-polar gases that can form structured water, inert gases are the most suitable since they can be expected not to cause biochemical changes in cells because of their low chemical reactivity. Xenon gas was selected to form structured water because it is the most soluble of the inert gases. That is, xenon more readily forms structured water than do the other inert gases. The period of desorbtion process of non-polar gas from cut carnations was investigated. After xenon treatment, the cut carnations were put in normal air pressure. Excessive xenon gas is desorbed from samples. The hydrogen-bond energy of structured water depends on the amount of solved xenon. Thus period of desorbtion process of xenon has a relation to the effect of xenon treatment.

Desorbtion process of xenon obtained to measure the concentration of xenon which desorbed from xenon-treated samples. First, the samples were given treatment with xenon, 0.2 MPa. Then they were kept for 24 hour at 293 K to allow the formation of structured water. At the end of the treatment, samples were set in a gas tight container to measure desorbed xenon from the samples. The concentration of xenon was measured with gas chromatography. Desorption of xenon was completed in about 2 hours. However, the effect of xenon treatment was retained after the desorption. This was due to the small amount of dissolved xenon in intracellular water under atmospheric pressure and also due to the associated xenon adjacent to the hydrophobic group of biopolymer.

Chapter 3

The change of water status in cut carnations which is caused by structured water was examined through spin-lattice relaxation time T_1 of NMR method. In this study, ovaries were used as samples of NMR. T_1 was measured with JEOL pulsed NMR spectrometer(JNM-MU25) operating at 25 MHz. For the T_1 measurement, the saturation recovery method was employed. Cut carnation flowers were divided into 2 xenon-treated groups and a control group. The 2 xenon-treated groups were given either 0.5, 0.7 MPa of xenon. The groups were kept for 24 h at 293 K. At the end of the treatment, ovaries of samples were separated from other tissue and set in NMR tubes.

T_1 of ovaries were obtained the range 0.4s to 0.8s and as time passed, it became longer. During period from 0 h to 48 h, T_1 of xenon-treated samples that were obtained from one term exponential equation were shorter than that of the controls. This result implies that structured water reduces

water mobility in xenon-treated samples. By analysis of 2-term exponential equations, both the xenon-treated and control samples showed two components with different relaxation times, that is, a short relaxation time T_1a and long relaxation time T_1b. The range of T_1a was 0.1s to 0.4s and T_1b was 0.4s to 0.8s. The hydrogen-bond energy of component T_1a would be stronger than component T_1b. As time passed, T_1b of controls became longer. On the other hand, T_1b of xenon-treated samples did not show remarkable change. The ratio of both long and short components was also obtained by NMR signal intensity of each component. In the samples of control, T_1b showed remarkable change. But the change of T_1b of xenon-treated samples was not clear. The change of the ratio of both components would indicate water movement through a membrane between two components. The result indicated that xenon treatment suppressed water mobility through the membrane.

Chapter 4

The effect of non-polar gas on water stress of cut carnations was investigated. Water stress has been shown to accelerate senescence and to reduce longevity of cut flowers. Dissolution of a non-polar gas is expected to increase water viscosity. This increase in water viscosity could reduce the mobility of intracellular water. Water stress is the result of water transpiration from cut flowers, which itself is closely related to the intracellular structured-water. Cut carnations were divided into 3 xenon-treated groups and a control group. The 3 xenon-treated groups were placed into pressure containers respectively and were given either 0.5, 0.6 or 0.7 MPa of xenon. The groups were kept for 66 h at 293 K to allow the formation of structured water. At the end of the treatment, all samples were placed under dry conditions for 24 h. Neutron radiography was carried out to observe the water status of the cut carnations. Water distributions of the samples show different water status between the xenon-treated sample and the control. Before water supply, the water amount in the xenon-treated samples was significantly larger than that in the control. After water supply, the increase in the amount of water was greater in the xenon-treated samples than in the control. These results suggest that xenon treatment not only helps retain water in samples but also maintains water uptake levels in cut carnations.

Chapter 5

The effect of non-polar gas on postharvest life of cut carnation was evaluated. Transpiration rate and water up-take rate, respiration rate were measured to estimate metabolism of cut carnations. Cut carnations were divided into xenon-treated group and a control group. The xenon-treated group given 0.5 MPa of xenon. They were kept for 24 h and 48 h at 293 K. At the end of the treatment, both groups of samples were set in gas tight chamber of the measuring system. The system was placed in constant temperature room in darkness. Air humidity in the system was modified at 54%RH.

Climacteric maximum of the xenon-treated samples was exhibited after 10 to 11 days of harvested. The vase life was 3 to 4 days longer than the average vase life. When the respiration rate showed climacteric rise, the water up-take rate decreased and the transpiration rate increased. It is due to a decrease of turgor pressure in plant cell because of increased membrane permeability. In the xenon treated samples, the transpiration rate was larger and the up-take rate was smaller than that of the controls. Thus the reduction of water in xenon-treated samples was smaller than that of the controls. The result suggested that suppression of water stress in xenon-treated samples caused a delay of climacteric maximum and longer vase life.

Chapter 6

In this study, the effect of non-polar gas for longevity of cut carnation was a reduction of water

stress due to the suppression of water movement by structured water. Thus the method would be effective for cut flowers which have been damaged by water stress.

In chapter 2, desorbtion of xenon gas ended after about 2 hours. But in other chapters, the effects of xenon treatment appeared over 24 hours. It implies that the effects of xenon treatment appears when samples given xenon lower pressure than that in this study.

For commercial use, the high cost of xenon would be a big problem. In the next step, developing an optimum treatment method and finding a low cost gas are important.

第1章　緒　　論

第1節　本研究の背景

切り花の老化過程は萎凋、器官離脱、退色等様々な現象が関係した複雑なものである。また開花した花は代謝が活発な器官であり、そのため生産、流通過程での取り扱いが困難な農産物の一つであると考えられる。また、収穫後の切り花の寿命は一般に短く、販売後に鮮度が維持される期間は通常3日から5日といわれている。よって、その期間の延長は、小売店での販売上有利に働く。その切り花の中でも、特にカーネーションは、平成9年度においては、キクに次いで花卉中で第2位の生産量を占めている人気花卉であり[33]、かつ、市場における需要の季節変動が激しいため、小売店での店持ちの延長が望まれている。またカーネーション切り花はエチレン感受性花卉であり、その萎凋のメカニズムにはACC合成酵素など数種の酵素が働くことが知られている[40]。現在、エチレンによる萎凋作用の阻害物質であるSTS（チオ硫酸銀アニオン複合体）は、品質保持剤として広く用いられている。しかし、その主成分である銀イオンが、生活環境に悪影響を及ぼす可能性がある[12]。また、STS剤はエチレン発生の抑制にはなるが、鮮度を保持する効果はない[14]。よって、より安全で、鮮度保持に有効な代替保存法の確立が望まれている。

第2節　カーネーション切り花の保存に関する研究の概略

カーネーション（*Dianthus caryophyllus* L.）は、ナデシコ属（*Dianthus L.*）の一種で多くの園芸品種が作出されている。原種は草丈で40cmから50cmになり、葉は対生し、上部で分枝して数個の花を付け、その下に2対の苞葉がある。花は5片の萼片が癒合した筒状の萼と、5個の花弁、5個の雄しべ、2分岐する花柱を持つ。しかし、現在のカーネーションのほとんどが重弁花である[1]。図1に本研究で使用したカーネーション（品種：フランセスコ）を示す。

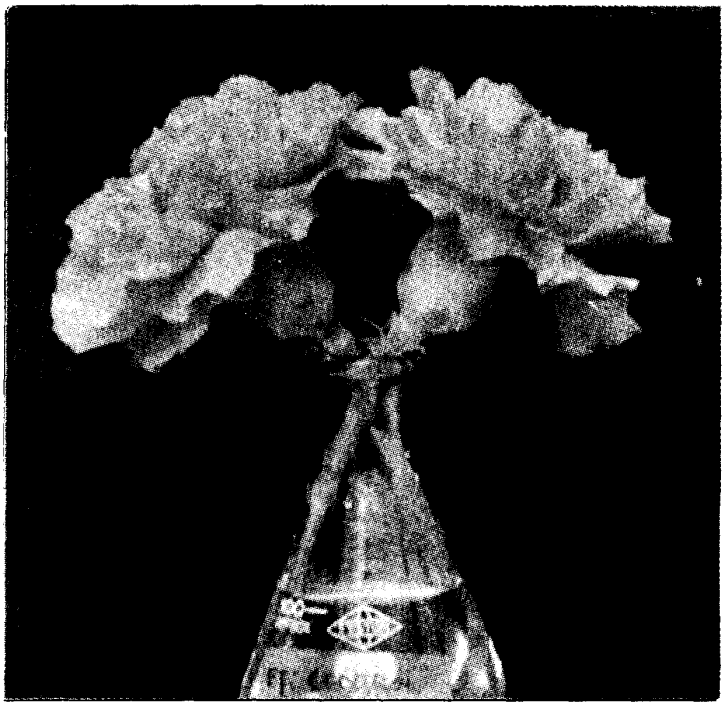


図1　カーネーション（品種：ランセスコ）

カーネーション切り花の保存に関しては、これまでに様々な研究がなされ、多くのデータが蓄積されている。カーネーションはエチレン感受性の花卉であることから、早くから貯蔵条件とエチレン発生に関する研究が行われた。Nichols[31]，およびMaxieら[25]が、カーネーション切り花保存中の

種々の温度環境における呼吸代謝およびエチレン発生の関係を明らかにした。さらに、カーネーション切り花におけるエチレン発生のメカニズムを明らかにする研究が行われた。Mayak ら[28]がエチレン発生の増加が液胞膜透過性の上昇を伴い、それによって萎凋が引き起こされるという結果を示し、エチレン発生と切り花の萎凋についてのメカニズムの一端を明らかにした。カーネーションとエチレンに関する研究は、その後も数多く行われ、数種類の化学物質がエチレンの生合成を抑制することが明らかになった[3),9)]。さらに、近年エチレンの発生を遺伝子のレベルで抑制する試みがなされている[38)]。

切り花の鮮度は、その水収支および水分状態によっても大きく左右される。それに関して、導管閉塞による水揚げの悪化については、Mayak ら[27]が、カーネーションの保存において、硝酸銀水溶液による処理はバクテリアの増殖を防ぐために効果的であると述べた。続いて、Jones ら[18]らは、カーネーションはバラよりも、バクテリアによる導管閉塞に対する耐性が強いことを明らかにした。また、導管閉塞による水揚げの悪化、あるいは乾式輸送などによって発生する水ストレスに関しては、Borochov ら[4]が水ストレスによって ACC が増加し、エチレンによる萎凋の原因となることを示した。

現在までのカーネーション保存に関する研究では、エチレンの発生をいかに抑えるかに重点が置かれてきた。また、保存法の多くは化学的手法に頼っており、近年では遺伝子組み替えも試みられている。しかし、環境保全の重要性や遺伝子組み替えの安全性に対する社会的不安を考慮に入れると、現行の保存法には限度があると思われる。今後は、何らかの安全な手法を用いた保存法の確立が必要であると考えられる。

第3節　無極性ガスによる保存処理に関する研究の概略

近年、新しい保存法として無極性ガスの利用が検討されている。無極性ガスによる保存は、疎水性水和を利用したものである。疎水性水和によるクラスレート水和物の研究は、19世紀初頭に始まり、現れる結晶は、水分子が作るホスト格子に疎水性の分子、すなわち無極性分子がゲストとして包接されたクラスレートであること、ゲスト分子が適切な大きさであれば構造が安定化すること等が明らかにされた[2)]。図2にクラスレートを構成する水の多面体形状を示す。これらクラスレートは結晶状であるが、クラスレートを形成しない溶解度にあっても、その周りの水分子は動きにくくなり、構造化の程度が増す[44)]。図3は、$(C_4H_9)_4NOH32H_2O$ というクラスレート化合物を形成する *t*-ブタノール水溶液中の各成分の自己拡散係数を示す[45)]。上平[45)]は、水の自己拡散係数は *t*-ブタノールのモル分率 x_s が0.3以下の領域で急激に減少したのは、ブタノールの3つのメチル期の周りでクラスレート型の水和圏が形成され、水分子の熱運動が遅くなるためであると述べた。このような構造化した水では熱運動が束縛され、水の生体反応に何らかの影響を及ぼすと考えられている。それに関して、Pauling[39)]は疎水性気体による麻酔作用はその溶解によって引き起こされると考えた。また、Schreiner らは、ヒーラ細胞に数種類の無極性ガスを加圧して溶かすと、細胞の増殖が阻害されることを明らかにした[5)]。大下ら[37)]は、無極性ガスのキセノンをオオムギ子葉鞘細胞に加圧して溶解させ、その原形質流動を観察した。その結果、ガスの溶解によって原形質流動速度が低減し、ガス分圧の増加に

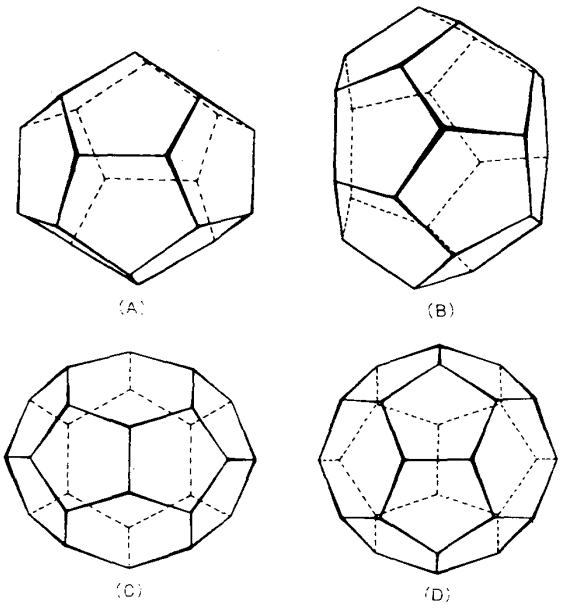


図2　クラスレートを構成する水の多面体造[15)]
(A)12面体 5^{12}　(B)14面体 $5^{12},6^2$
(C)15面体 $5^{12},6^3$　(D)16面体 $5^{12},6^4$

よって構造化の程度が増すと、原形質流動速度の低減が顕著になることを示した。さらに、その効果をブロッコリの貯蔵に応用したところ、酵素反応によって起こるブロッコリ試料の切断面の褐変が防止されたことを認め、その作用を水の構造化による酵素活性の抑制であるとした[36]。続いて、橋本ら[10]は、キセノンガスを加圧して溶解させたモヤシにおいて、その変色および付着細菌の増殖が抑制される結果を得た。また、オレンジキャンドル種のカーネーション切り花に24時間キセノンガスを加圧して溶解させた処理を行った例では、カーネーション切り花の萎凋時に見られるクライマクテリック上昇が確認されず無処理の試料と比較して花持ちが延長した[34]。

以上の研究成果より、無極性ガスによる水の構造化は、カーネーション切り花も含めた生物の生理的活性を抑える働きを持つと考えられる。

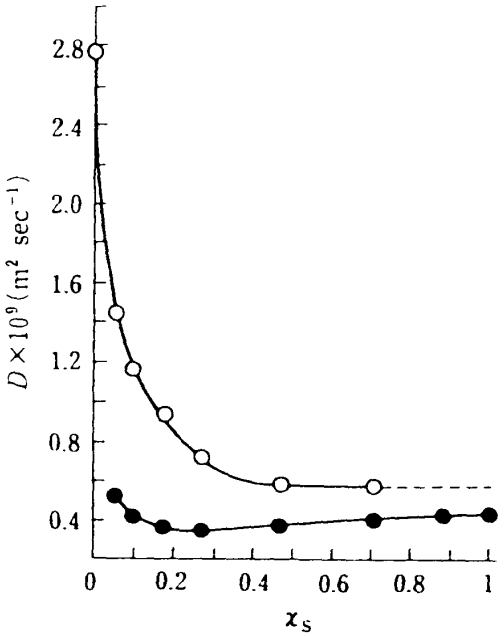


図3　32℃における*t*-ブタノール水溶液中の各成分の自己拡散係数[16]
○：水の自己拡散係数，
●：*t*-ブタノールの自己拡散係数

第4節　本研究の目的および論文の構成

先に、無極性ガスによる水の構造化は水の分子運動を遅くすることを述べた。農産物の鮮度保持効果は、水の分子運動の遅れが生体反応に影響を与えて起こると考えられている。しかし、水の分子運動の遅れは農産物内の水移動の変化をも伴うと思われる。さて、切り花の鮮度がその水分状態によって影響を及ぼされることを考慮すると、水の構造化による水の分子運動の抑制によって、先に述べた生物の生理的活性を抑える効果が現れると考えられる。そこで、本論では主として、切り花内の水移動の変化という観点から、無極性ガスによる水の構造化の鮮度保持効果を解明することを目的とする。

また、無極性ガスは化学的に不活性であるため、STSをはじめとする切り花に使用されている化学物質等と比較して環境への影響が少ないという利点もある。その、無極性ガスによる鮮度保持効果を検討するためには、次の点を解明する必要があると考えられる。切り花は、小売店での保存後に消費者によって直ちに消費される生鮮食料品とは異なり、保存後の効果の持続時間が長い程良いとされる。そのため無極性ガスによる保存では、切り花体内に無極性ガスが留まる時間および効果の持続時間を明らかにする必要がある。また、切り花は内部での水移動が盛んであるが、水の構造化が内部の水移動に与える影響は鮮度保持効果を検討する上で重要である。更に、構造化による水移動の変化が切り花の水収支に与える影響および呼吸代謝の変化、切り花の花持ちを求めることで無極性ガスによる処理の市場への適用性が明らかになると考えられる。

そこで、本研究では次の3つを目的とした。

1. 無極性ガスによる処理後のガスの滞留時間を明らかにするために、カーネーション切り花内部における無極性ガスの存在状態を把握する。
2. カーネーション切り花内部の水の状態に対して働く無極性ガスの影響を明らかにする。
3. 無極性ガスによる水の状態変化が、カーネーション切り花の水収支および呼吸代謝に与える影響を明らかにする。

本文は全6章で構成されており、各内容を以下に示す。第2章の目的は、切り花内部における無極性ガスの存在状態を把握することとした。第3章は、無極性ガスによる処理と切り花内部の水の動的状態

との関係を明らかにするために、^{1}H-NMRによる縦緩和時間の測定を行った結果を示した。第4章では、実用上の問題である水ストレスを与えられた切り花に対する効果について検討した。第5章では、切り花に本保存法を適用するために、試料の生理的状態に与える影響を明らかにすることを目的とし、本保存法を行った試料の呼吸速度と水収支の計測を行った結果を示した。第6章では、本論で得られた結果と今後に残された課題について言及した。

第2章　切り花からの無極性ガスの脱離速度

第1節　緒言

これまで、ガス分圧0.5MPaおよび温度283Kでキセノン処理したカーネーション切り花において、水の構造化による処理後にクライマクテリック上昇が現れなかったという研究報告がある[34]。このような水の構造化による切り花の鮮度保持効果を得るためには、一定量の無極性ガスを切り花内部に溶解させる必要がある。保存処理が終了した後、切り花は常圧に置かれるが、高い無極性ガス分圧から通常の大気下に移されるため、溶けきれなくなった無極性ガスは切り花から脱離する。切り花内の水への無極性ガスの溶解度が低いと、水の構造化の度合いが減るため、無極性ガスが切り花から脱離することによって鮮度保持効果が弱まると考えられる。すなわち、脱離過程が鮮度保持に影響を与えることが推察されるため、ここでは、試料からの無極性ガスの脱離速度を明らかにすることを目的とした。

第2節　供試ガスと実験方法

無極性ガスの脱離過程は、その溶解の状態、あるいは、切り花の形状および表面積、含水率等によって変化することが考えられる。本実験では、モデルとして水を用い、その水面の面積を変えて脱離速度を求め、カーネーション切り花の脱離過程の比較を行った。脱離速度はキセノン処理後に各試料から脱離するキセノン濃度を測定することで求めた。

1　供試ガス

無極性ガスは、極性を持つ水に対して溶解しにくい性質を持つ。そのため常圧における水への溶解度は低く、疎水性水和によるクラスレートを形成させるときには無極性ガス分圧を高くする必要がある。表1に疎水性水和によるクラスレートを形成する代表的な無極性ガスの溶解度を示す[2),24)]。無極性ガス処理を行う際、水に対する溶解度が比較的高い無極性ガスは、供給するガス分圧が低くなるため、より水に溶解しにくい気体と較べて取り扱いが容易である。また、二酸化炭素あるいはメタンなどは無極性ガスであるが、その溶解によって化学反応が起こり、生体に悪影響を及ぼす可能性がある。その影響を回避するために、鮮度保持には科学的活性の低い不活性ガスが適していると考えられる。そこで本研究では、表1に示されるように不活性ガスでもっとも溶解度が高い気体であるキセノンを供試ガスとして使用した。以下、無極性ガス処理をキセノン処理とする。

表1　無極性ガスの溶解度

Gas		$10^5\ \chi_L$
Helium	He	0.704
Neon	Ne	0.840
Argon	Ar	2.748
Krypton	Kr	5.041
Xenon	Xe	9.051
Oxygen	O_2	2.756
Nitrogen	N_2	1.274
Methane	CH_4	2.806
Ethane	C_2H_6	3.907
Propane	C_3H_8	3.200
Butane	C_4H_{10}	2.687

T=293.15K

Partial Pressure of the gas = 101.325 kPa (one atmosphere)

水に対するキセノンの溶解度は、キセノンガス分圧と温度に依存するため、水の構造化の程度もそれ

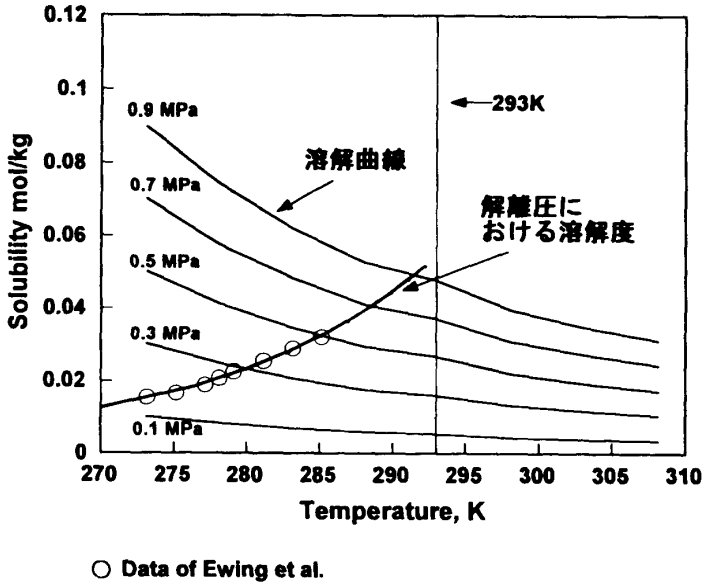


図4　水に対するキセノンの溶解曲線と解離圧における溶解度

によって変化する。クラスレートは氷状の結晶であるため、植物体内にクラスレートが形成された場合は生体組織の凍結による傷害同様の悪影響が予想される。しかし、溶解度が低い場合には、植物体内における水の構造化の程度が弱まり、鮮度保持効果が発揮されない可能性がある。図4に水に対するキセノンの溶解曲線と解離圧における溶解度を示す。任意の温度における溶解度は、式(2-1)および温度T=298Kにおける溶解度x_2より求めた[32]。

$$\ln x_2 = 0.788 - \frac{74.7398}{(T/100)} + 105.210 \cdot \ln\left(\frac{T}{100}\right) \quad (2\text{-}1)$$

なお、式(2-1)における温度Tの適用範囲は273Kから350Kである。また、任意の圧力における溶解度は、ヘンリーの法則より求めた。ヘンリーの法則では、溶解度が小さく溶媒と反応しない気体の場合、圧力のあまり高くない範囲では一定温度での溶解度は分圧に比例する。図4は、ある温度および圧力の溶解度が、解離圧における溶解度を表す曲線を超えて大である場合、クラスレートが形成されていることを示す。解離圧における溶解度は、Ewingら[6]の温度と解離圧の関係のデータ（表2）から計算して求めた。図上の○は、Ewingら[6]のデータによる値を示す。本研究でのキセノン処理は、室内での花持ちを考慮に入れ常温の293Kすなわち20℃で行った。図4より、キセノンは293Kで水に溶解するとき、ガス分圧が約1MPa程度で解離圧となり、それ以下のガス分圧ではクラスレートが形成されないと推察される。そこで、本研究ではクラスレートが形成されないと考えられる0.7MPa以下のキセノンガス分圧を用いて実験を行った。

表2　Ewing[4]らによるキセノンの解離圧

Dissociation Pressure of Xenon-Water Clathrate

Temperature, K	Pressure×10^{-1}MPa
273.15	1.54±0.00
275.15	1.79±0.00
277.15	2.20±0.01
278.15	2.51±0.01
279.15	2.83±0.00
281.15	3.42±0.01
283.15	4.17±0.01
285.15	4.96±0.00

2　脱離速度の解析方法

閉じた系内に置かれた試料からキセノンガスが放出されるとき、系内の空気が常に撹拌されるならば、試料周囲にキセノンガスの濃度勾配は生じない。そのとき、溶解したキセノンガスの移動が速やかに行われ、常に、試料中に一様に分布していると仮定すれば、脱離過程は、試料表面におけるガスの脱離速度が律速因子になると考えられる。そこで、脱離の結果として放出されるキセノンを化学反応によって消費された原系物質とみたて、その速度定数を求め、脱離過程の指標とした[23]。

ある反応

$$A \rightarrow P \quad (2\text{-}2)$$

がおこるとき、ある瞬間に原系物質の濃度が [A] であるとするとき、消費速度は反応速度を v として、

$$v=-\frac{d[A]}{dt} \tag{2-3}$$

で表せる。v は速度定数 k をもちいて一般に次の式となる。本論では k を脱離速度とする。

$$v=k[A]^n \tag{2-4}$$

濃度に付いたべき乗は、実験的に得られる反応次数であり、整数のみならずどのような値も取りうる。

生成物とみなす試料から周囲に放出されたキセノンの濃度を C、平衡濃度を C_e、時間を t とすると、原系物質とみなすキセノン濃度の変化速度は

$$\frac{d(C_e-C)}{dt}=-k(C_e-C)^n \tag{2-5}$$

となる。ただし、初期条件 $t=0$ のとき $C=0$ である。ここで、先に述べたようにべき乗 n は、系の様々な要素を含んだ実験的に得られる値であるが、拡散が律速である場合、1次あるいは2次となることが知られている。本実験系においても律速は拡散であると考えられた。そこで、$n=1$ である1次反応と $n=2$ である2次反応の解を求めた。

$n=1$ のとき

$$C=C_e\{1-\exp(-kt)\} \tag{2-6}$$

$n=2$ のとき

$$C=C_e\left(1-\frac{1}{C_e kt+1}\right) \tag{2-7}$$

この両式を実験結果に対する非線形回帰式として用い、誤差の少ない反応次数を試行錯誤的に求めた。

3　実験方法

（1）キセノン処理方法

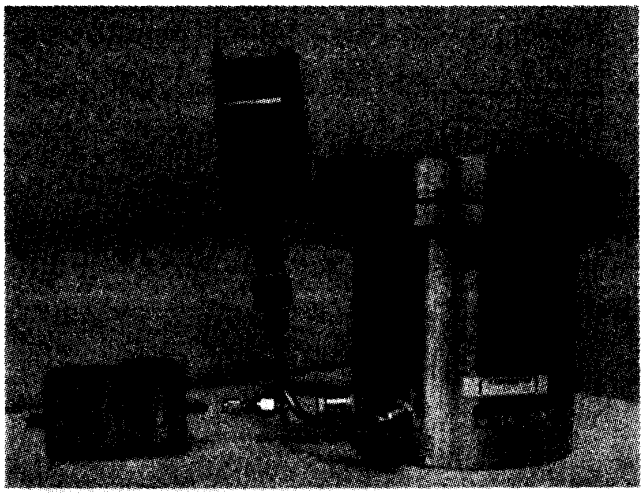


図5　耐圧容器とプレッシャーモニタ

キセノン処理用の耐圧容器は、内容積 2.1l、耐圧 2MPa のステンレス製である。耐圧容器に試料を入れて密閉した後、キセノンガスボンベを接続し、容器付属のニードル弁を開いてキセノンを圧入した。その結果、容器内のガス圧は、大気圧と圧入したキセノンガスの和となった。耐圧容器内のガス圧は、すべてプレッシャーモニタ (PM222, GLサイエンス) で測定した。図5に耐圧容器とプレッシャモニタを示す。一定時間所定のキセノンガス分圧下でキセノン処理を行った後、大気圧に復圧した。復圧は耐圧容器に付属したニードルバルブを開き約2分間でおこなった。

（2）カーネーション切り花の調製

供試材料として、市販のカーネーション切り花（学名：*Dianthus caryophyllus* L., 品種：フランセスコ）を使用した。切り花の花柄を約55cm残して水切りし、温度設定20℃の恒温室内において植物育成灯下で24時間水揚げを行った。水揚げ後に開花状態を観察し、花弁が開き雄蕊が外部から見える前段階にあり同じ生育ステージであると思われる個体を供試した。また、無極性ガスによる処理の直前に花柄を約10cmに切りそろえた。

（3）実験区およびキセノン処理条件

式(2-6)あるいは式(2-7)を脱離の速度式として速度式の次数を検討するために、容量100m*l*のビーカ中の蒸留水50m*l*を供試材料としてキセノン脱離過程を得る実験を行った。キセノン処理条件はキセノンガス分圧0.7MPa、温度20℃、処理時間24時間である。復圧中に進むキセノン脱離の影響をなるべく少なくするには短時間で復圧する必要性があるため、約2分間で復圧を行った。

続いて、脱離の表面積とキセノン脱離過程の関係を明らかにするため、2つの異なる脱離の表面積における水からのキセノン脱離過程を得る実験を行った。水面の表面積を変えるために、50m*l*の蒸留水を2枚および5枚のプラスチック製シャーレの中に等分配した。蒸留水を入れる容器は直径90mm高さ9mmのシャーレ5個を垂直方向に20mm間隔で重ね、それぞれ支持部で左右から支持した。その結果、水面の表面積は127cm^{2}と318cm^{2}となった。測定に使用したシャーレと支持台を図6に示す。キセノン処理条件は、キセノンガス分圧0.2MPa、温度20℃、処理時間24時間、また復圧時間は約2分間である。

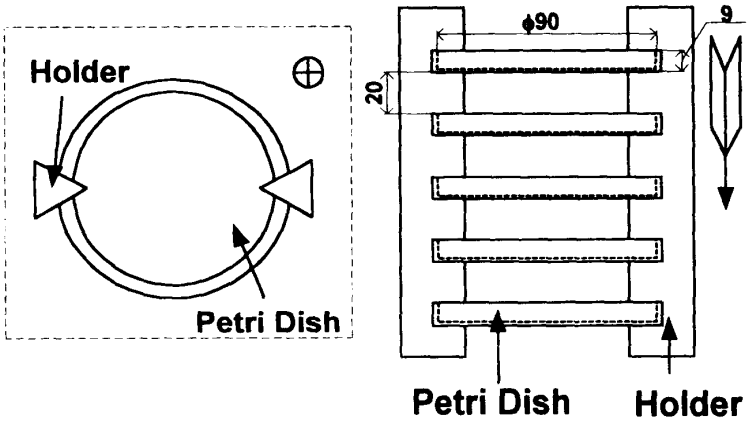


図6　シャーレおよび支持台

カーネーション切り花からのキセノン脱離過程を得る実験では、1回の実験に使用する試料は3個体とし、三角フラスコ内に蒸留水を入れ、茎の基部から3cm程度浸漬するよう挿入した。キセノン処理条件は2種類の表面積における水からの脱離過程の実験と同様とし、復圧も約2分間で行った。復圧時間に関しては、予備実験を行い2分間という短時間で復圧を行っても植物細胞に影響を及ぼさないことを確認した。

（3）キセノン濃度測定

各実験のキセノン処理は、前述の手順にしたがって行った。復圧後、試料から脱離したキセノンガス濃度を測定するため、試料を図7に示した測定用容器内に移した。容器の諸元は、内容積2.1*l*、内径130mm、深さ160mmである。容器内ガスの濃度勾配をなくすため、容器の底から80mmの場所にファンを設置した。シリンジで採取したキセノンガスの濃度をガスクロマトグラフィ（GC-14B, 島津製作所）を用いて測定した。カラムにはガスクロパック54（GLサイエンス）を用いた。脱離過程の測定終了後、カーネーション切り花の含水率は炉乾法(105℃, 24時間)で、表面積は、花弁、

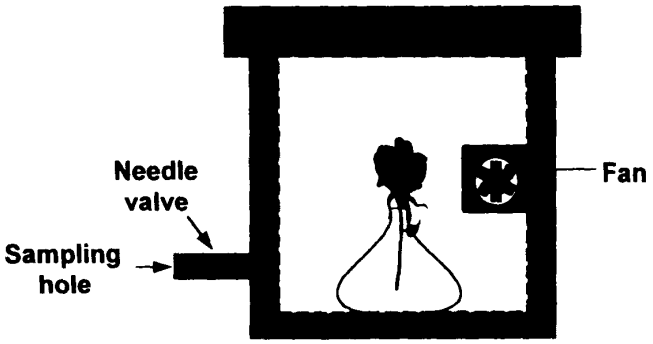


図7　キセノン濃度測定用容器

葉、萼片毎に画像処理システム (PIAS LA-500, ピアス) を用いて測定した。本画像処理システムは、試料と背景の白黒画像から得られる濃淡を二値化し試料面積を求めるものである。

第3節　実験結果および考察

1　実験結果と解析結果の比較

はじめに、式 (2-6) あるいは式 (2-7) が脱離の速度式として妥当であるかを検討した。図8は、ビーカ中の蒸留水 50m*l* を供試材料としてキセノン脱離過程を得た実験結果である。●は累積キセノン放出量の経時変化を示し、実線が式 (2-6) と式 (2-7) を用い最小二乗法により求めた非線形回帰の結果である。また、図中に脱離速度 *k* および分散 *V* を示す。回帰値に対する実測値の分散を比較すると式 (2-7) が式 (2-6) よりも実測値とよく一致するため、反応次数は2次が適すると判断された。

カーネーション切り花からのキセノン脱離過程を得る実験は計4回行った。図9に代表的な結果を示す。水からの脱離過程と同様、式 (2-6) と比較して式 (2-7) でより良く近似され、反応次数は2次が適するという結果を得た。反応次数の一致が必ずしも反応過程の物理現象の一致とはいえないが、ここではカーネーションからの脱離過程は、水と同様に単純な界面からの脱離過程であると仮定し、水およびカーネーションの脱離速度と表面積の関係について比較検討を行った。

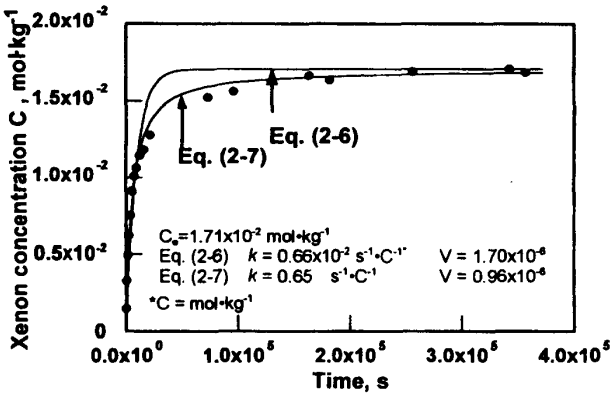


図8　水からの脱離過程

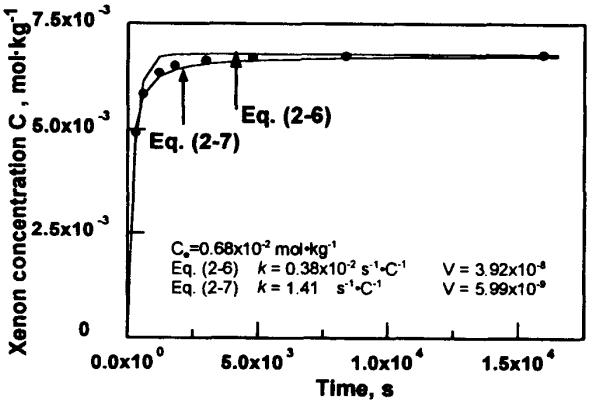


図9　カーネーションからの脱離過程

2　脱離過程と脱離表面との関係

表3に、カーネーションおよび水における脱離過程の指標を示す。ここで脱離表面積とは、単位水分量当たりのカーネーション切り花の表面積および水面の面積とする。脱離過程がほぼ終了したと思われる測定容器内の濃度が平衡濃度の98%に達するまでの時間は長くても2時間から3時間の間であった。図10に、脱離表面積と脱離速度の関係を示す。実線は、水からのキセノン脱離速度のプロットに対して、原点0を通る直線回帰を行ったものである。その直線に対し、11月、12月収穫の試料は近傍にプロットされた。しかし、2月収穫の2例は1/3程度の低い値を示した。すなわち11月、12月収穫の試料では水と同傾向を

表3　カーネーションおよび水における脱離過程の指標

	Surface area for desorption* $cm^2 \cdot g^{-1}$	rate constant $s^{-1} \cdot C^{-1}$	Desorption time** h
carnations			
Nov.	76.15	1.41	0.98
Dec.	84.31	1.46	1.42
Feb.-1	77.19	0.51	2.27
Feb.-2	78.12	0.55	2.15
Distilled	2.5	0.05	--
Water	6.4	0.12	--

* Surface par unit volume of water
** Desorption time was defined as xenon concentration in the container reached 98% of final concentration.

示すのに対し、2月収穫のカーネーションでは脱離の過程で何らかの抵抗が働いたことを示唆する。これは、キセノンの脱離がカーネーションの表面積にのみ依存するのではなく、気孔開度や細胞膜の透過性などの生理的状態にも関係があることを示すと考えられる。すなわち、測定で得られた切り花の表面積は、見かけの脱離表面積であり、実際には生理的状態を要素として含んだ真の脱離表面積があると推察される。12月から2月の間は、カーネーションの端境期であった。11月、12月収穫の試料は、茎が細いため花持ちが悪く、キセノン濃度の測定中に萎凋した。逆に2月収穫の試料は花持ちがよかった。このことより、2月収穫の試料は、花持ちが良く細胞膜の機能が長く維持されたため真の脱離表面積は小さくなり、11月および12月収穫の試料は、花が劣化し細胞膜の機能が低下した結果、真の脱離表面積が大きくなったと思われる。

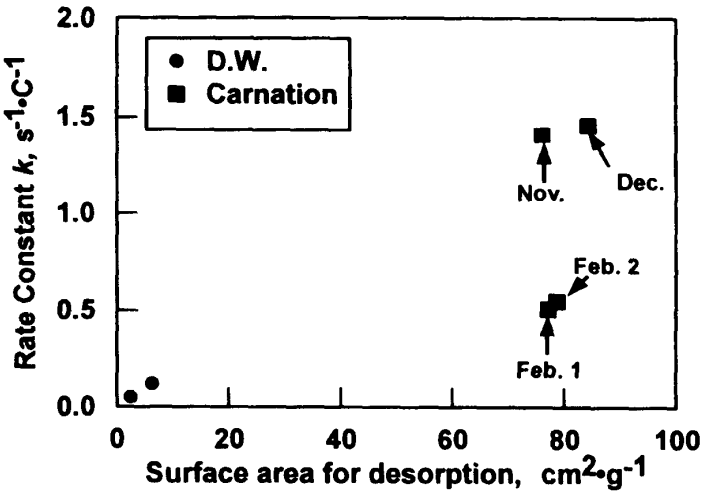


図10 脱離表面積と脱離速度の関係

以上のように、カーネーション切り花からのキセノン脱離過程はその生理的状態によって変化しうることが明らかになったが、脱離に要する時間は長くても3時間程度であった。よって、キセノン脱離過程の終了後は、大気圧下において、水に飽和して溶解しているキセノン、および、生体高分子の疎水基近傍で会合しているキセノンが試料内に残留すると考えられた。

第4節 摘要

無極性ガスの脱離過程は、カーネーション切り花の鮮度保持に影響を与えることが推察される。そこで、試料からの無極性ガスの脱離速度について検討した。

カーネーション切り花および水からのキセノン脱離過程は、いずれも2次の反応速度式で回帰された。そのため、切り花からの脱離過程を水と同様の単純な界面からの脱離であると仮定し、両者の比較をおこなった。水からの脱離速度は、脱離表面積に比例した。一方、切り花の脱離速度は、脱離表面積に対して、水に近い比例関係にある例と、その約1/3程度低い値である例が見られた。両者の差は、切り花の生理的状態によって脱離する表面の状態が変化するためと考えられた。切り花の脱離過程は2時間から3時間の間でほぼ終了した。よって、その後のキセノン処理の効果は、大気下において、水に飽和して溶解しているキセノン、および、生体高分子の疎水基近傍で会合しているキセノンによると考えられた。

第3章 切り花内部における水の動的状態

第1節 緒言

第2章において、水の構造化の程度に関係が深いキセノンの脱離は約2時間から3時間の間でほぼ終了することが明らかになった。キセノン処理によってカーネーション切り花の花持ちが長期化した報告[34]を考慮すると、その後のキセノン処理の効果は、大気圧下において水に飽和して溶解しているキセノン、および生体高分子の疎水基近傍で会合しているキセノンによると考えられる。そのため、キセノン処理後に現れた保存効果と切り花内の水の構造化の程度との関係は、無極性ガスによる保存処理の持続時間やメカニズムを明らかにする上で重要であると考えられる。水の構造化は、切り花内の水の動的状態に影響を及ぼすと考えられるが、近年、植物体内の水の動的状態は^{1}H-NMRを用いて測定されるプロトンの

緩和時間 T_1 と関係深いことが明らかになってきた[21]。すなわち、切り花内の水の縦緩和時間 T_1 を得ることで、水の構造化による影響を求めることができると思われる。そこで、本章では無極性ガスによる保存処理が切り花内の水の動的状態および生理的状態にどのような影響を与えるかを明らかにするために、キセノン処理を行った切り花と未処理の切り花の縦緩和時間 T_1 を比較した。

第2節　実験方法

1　供試材料と保存処理方法

供試材料には、第2章と同一品種のカーネーション切り花を用いた。生産農家で採花された供試材料は、1日間の輸送で実験室に到着した後に第2章と同じ調整を施された。実験には同じ生育ステージにあると思われる個体を供試した。

まず、実験区としてキセノン処理0.5MPa区と0.7MPa区および対照区を用意し、それぞれ3個体づつ供試した。キセノン処理には第2章と同じ耐圧容器を使用した。キセノン処理は、キセノン分圧0.5MPaおよび0.7MPa、処理温度は20℃、処理時間は24時間で行った。その後、復圧は耐圧容器に調圧弁（6700A, KOFLOC）と流量計（RK-1250, KOFLOC）を接続し、圧力、流量一定下に調整し復圧を行った。その際のガス放出量は、45ml・min^{-1}であった。

2　^{1}H-NMRによる縦緩和時間 T_1 の測定

（1）NMR用試料

一般に、NMRによる測定では、使用する装置によって試料の大きさが制限される。実験に使用したNMR装置（JNM-MU25, 日本電気）では、使用可能な試料管の外径は10mmであり、カーネーション切り花を完全な状態で試料管内に入れることは、不可能である。また、NMR装置の検出器に入る信号強度は試料にあるプロトンの数に依存しており、試料には検出器の感度を満足するプロトン数を有していることが要求される。そこで、T_1 測定を行う部位として切り花の子房を選択した。実験で用いたカーネーションの子房は直径約8mm、高さ約10mmで、その大きさはNMR用試料として適している。また、エチレンはカーネーションをはじめとした花の萎凋の原因となるホルモンであるが、子房はクライマクテリック上昇以前からエチレン生合成のもととなるACC合成酵素（S-アデノシルメチオニンメチルチオアデノシンリアーゼ；EC 4.4.1.14）の量が多く、クライマクテリック上昇で他の器官に比較して数倍のエチレンの前駆物質であるACC（1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸）を生成する[47]。そのため、子房は老化の初期段階を捉えやすい部位と考られ、その内部の水の動的状態からは有用な情報が引き出せると考えられる。

（2）実験手順

子房を封入したNMR試料管の状態を図11に示す。カーネーション切り花の花弁を取り除いたのち、花柄と雌蕊を花床から切断して子房を取り出した。NMR試料管への挿入を容易にするために、花柱の上部を切断し子房を上方にした状態でNMR試料管内に封入した。NMR装置は、共鳴周波数25MHz、0.5872T、対象核はプロトンである。測定には、パルス系列が90°-t-90°である飽和回復法を用いた。この系列における時間 t 後の磁化 M_t は、次式で表される。

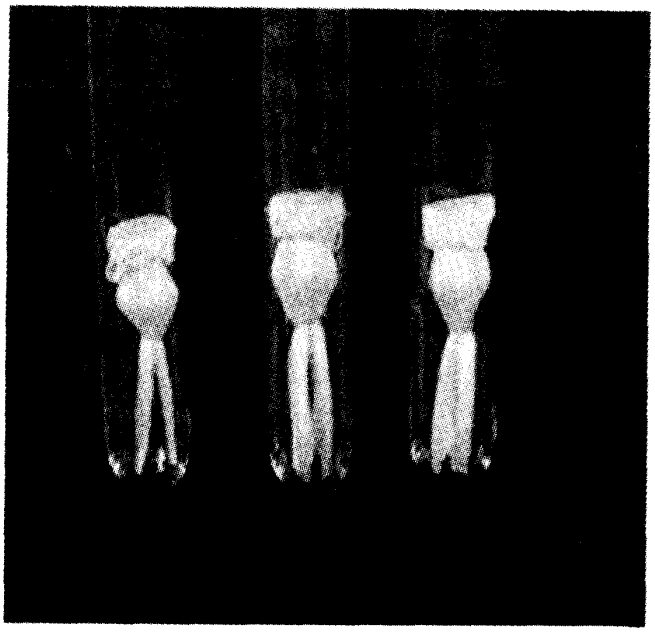


図11　試料を封入したNMR試料管

$$M_t = M_0\left[1-\exp\left(-\frac{t}{T_1}\right)\right] \tag{3-1}$$

ここで、M_0は熱平衡における磁化、T_1は縦緩和時間を示す。本測定での縦緩和時間T_1は、式(3-1)を

$$\frac{M_0 - M_t}{M_0} = \exp\left(\frac{-t}{T_1}\right) \tag{3-2}$$

式(3-2)に変形し、最小二乗法による近似式で求めた。

測定中のNMRプローブ温度は、装置付属の温度制御装置を使用して25℃に設定した。測定の際には、パルスが子房の中心に照射されるように調整した。^{1}H-NMRによる測定はキセノン処理後から約96時間の間に3回行ったが、試料は測定時を除いて20℃に設定した恒温チャンバ内で保存した。

第3節　実験結果および考察

1　解析方法の検討

図12に実験で得られたNMRの出力信号を式(3-2)を用いて近似した例を示す。生体組織内のT_1は、水分子の動的状態の違いによって数種類の値に別れるという研究結果があり[44]、その場合近似式は複数となる。本装置付属のプログラムをもちい、あらかじめ近似式の数を指定し回帰を行った結果、近似式は1つの場合より2つとした場合に分散が小となった。この結果より、カーネーション切り花の子房からは2種のT_1値が得られ、動的状態が異なる2種類の水の成分が存在すると考えられた。しかし、1つの近似式で近似した場合の分散が極端に大きいわけではなく、このような場合に、わずかな数学的処理の違いが物理的意味を有すると判断するのは難しいと考えられた。そこで、本論では、1つの指数近似式から得られるT_1を平均的T_1の解析、2つの指数近似式から得られるT_1をT_1が2成分に別れるとした解析として、両面から評価することとした。

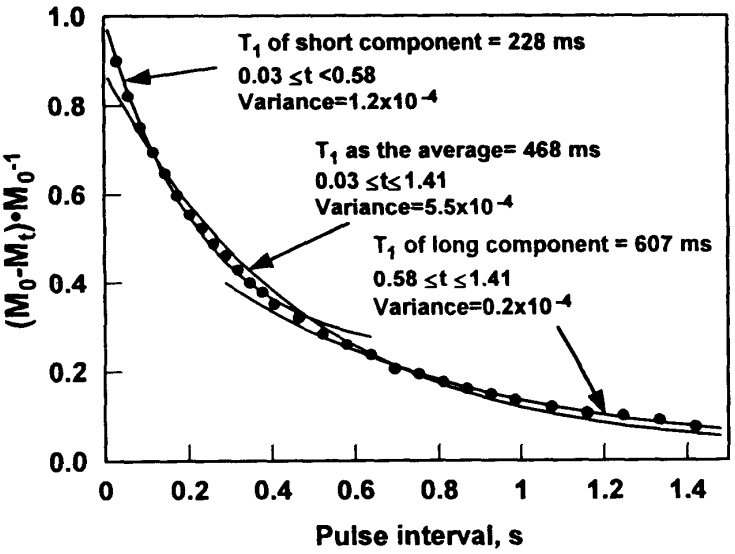


図12　NMR信号の指数関数による近似

2　縦緩和時間T_1

表4に本実験で得られたカーネーション子房部の平均的T_1の測定結果、および、比較のために既往の研究におけるケヤキ属およびクスノキ属の葉[19]、スイカズラ科Viburnumの葉[15]、リョクトウモヤシ

表4　カーネーション子房部の平均的T_1値および既住の研究によるその他の植物のT_1値

			T_1, s	Water Content	Number of Samples
Carnation	Ovary	Xenon 0.7 MPa	0.38±0.03	No data	3
		Xenon 0.5 MPa	0.42±0.03		
		Control	0.51±0.09		
Zelkova	Leaves		$4.67\times10^{-2}\pm0.45\times10^{-2}$	147.7±19.6	21
Machilus			$5.59\times10^{-2}\pm1.70\times10^{-2}$	110.7±8.5	22
Cinnamomum			$8.25\times10^{-2}\pm1.31\times10^{-2}$	100.1±16.1	26
Viburnum	Leaves		0.16-0.34	1.4-2.7 gH_2O/g db.	21
mung been	Etiolated seedling		1.03±0.08	1.77±0.9 gH_2O/g db.	25
Tomato (mature)	Outer wall of pericarp		1.56±0.14	No data	1(Errors came from calculation of T_1)
	Dissepiment		0.98±0.17		
	Placenta		0.57±0.09		
	Columella		0.64±0.17		

[17]、トマトの果実[16]のT_1測定結果を示す。T_1の測定は試料1点につき3回行い、測定値には平均を使用した。また、表中にはキセノン処理後1日目の結果を示した。純水のT_1は約3秒であるが[21]、子房内水の平均的T_1は対照区で0.51 ± 0.09秒であった。生体組織内の水のT_1は、多糖類および脂質などの生体高分子や溶存イオンなどに束縛されるため短くなることが知られており[8]、本実験でも同様の結果が得られた。その他の影響として植物のT_1は含水率に依存する[20]など、そのT_1値には様々な要因が関係する。しかし、表に示したように、その大まかな分布範囲は0.1秒から1.5秒の間であると考えられる。よって、本実験で得られたカーネーション子房の平均的T_1値は、植物のT_1値として妥当な値であると思われる。また、表4に示したキセノン処理区の平均的T_1値は、対照区より小さな値を示した。大下ら[11]は、キセノンが分圧0.6MPaおよび温度298Kで溶解しているときの蒸留水のT_1は、水の構造化によって通常の蒸留水より短くなることを明らかにした。カーネーションの子房においても、キセノンによる水の構造化が、組織内の水の束縛をより強くしたと考えられる。

キセノン処理区および対照区の平均的T_1の経時変化を図13に示す。各シンボルは測定した試料3個体の平均値、エラーバーは、最大値と最小値を表す。両区の平均的T_1は、時間の経過に伴い長くなった。しかし、キセノン処理0.7MPa区とキセノン処理0.5MPa区では、約48時間にわたりT_1の平均値が対照区より低い値を示した。NMRを用いた既往の研究では、植物細胞内の水の動的状態は組織の生理的活性を調節する働きを持つと考えられており、水の動的状態が活発な場所では生理的活性も高く、動的状態が不活発な場所では生理的活性も低いといわれている[16]。本実験結果では対照区のT_1はキセノン処理区より高い値を示しているため、対照区はキセノン処理区より生理的活性が高い状態にあったと考えられる。生理的活性が高いことは保存中に劣化が早く進むことを意味する。よって、キセノン処理区でT_1の延長が顕著に見られなかったことは劣化の抑制に繋がると考えられる。

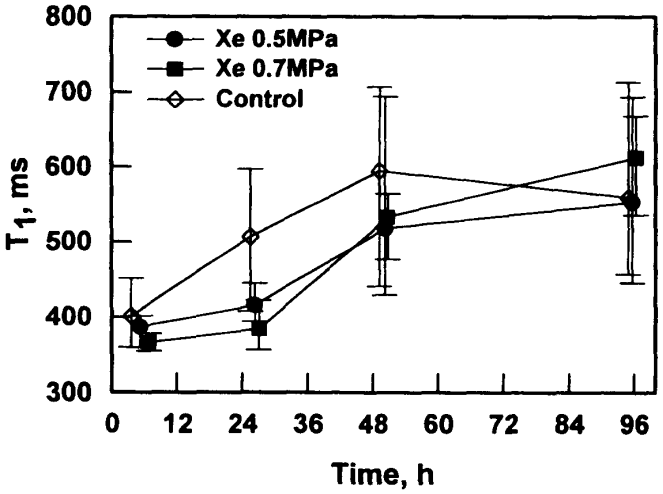


図13　平均的T_1の経時変化

平均的T_1を得た同じNMRの出力信号に対して、3-2式を用い2つの近似式で解析を行った結果、長短2つのT_1値が得られた。キセノン処理後1日目のT_1測定結果、および、比較のため隈元ら[22]によるイチジク果実のT_1値を表5に示す。隈元ら[22]は一連のNMRの出力信号を複数の指数近似式を用いて解析した結果、T_1の測

表5　2成分として解析したカーネーション子房部のT_1値および既住の研究によるイチジクのT_1値

			T_1 s	Fraction	Number of Samples
Carnation	Ovary	Xenon 0.7 MPa	0.49±0.04	0.66±0.05	3
			0.16±0.02		
		Xenon 0.5 MPa	0.54±0.04	0.66±0.03	
			0.19±0.02		
		Control	0.62±0.04	0.71±0.10	
			0.17±0.03		
Fig Fruit (mature)	Receptacle		<0.1	8.5±1.6	6
			0.91±0.06	0.9±0.2	
			1.38±0.06	3.6±0.8	
			1.55±0.04	87.1±0.7	
	Drupelet		<0.1	6.4±0.5	
			1.03±0.09	0.9±0.3	
			1.49±0.09	3.4±0.9	
			1.66±0.08	89.3±1.6	

定からイチジク果実には、0.1秒より短いもの、0.6秒から1.0秒のもの、1.2秒より長いもの、と3つの動的状態をもつ水の部分に別れるとした。また、その動的状態は生体組織内の自由水、弱い結合水、強い結合水に由来するのではないかと述べている。本実験においても試料のT_1が長短2つに別れたことから、切り花の子房内部において短いT_1をもつ束縛の強い水成分と長いT_1をもつ束縛の弱い水成分の2種類が存在すると考えられる。以下、短いT_1をもつ水成分をI成分、長いT_1を持つ水成分をII成分とする。II成分のT_1に関しては、キセノン処理におけるキセノンガス分圧が高くなるほど短くなる傾向を示した。しかしI成分のT_1は、それぞれの実験区で顕著な差が見られなかった。すなわち、キセノン処理は束縛の弱い水に影響を与え、束縛の強い水への影響は少ないと考えられる。また、T_1の解析を複数の指数近似式でおこなう場合、出力信号の強度から、試料中の全プロトンに対する任意の成分におけるプロトンの存在割合が得られるため、それぞれの成分の存在割合を求めることができる。表5に、I, II成分の存在割合を示す。

図14のAにI成分、BにII成分のT_1の経時変化を示す。I成分のT_1の長さは、各実験区においてわずかに短縮する傾向が見られたが、著しい変化はなかった。I成分は強い束縛を受けている水であるが、キセノンによる処理や時間経過によって顕著な変化は生じなかったと思われる。一方で対照区におけるII成分のT_1は、図14のBに見られるように長くなった。また、キセノン処理区のII成分のT_1は約48時間までの平均値では対照区より短い値を示し、特にキセノン0.7MPa区では、約24時間後のII成分のT_1値は初期の状態を保った。この結果からII成分のT_1は時間の経過に伴い長くなるが、キセノン処理によってT_1の延長が抑えられたと考えられる。

図15に、試料中の全プロトンに対するII成分の存在割合の経時変化を百分率で示す。キセノン処理区、対照区ともにII成分は常に50%以上を占めた。キセノン処理0.5MPa区および0.7MPa区におけるII成分の存在割合は、キセノン処理後から96時間にかけて緩やかに増加した。それに対して対照区のII成分の割合は、48時間後まで高い割合で増加し、その後96時間の間に減少した。このようなII成分からI成分への水の束縛の状態変化は、細胞内水の移動を反映していると考えられる。よって、キセノン処理区のII成分の存在割合の変化が対照区より少ないことから、無極性ガスはT_1の延長だけでなく、細胞

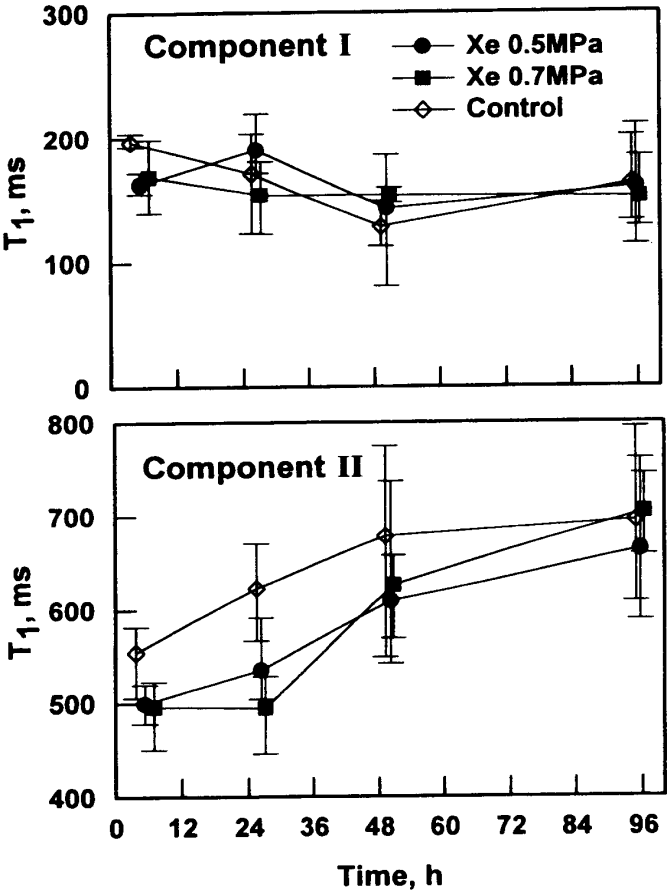


図14　2成分として解析したT_1の経時変化

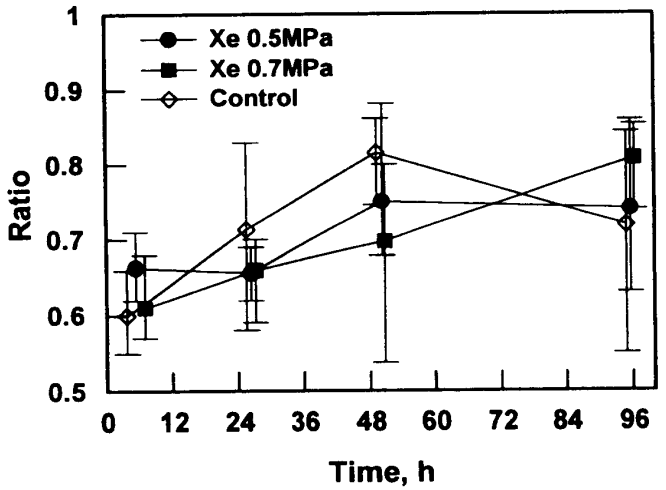


図15　2成分の比率の経時変化

内の水移動を抑える働きを持つと考えられる。

Snaarら[42]は、水のプロトンの緩和時間を変化させる働きを持つMg^{2+}イオンをリンゴ果肉の柔組織細胞に浸透させる実験を行い、Mg^{2+}イオンの浸透過程から水のプロトンの緩和時間は細胞壁および原形質では短く、液胞では長いことを明らかにした。彼らの測定では、細胞の各部位に対応する3種類の緩和時間が得られたが、液胞に由来すると考えられる長いT_1を持つ成分が全プロトンの約75%を占めており、これは本実験で得られたII成分の割合とほぼ一致した。そのため、II成分は液胞の、I成分は原形質と細胞壁のT_1の平均値を示していると考えられる。本実験結果では、対照区のII成分のT_1値は時間の経過とともに長くなり、II成分の存在割合も増加した。これは、子房の細胞が老化する過程での変化であると考えられる。液胞は細胞の生体反応で生じた老廃物を取り込み分解する働きを持つため[29]、成分IIが液胞の成分であるならば、細胞の老化に伴い成分IIの存在割合の増加を説明することが可能である。隈元ら[22]は、イチジクの果実が熟する過程で、長い縦緩和時間を持つ成分が増加し、短い縦緩和時間を持つ成分が減少することを明らかにした。また、試料が熟する過程で電解質の漏出が増大することから、異なる成分間の拡散は細胞の形態および生体膜の透過性に依存するとした。すなわち、各成分が含むプロトンの存在割合の変化は、細胞の老化に伴うI成分とII成分の間の水分移動を反映していると考えられる。キセノン処理区において対照区よりII成分の変化が少なかったのは、無極性ガスの働きによって細胞の老化および細胞膜間の水移動が抑えられたためと考えられる。なお、48時間から96時間の間にII成分の存在割合が減少したのは、細胞劣化による外部へ脱水が起こったためと思われるが、今後の検討が必要である。

3 水の動的状態への影響

カーネーション子房部のT_1の測定を行った結果、無極性ガスによる保存は水の束縛の状態を強くし、細胞の老化および生体膜を通過する水の移動を妨げることが明らかになった。また、本実験では、NMR試料管中の子房の色にも変化が生じた。目視による比較では、実験開始時は両区とも似た色であったが、7日後にキセノン処理0.7MPa区において色の明確な変化が認められなかったのに対し、対照区では茶色に変化した。これは、キセノン処理により色素の変性が妨げられたことを示すと考えられる。大下ら[36]は同様の結果がブロッコリで得ており、その原因は水の構造化による酵素活性の抑制であるとしている。このような無極性ガスの生体への働きかけに関しては、現在2つの説が挙げられている。前者は細胞内の水が構造化し、水分子の熱運動が抑制され生体反応が起こりにくくなるという説である。また、後者は細胞内の水の構造化を考えず、無極性ガスが生体高分子、特に生体膜の疎水基に取り込まれることによって生体膜に存在するタンパク質のコンホメーションを変化させ、その透過性に影響を与えるとする説である[44]。前者をとると、キセノン処理区で細胞内の水のT_1の変化が少なかったことは、水の構造化によって生体反応全体が抑制された結果であると考えられる。しかし、本実験でのキセノン処理効果が48時間程度であるのに対して、第2章の結果では、キセノン処理後のキセノン脱離過程は約2時間から3時間の間に終了した。脱離後のキセノン処理の効果は、大気圧下において水に飽和して存在するか、あるいは生体高分子の疎水基近傍で会合しているキセノンガスによるものと考えられるため、前者を選択するには、どの程度の水の構造化が生体活動を抑制するのかを明らかにする必要がある。一方で生体膜に存在するタンパク質のコンホメーション変化によって無極性ガスの効果を説明する後者は、無極性ガスによる処理が成分IIから成分Iへの生体膜を通過する水移動が妨げられたことを説明することが可能である。生体膜のタンパク質と水移動に関しては、最近、植物の生体膜にも水分子に特異的な水チャンネルタンパク質（アクアポリン）が存在することが明らかになり、オウシャジクモ(*Chara corallina*)では、細胞の水透過性に対する水チャンネルの寄与率は75%あるいはそれ以上であると見積もられている[11]。そのほかにも生体膜にはH^+ポンプやCa^{2+}ポンプなどの輸送タンパク質が含まれており、細胞の生体反応に大きく関わっている。よって、無極性ガスによって生体膜のコンホーメーション変化が起こる場合、生体に大きな影響が与えられると考えられる。

いずれにせよ無極性ガスが水の動的状態を不活発にし生体反応を抑えることで鮮度保持に働くと思われるが、現時点では、無極性ガスが生体におよぼす作用を解明することは困難である。しかし、無極性ガスによる構造化が熱運動を抑制する場合、構造化が解消されれば可逆的にその影響も解消されると予想されるが、生体膜を変性させる場合、膜の構造変化が解消されず生体に悪影響を及ぼすことも考えられる。そのため、無極性ガスによる処理を切り花の保存に利用するためには、微視的な情報である組織内の水の動的状態のみならず、切り花の呼吸代謝や水収支などの巨視的な情報を総合して無極性ガスによる生体への影響を明らかにする必要がある。

第4節　摘要

無極性ガスによる保存がカーネーション切り花の水の動的状態に与える影響を明らかにするために、^{1}H-NMRによる縦緩和時間T_1の測定を行った。

切り花子房部の平均的T_1は、約0.4秒から0.8秒の間にあり、時間の経過に伴い長くなった。しかし、48時間にわたってキセノン処理区のT_1は対照区より小さな値を示し、無極性ガスによる水の構造化が、組織内の水の束縛をより強くしていると考えられた。

上記の平均的T_1を得た同一のデータについて2つの指数近似式をもちい解析した結果、0.1秒から0.3秒の範囲、および、0.4秒から0.8秒の範囲にある2種類のT_1が得られた。短いT_1を持つ水成分、以下I成分、は水の束縛が強い部分、また、長いT_1を持つ成分、以下II成分、は水の束縛が弱い部分の水の動的状態を示すと考えられた。対照区ではII成分のT_1が長くなったが、キセノン処理区では顕著な変化が見られなかった。

試料中の全プロトンに対する成分IIの存在割合では、対照区において時間の経過に伴い増減が観察された。キセノン処理区では、成分IIの存在割合の変化は低く抑えられた。

以上の結果より、無極性ガスによる処理は、細胞内の水の束縛を強くし、また、細胞の老化および細胞膜間の水移動を抑える働きを持つことが明らかになった。

第4章　無極性ガスによる水ストレス抑制効果

第1節　緒言

第3章において、切り花内部における水の構造化によって水移動の状態が変化していることが明らかになった。さて、切り花内部の水の状態はその品質と関係がく、例えば、収穫後に給水が絶たれ脱水が起こるために水ストレスにさらされる[9]。その水ストレスは切り花の萎凋を早めることが知られている[26]。例えば、水ストレスが与えられたフリージア花序からのエチレン生成量は、通常の花序より多い[43]、同じく水ストレスを与えられたカーネーションは、通常の花より早くエチレンを発生する[4]などの報告がなされている。日本におけるカーネーション切り花の輸送は多くが乾式で行われているため、水ストレスによる品質劣化が懸念される。しかし、水ストレスは植物の体内水分の欠乏によって引き起こされるため、切り花からの脱水を抑制するか、給水を促進することでその影響を回避できると考えられる。先に、無極性ガスによる水の構造化によって水の束縛が強くなることを述べたが、その働きにより水の構造化は脱水に伴う水移動を妨げると考えられる。すなわち、無極性ガスによる保存は水ストレスの軽減に効果的だと推察される。そこで、キセノン処理と無処理のカーネーション切り花に水ストレスを与え、その後の脱水の程度および吸水能力を比較することを本章の目的とした。

第3章の結果ではキセノン処理による水の動的状態の変化は僅かであった。そのため、水の構造化による脱水軽減の差を明らかにするには、測定する上で高い分解能が必要であると考えられる。そこで本章では、植物体内の水分分布を高分解能で可視化可能である中性子イメージング法を用いて実験を行った。

第2節　中性子イメージングによる水分分布の測定

1　原理

本手法は、中性子線が照射された試料中にある各物質の原子核が示す透過度の違いをイメージ化するものである。試料を透過した中性子線の強度は、コンバータによってγ線の強度に変換されX線フィルムに像を写す。このとき、中性子線の水素、ホウ素および希土類元素などに対する減衰係数は大きいため、試料がこれらの物質を含むとき、その差がX線フィルム上に黒化度の差として現れる。植物体を対象とするとき、その構成物質中で最も量が多くかつ減衰係数が大きい元素は水素である。植物細胞の80%以上は水であるので、中性子イメージングでは主に水分子中の水素の像が得られる。その像には、水素以外の軽元素や希土類元素の像も重なるが、植物体中の構成比が水素と比較してきわめて少ないため無視できる。また、切り花の保存処理に用いたキセノンによる像も水素の像と重なり区別できないが、キセノンの水への溶解度は温度293K、本実験の処理で用いた最大圧力0.7MPaにおいても$6.6 \cdot 10^{-4}$mol-Xe・mol-H_2O^{-1}とわずかであるため無視できる。同様に、生体高分子など水素を含む化合物の像も同じ画像中に現れるが、これら化合物の像も無視可能であるとされている[30]。以上のように中性子イメージング法は、植物体内の水分分布を捉えるのに適している。本章では、まず水ストレスにさらされた後の試料の水分分布を撮影することで水の構造化による脱水の軽減効果を確認し、さらに試料に給水を行いその後の水分分布変化を時間を追って撮影することで試料の吸水能力について検討した。

2　実験方法

（1）供試材料およびキセノン処理方法

供試材料には、第3章と同一のカーネーション切り花を用い、到着後の調製方法も第3章と同様である。また、キセノン処理も第3章と同様の方法で行った。

（2）実験区および実験手順

実験区として、キセノン処理区と対照区を設けた。キセノン処理条件は、キセノン分圧0.5MPa、0.6MPa、0.7MPaをそれぞれ1組づつ、処理温度は20℃、処理時間は66時間とし、復圧は容器からのガス放出量を45m$l \cdot$min^{-1}に制御して行った。復圧方法は第3章と同様である。キセノン処理の終了後、キセノン処理区および対照区への給水を停止し、水ストレスの付加を行った。24時間の水ストレスを与えた後に、給水再開前に中性子イメージングを行った。

（3）水分画像の取得

中性子イメージングは日本原子力研究所東海研究所内の研究炉JRR-3Mに設置された中性子ラジオグラフィ装置によって行った。透過中性子線はn/γコンバータを用いてX線フィルム上に透過画像として取得した。コンバータにはガドリニウムコンバータを、X線フィルムにはKodakのSRをもちいた。コンバータとX線フィルムを封入したアルミニウム製のカセットに試料をアルミニウムテープで固定した。その後、カセットを中性子ラジオグラフィ装置内の所定の場所に設置し照射した。まず、水ストレス下におけるカーネーション切り花の中性子イメージングを行い、その後、試料に給水を行った。給水は撮影後に茎を水切りし、水を入れた小型のプラスチック容器中に挿入し、再びアルミニウム製カセットに設置して行った。給水後は時間をおいて再び中性子イメージングを行った。

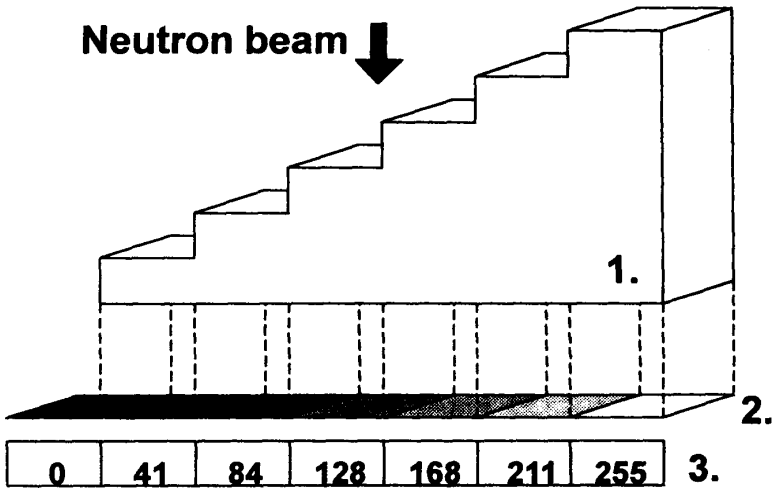


図16　テフロン製リファレンスおよびその中性子による像

（4）デジタル画像解析

中性子イメージングの透過画像には、中性子線の照射状態あるいはX

線フィルムの現像等により黒化度の差が生じる。画像間で比較を可能とするために、アルミニウム製カセットには試料横にテフロン製リファレンスを設置した。リファレンスは等間隔で6段の階段状になっており、段の高さに応じて黒化度の異なる像が得られる。図16にテフロン製リファレンスおよびその像の概略図を示す。

得られた中性子イメージングの一例を図17に示す。デジタル画像処理は、X線フィルム上の画像を透過型スキャナ（エプソン，ES-8000）を用いてTIFF形式およびモノクロのデジタル画像として取り込んで行った。はじめに、TIFF形式画像をフォトレタッチソフト(Adobe, Photoshop)上でBMP形式画像に変換した。続いて、リファレンスによる階調値の補正と数値データ化を行った。数値データ化のフローチャートを図18に示す。モノクロ画像の

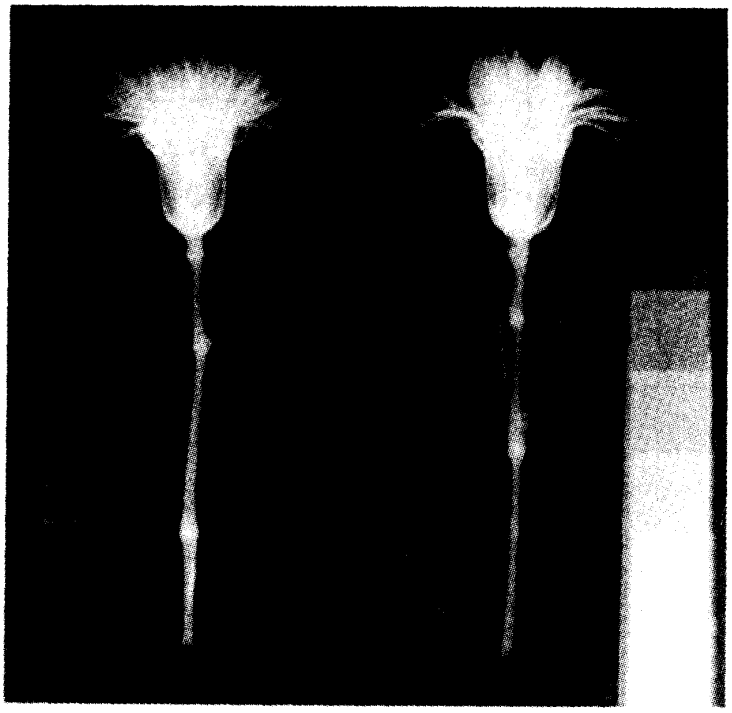


図17　中性子イメージングによる一例

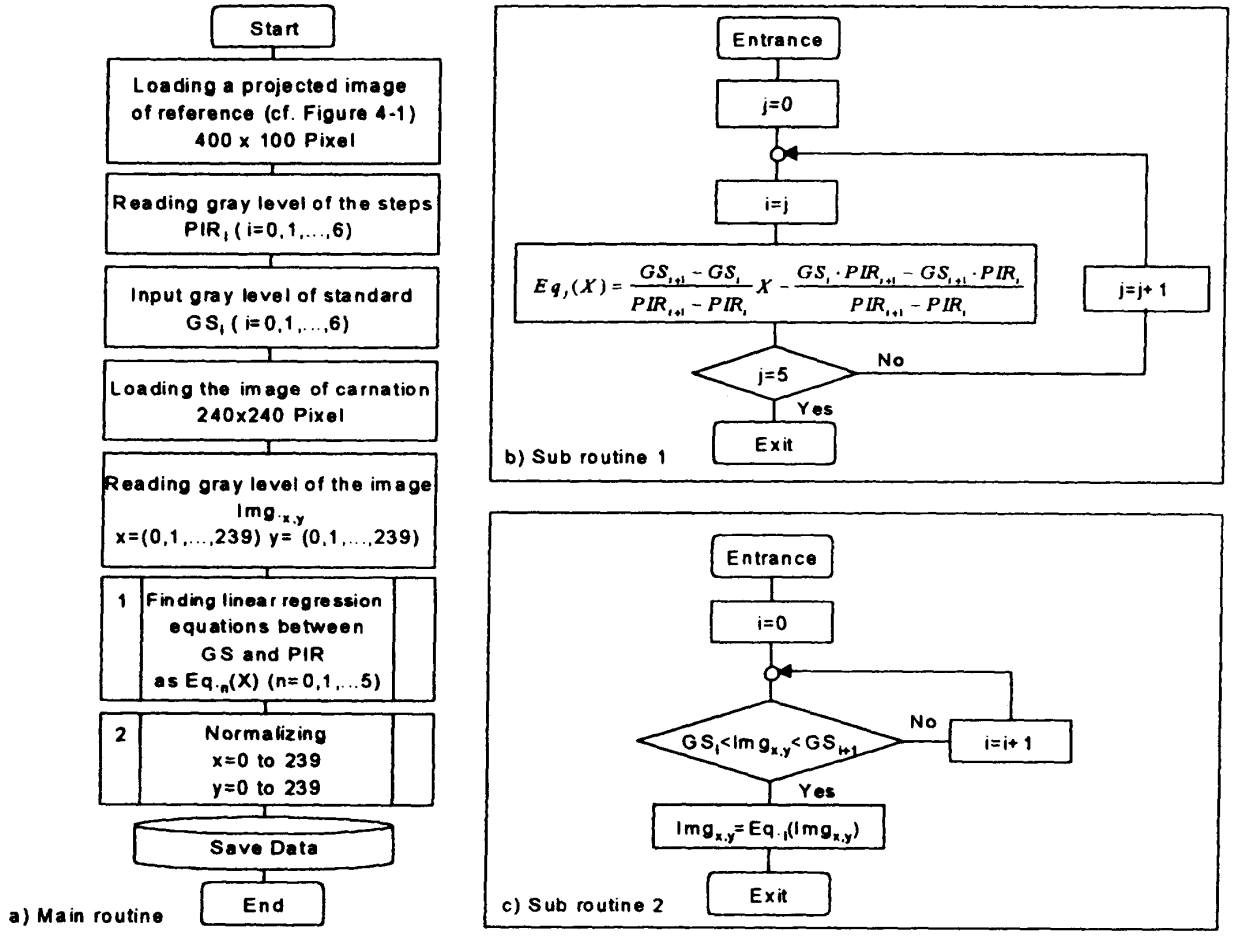


図18　数値データー化のフローチャート

表6　テフロン製リファレンスの各段に対応する階調値

Steps of the reference	Black level
Back ground	0
1st	41
2nd	84
3rd	128
4th	168
5th	211
6th	255

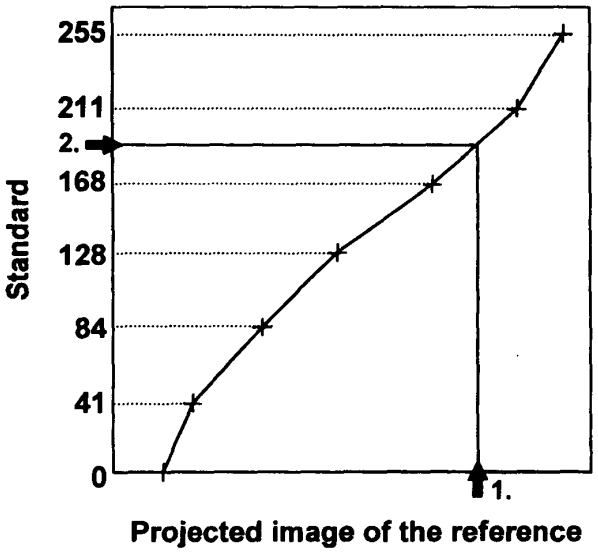


図19　直線補間の一例
1. 補正前の階調値　2. 補正後の階調値

階調は、黒0から白255までの256階調である。まずバックグランドを含めたリファレンスの各段に対し、256階調を均等に割り当てた。表6は、リファレンスの各段と階調の関係を示す。補正される画像のリファレンスの階調と表6の階調との関係から、連続した2段の間で直線補間し、画像上の階調値を補正した。図19に直線補間の例を示す。

第3節　実験結果および考察

中性子イメージングを行った結果、中性子の照射時間を変えることによって、子房内部の胚珠が確認可能である分解能の高い画像を得ることができた。ここでは、試行錯誤により最適な照射時間を16秒とした。図20のように花冠の周囲を240ピクセルx240ピクセルの正方形画像として各区の比較をおこなった。図21は水ストレス下における0.5、0.6、0.7MPaのキセノン処理区およびそれらに対する対照区の階調値のヒストグラムである。いずれのキセノン処理区でも、最頻値は対応する対照区より明るい階調に存在し、水ストレス後の水分量が多いことが示された。このことはキセノン処理をすることで、水ストレス下にあっても水分が保持されたことを示すと考えられる。キセノン処理分圧による差は、高いキセノン分圧の方が明るい階調が多い傾向も見られた。しかし、各対照区にもばらつきが見られるため、キセノン処理分圧による差を確認するにはデータが不十分であると考えられる。

図20　花冠周囲の画像

給水後の中性子イメージングの経時変化では、キセノンガス分圧0.5、0.6、0.7MPaのキセノン処理区と対照区の組の間にガス分圧に依存すると考えられる顕著な差は見られなかった。ここではキセノン処

理による効果を示すため、最も構造化の程度が低いと考えられるキセノンガス分圧0.5MPa区と対照区の解析結果を示す。図22は、得られた256階調の水分画像を4段階の等高線図として表示したキセノン0.5MPa区と対照区の水分分布図である。時間の経過に伴い、階調値63以上の面積が増加したが、末端の花弁での吸水が起こった結果水分量が増え、その部分の階調値が大きくなったためであると考えられる。このように、切り花の吸水の状態は中性子イメージングを用いて可視化することが可能であった。また、個体が異なってはいるが、キセノン処理区は対照区と比較して給水前の水ストレスを与えた状態でも水分量が多い部分が対照区より大きな面積を占め、また、給水後も水分量が多い部分の面積が増加する程度は顕著であった。茎の上部から花弁に至る部分の中央部に子房が位置しているが、キセノン処理区では特に子房内部に水分が保たれていたのに対し、対照区では水分量が少ない状態下にあった。

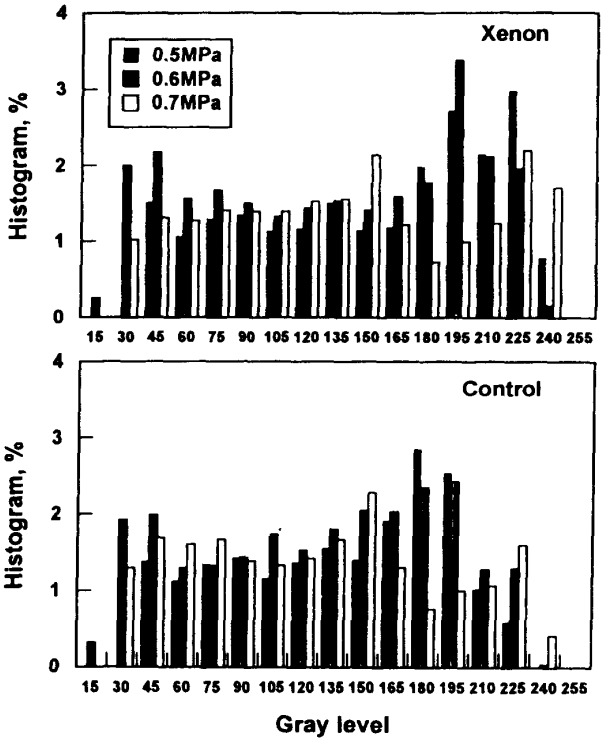


図21　階調値のヒストグラム

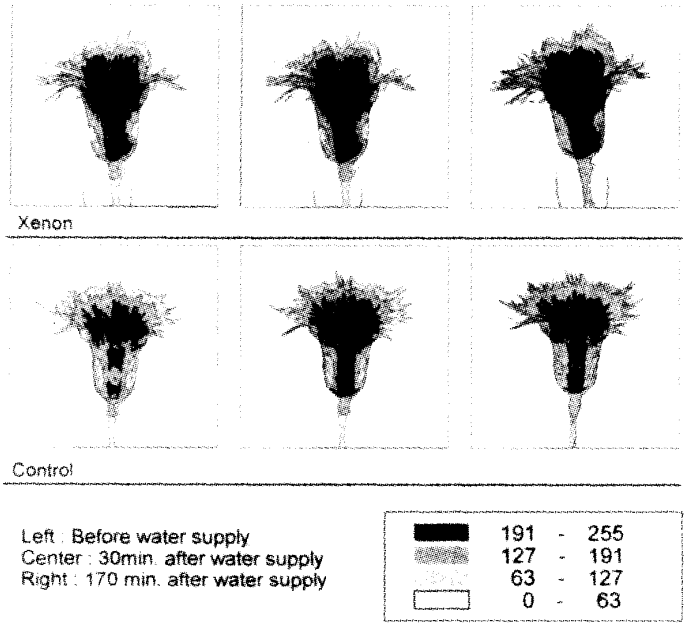


図22　水分分布を示す階調値の等高線図

キセノン処理による水分分布への影響を定量的に評価するために、水分量を示す各階調値のピクセル数の経時的な増減に注目した。図23に結果を示す。階級値は、階調値1から255までを15階調づつ17階級とした。横軸は階調を示し、目盛り0で水分量が0、目盛り255で水分量最大である。縦軸の累積相対度数の100%は、画像の総ピクセル数とした。階級値が0より大であるピクセル数は、キセノン処理区では21.9%から27.4%へ、対照区では19.7%から22.8%へと増加した。これは、吸水による水分の増加によって、画像上に新たに水の像が現れた部分は、キセノン処理区の方が対照区より多かったことを示す。吸水前から給水後30分の間に見られる累積相対度数分布の変化に関しては、吸水前に最小の階調値は両区とも約50であったが、給水後30分のキセノン処理区では、階調値が0から50の度数が増加した。しかし、対照区では、キセノン処理区の約1/2の増加にとどまった。また、キセノン処理区では階調値190以上の部分の度数および階調値が低い部分の度数とも一様に増加した。階調値の高い部分の増加は、図22に示された子房部での水分量の増加を反映し、階調値の低い部分の増加は花弁末端での吸水による水分量の増加を示すものと考えられた。次に、給水後30分から、170分の間に見られる累積相対度数分布の変化では、キセノン処理区では、相対度数分布曲線が右方向にシフトし、全体的に階調値が大きい部分が増加した。対照区では、中間の階調

値が同様に右にシフトしたものの、キセノン処理区より変化は少なかった。すなわち、キセノン処理区が段階的に分布が広く、かつ、水分量が多くなる方向に明確な変化を示したのに対し、対照区は顕著な変化を示さなかった。このことは、カーネーション切り花にキセノン処理を施したことによって、初期の吸水能力が維持されたためと考えられる。

以上より、無極性ガスによる保存は、切り花内部の水を保持し脱水を抑える働きおよび吸水能力を維持する働きを持つことが明らかになった。すなわち、^{1}H-NMRによる縦緩和時間 T_1 の測定で得られた構造化による水の束縛の状態変化から推察された脱水の軽減が確認された。切り花には乾式輸送時だけではなく、導管閉塞など様々な要因によって水ストレスが与えられることを考慮すると、無極性ガスによる保存法は実用上有効であると思われる。また、吸水能力の維持に関しては、第3章で仮定として述べた膜のタンパク質のコンフォーメーション変化による説明とは矛盾が生じる結果となった。コンフォーメーション変化で水チャンネルの働きが抑えられるならば、細胞の吸水は減少すると考えられるためである。しかし、ここで得られた結果のみではこの仮定を否定するために十分ではなく、今後は無極性ガスによる水の構造化のメカニズムについて研究を進める必要があると思われる。

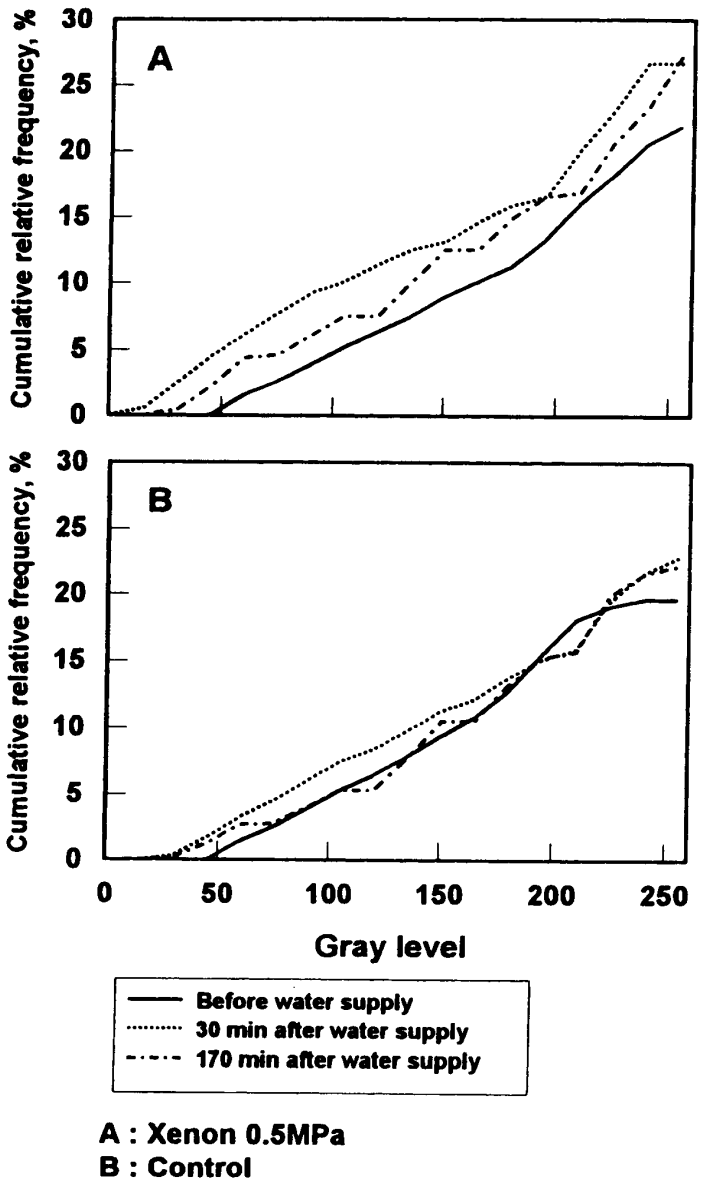


図23　各階調の累積相対度数分布曲線

第4節　摘要

中性子イメージングによって、カーネーション切り花の水分分布を解析可能である良好な画像を得ることができた。その結果、水ストレス下における0.5、0.6、0.7MPaのキセノン処理区の階調値のヒストグラムでは、最頻値は対応する対照区より明るい階調に存在し、水ストレス後の水分量が多いことが示された。その結果、無極性ガスによる処理は、対照区と比較して切り花内の水が保持されることが明らかになった。特に、子房部において水が保持される傾向が顕著であった。このことは、無極性ガスによって水の束縛の状態が強くなるという結果を裏付けるものであった。

水分分布の等高線図の経時変化、および階調値の累積相対度数分布曲線の経時変化では、キセノン処理区が対照区と比較してカーネーション切り花内部の水分量が増加する顕著な変化を示した。すなわち、無極性ガスによって初期の吸水能力が維持されたと考えられた。以上の結果より、本保存法は切り花からの脱水によって引き起こされる水ストレスを軽減する働きを持つことが示唆された。

第5章　無極性ガスによる処理を行った切り花の生理的応答

第1節　緒言

前章までに無極性ガスによる水の構造化は、カーネーション切り花内の水の束縛を強くし、その効果の一つとして切り花からの脱水抑制の働きを持つことを明らかにした。そのため、無極性ガスによる水の構造化は、水ストレスを軽減する面でもカーネーション切り花の鮮度保持に効果的であると考えられた。しかし、本法の鮮度保持法の市場への適用性を検討するためには、水の構造化が切り花の生理的状態に与える影響を明らかにする必要がある。本章では特に、水の構造化による水移動の変化と生理的状態変化との関係を明らかにするために、切り花の蒸散速度および吸水速度と、生理的状態と密接な関係にある呼吸速度を連続および非破壊で計測するシステムを構築し計測を行い、その結果から本保存法の市場への適用性について考察を行った。

第2節　供試材料および実験方法

1　供試材料およびキセノン処理方法

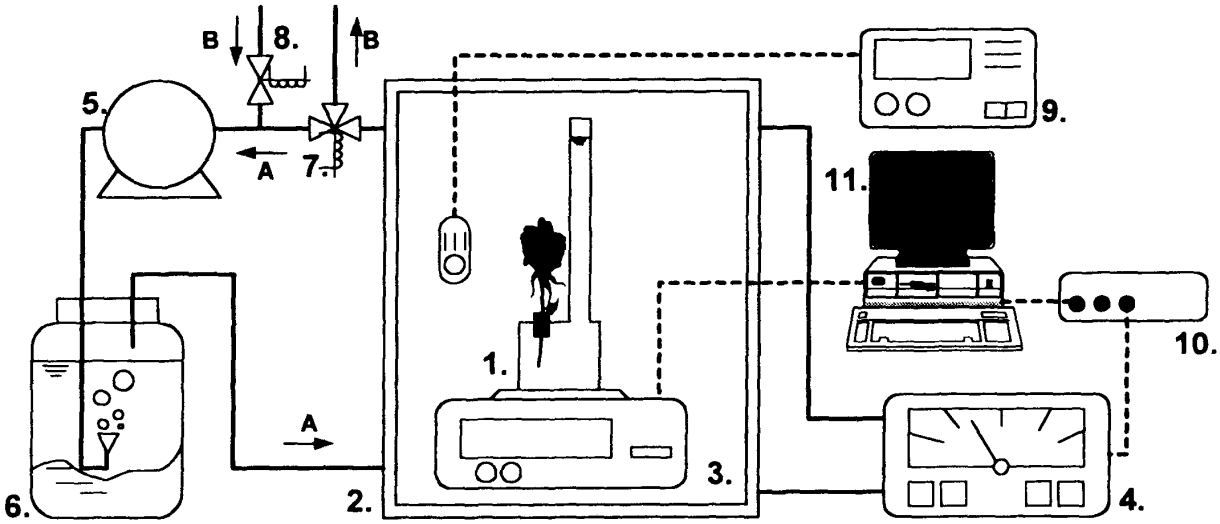
供試材料には、第3章と同一のカーネーション切り花を用い、到着後の調製方法も第3章と同様である。また、キセノン処理も第3章と同様の方法で行った。

2　キセノン処理条件および実験手順

実験は、計3回を1997年4月、5月、7月に行った。実験にはキセノン処理区と対照区を設けた。その際のキセノン処理条件は、キセノン分圧0.5MPa、温度20℃とした。処理時間は、4月および5月を24時間、7月を48時間とした。キセノン処理の手順は3章と同様である。キセノン処理後は、容器付属のニードルバルブを開いて大気圧への復圧を行った。その後、キセノン処理区および対照区を次に述べる計測システム内に設置し実験を行った。なお、両区のシステムとして同様のものを2組作成し使用した。

第3節　呼吸速度・水収支計測システム

蒸散速度は、周囲空気の湿度に大きな影響を受けるため、植物体の生理的状態と水収支との関係を明らかにする上では、周囲の湿度を常に一定に保つ必要がある。本システムでは、飽和塩水溶液を用いて湿度を一定に保つ方法を採用し、周囲の湿度変化による影響を受けずに水収支を評価可能な環境を作成した。図24に計測システムの概略図を示す。システムは、温度一定の条件を実現するため20℃に制御



1.Container　2.Chamber　3.Balance　4.CO_2 Measuring device　5.Air pump　6.Saturated solution　7.Solenoid valve　8.Solenoid valve　9.Thermo recorder　10.A/D converter and multiplexer　11.Personal computer

A.Closed line　B.Ventilation line

図24　計測システムの概略図

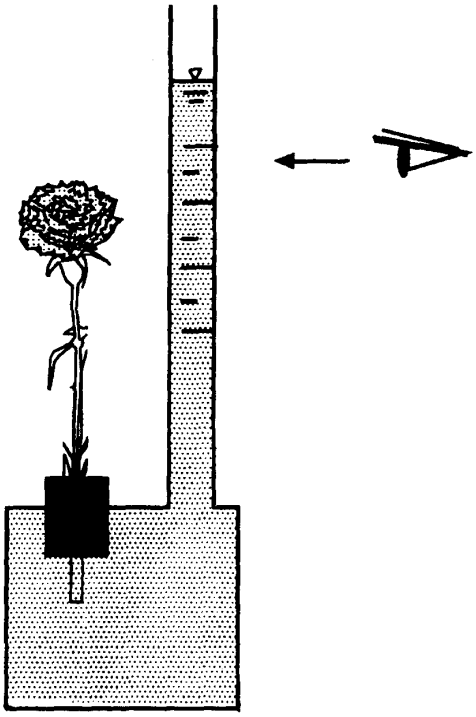


図25　吸水速度計測容器

された恒温室内に設置した。また切り花自身の光合成によって発生する同化産物による代謝への影響を除くため暗黒下で実験を行った。

1　呼吸速度・水収支の計測

（1）吸水速度

切り花の吸水速度は、図25に示した吸水速度計測容器で測定した。容器は、水で満たされた給水部分と水位を測定する目盛り付きガラス管で構成した。吸水速度はガラス管内の水位を、1日1回測定することより算出した。試料のカーネーション切り花は、容器との接合部から漏水しないようシリコン充填材で固定した。また、水面からの水分蒸発を防ぐために、ガラス管内の水面部分を流動パラフィンでシールした。

吸水速度 J_{up} は吸水速度測定容器の水位から容器内の水の体積を算出することで求めた。測定容器内の水の体積 V を次式で質量 W に換算した。

$$W = \rho_T V \tag{5-1}$$

ρ_T は任意の温度 T における水の密度である。試料の吸水速度 J_{up} は、任意の時間における測定容器内の水の質量を W_{up}、t 時間後における測定容器内の水の質量を $W_{up'}$、初期の試料質量を M とし、

$$J_{up} = \frac{W_{up} - W_{up'}}{M \cdot t} \tag{5-2}$$

で求めた。

（2）蒸散速度

蒸散速度は、試料の質量の減少を蒸散によって失われた水の質量として求めた。試料の質量は、試料を設置した吸水速度計測容器とともに電子上皿天秤 (METTLER PB303, SIBER HEGNER) を用いて計測した。質量データの取得は、毎時1回行った。その際5秒間隔で10回計測した値の平均値をデータとし、パーソナルコンピュータ (PC-9801VX, NEC) に出力した。

試料の蒸散速度 $J_{tran.}$ は、任意の時間における試料の質量を $W_{tran.}$、t 時間後における試料の質量を $W_{tran.}'$、初期の試料質量を M とし、

$$J_{tran} = \frac{W_{tran} - W_{tran'}}{M \cdot t} \tag{5-3}$$

から求めた。

（3）呼吸速度

呼吸速度は CO_2 放出速度とした。吸水速度測定容器および電子上皿天秤を内容積9.1lの密閉チャンバ内に設置し、内部空気の CO_2 濃度を赤外線吸収フォトアコースティック法を用いた CO_2 メータ (Model 3600, MSA JAPAN) で計測することにより算出した。チャンバ内の空気は、CO_2 メータに付属した流量約 $1l \bullet min^{-1}$ のサンプリングポンプによって常に循環しているため、内部の CO_2 濃度分布は均一であると考えられる。なお、CO_2 濃度データは多チャンネル入出力変換装置 (Green Kit 88, ESD) を用いてデジタル変換し、電子上皿天秤による質量計測と同時刻に、毎時1回、5秒間隔で10回計測した値の平均値

を求めパーソナルコンピュータに出力した。
呼吸速度は以下で求めた。任意の時間における容器内の CO_2 の質量 Q は、

$$Q = \frac{440 P_{chm} V_{chm} C_{chm}}{RT} \tag{5-4}$$

で、表される。ここで、V_{chm} は容器の容積、C_{chm} は容器内の CO_2 濃度、P_{chm} は容器内圧、T は温度である。試料の呼吸速度 J_Q は、t 時間後における容器内の CO_2 の質量を Q' とし、

$$J_Q = \frac{Q - Q'}{M \cdot t} \tag{5-5}$$

から求めた。

2　チャンバ内の換気および湿度調整

（1）チャンバ内換気法

チャンバ内の CO_2 濃度の増加による試料への影響を除くため、1日1回換気を行った。湿度調整を行っている回路内に設置した電磁弁を開き外気を導入した。チャンバ内空気の排気は同回路内下流側に設置した3ポート電磁弁を切り替えて行った。換気時においてもチャンバ内湿度を一定に保つ目的で、外気は硝酸マグネシウム飽和水溶液中を経由してチャンバ内に導入した。電磁弁の開閉制御はパーソナルコンピュータと多チャンネル入出力変換装置でおこなった。以上の計測および制御のフローチャートを図26に示す。

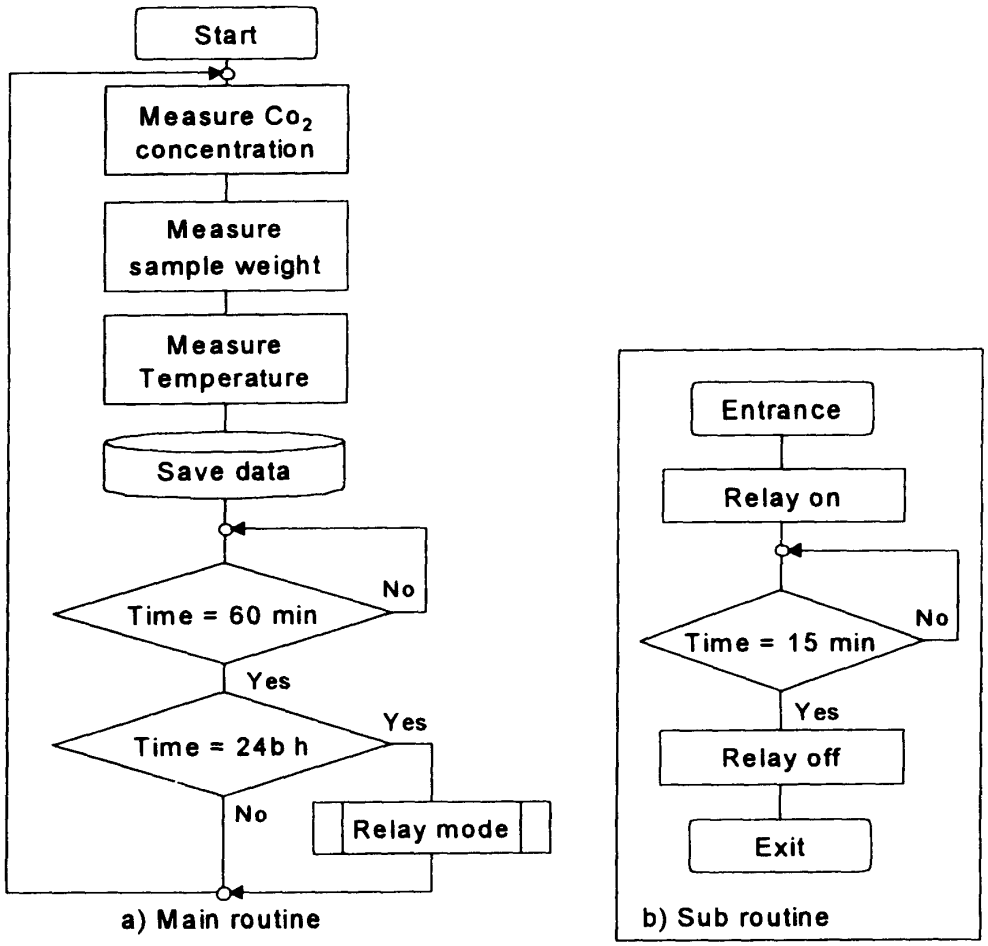


図26　計測および制御のフローチャート

（2）チャンバ内湿度調整

切り花の蒸散は外部の湿度に依存するが、生理的要因による蒸散の変化を明確にするために周囲空気の湿度をほぼ一定に調整した。湿度調整には硝酸マグネシウム飽和水溶液を使用した。硝酸マグネシウム飽和水溶液と共存して平衡状態にある空気の相対湿度は、温度20℃において54%(RH)である[13]。速やかに湿度調整する目的で、チャンバ内部空気湿度を飽和水溶液内へポンプを用いて曝気した。その際のポンプ流量は1.0l•min^{-1}であった。硝酸マグネシウム飽和水溶液150m lを容量300m lの三角フラスコに注入し、曝気用の管および排気用の管を備えたシリコンゴム栓で密封した。気泡を細かくするため曝気管には直径15mmの球形散気用エアストーンを設置した。なお、チャンバ内湿度および温度の計測は、温湿度計(RS-10, タバイエスペック)で行った。

（3）システムにおける湿度調整の結果

図27に本実験開始時から終了時までのチャンバ内温湿度の経時変化の一例を示す。各種塩類の飽和水溶液と平衡にある空気の相対湿度は温度に依存するが、チャンバ内温度は、ほぼ20℃で一定に保たれた。一方、相対湿度は、計測開始直後にはチャンバ外の高湿度空気の影響により高い値を示したが、約6時間で56%(RH)まで下がり、その後硝酸マグネシウム飽和水溶液と共存して平衡にある空気の相対湿度である54%(RH)を中心に推移した。

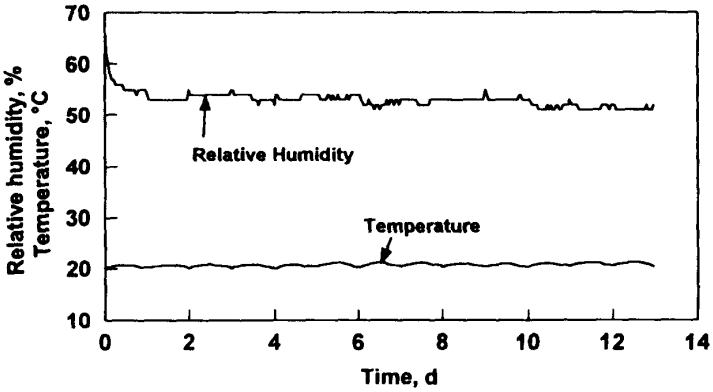


図27 チャンバ内温湿度の経時変化

第4節 呼吸速度の変化

まず、本実験で用いたフランセスコ種の一般的な呼吸速度の経時変化について述べる。図28に対照区における呼吸速度の経時変化を示す。計測中のチャンバ内CO_2濃度は、換気をしたことによりほぼ0.05%から0.5%の範囲内となった。よって、CO_2濃度の変化が切り花に与える影響は無視できるものと考えられる。なお、グラフ上には1日の平均値をプロットした。すべての実験で呼吸速度が急激に上昇した後、急激に減少する経時変化を示し、呼吸速度が最大に達した直後に花弁が内側に湾曲する形で萎凋した。

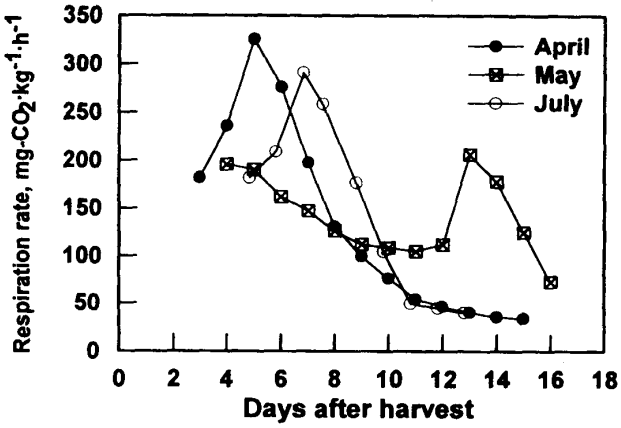


図28 対照区における呼吸速度の経時変化

カーネーションの萎凋型としては、Nicholsら[31]は、呼吸速度の増加およびエチレン生成の増加を伴って生体重が急減し、花弁が内側に湾曲する形の萎凋を示したと報告している。この型はクライマクテリック上昇型である。また、Wuら[48]は、カーネーションの品種により3種類の萎凋型、すなわちエチレン感受性の高い品種、エチレン感受性の低い品種、エチレン耐性の品種があるとし、エチレン感受性の高い品種がNicholsらの報告にあるようなクライマクテリック型の萎凋型を示したと述べている。また、一方のエチレン耐性の品種では呼吸速度が漸減し、それに伴い生体重も乾燥によると考えられる漸減を示し、その際、花弁の乾燥および褐変が報告されている。これら、3つの萎凋型と本実験結果を比較すると、フランセスコの萎凋時にみられる呼吸速度の急激な増加および減少とそれに伴って起こる生体重の急激な減少は、エチレン感受性品種のカーネーションの性質と一致した。老化時の花冠の観察結果においても同様であった。

図29にキセノン処理区における呼吸速度の経時変化を示す。キセノン処理区においても呼吸速度は、すべての試料でクライマクテリック上昇を示し、花冠はその後萎凋した。しかし、対照区においては収穫後5日、13日、6日にクライマクテリックマクシマムが現れたのに対し、キセノン処理区では10日から11日の間であった。Maxieら[25]は、温度20℃ でのカーネーション切り花の保存では、収穫後6日から9日でほとんどの花が萎凋し、平均的な花持ちは7日であるという結果を得ている。4月と7月の対照区の萎凋時期は、ほぼ、その結果と一致した。一方で、キセノン処理区でのクライマクテリックマクシマムは、既往の研究での平均値な花持ちの日数より3日から4日延長した。これは、無極性ガスによる水の構造化の鮮度保持効果を示すものと考えられる。なお、5月の対照区は、平均的な花持ちより6日長くなったが、これは試料にはほぼ同一の開花状態のものを選択しているものの、まれに生育ステージが異なっているものがあり、5月の対照区はその状態と思われる。

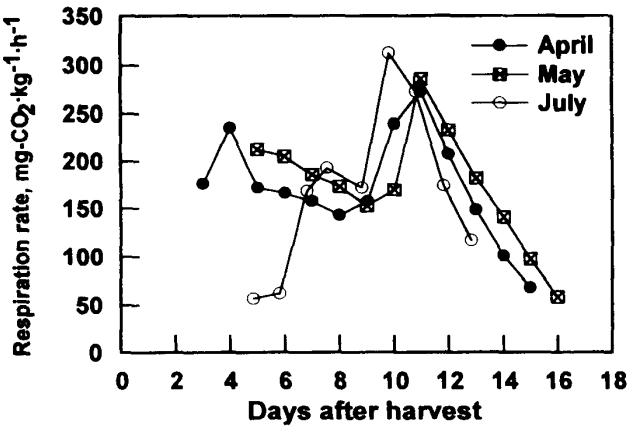


図29　キセノン処理区における呼吸速度の経時変化

第5節　水収支の変化

呼吸から推察される切り花の老化の過程と水収支の関係についての研究は、わずかで、多くの研究は生体重の増減と老化の関係のみに留まっている。ここでは、まずフランセスコ種における老化の過程と水収支の関係について言及し、続いて、無極性ガスによる処理が老化の過程に与える影響について述べる。

1　老化の過程と水収支

本研究で行った3回の実験において、対照区の呼吸速度と花弁の状態から推察される老化の過程と水収支との関係はほぼ同じ傾向を示した。図30に例として5月の対照区における呼吸速度、蒸散速度および吸水速度の経時変化を示す。グラフ上には各速度の1日の平均値をプロットした。図30に示したフランセスコの蒸散速度および吸水速度は、収穫後4日目から9日目まで減少傾向にあった。その後、9日目以降から12日目までの間、蒸散速度と吸水速度の減少の割合は同様に増加し、両者の差はほぼ一定で推移した。その間の呼吸速度は、収穫後4日目から9日目までは減少、9日目以降から12日目まではほぼ一定と、蒸散および吸水速度とは異なる変化を示した。その後、収穫後12日目から呼吸速度はクライマクテリック上昇を示したが、蒸散速度は収穫後12日目から収穫後13日目にかけて上昇したあと13日目に減少に転じ、その間吸水速度は急激に減少した。

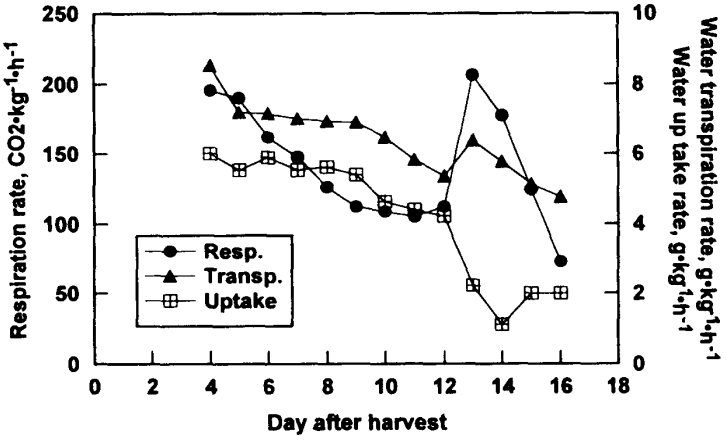


図30　5月の対照区における呼吸速度、蒸散速度および吸水速度の経時変化

クライマクテリック上昇期にみられる急激な吸水速度の低下には、花弁細胞の細胞膜の劣化による膜透過性の増大[9]が原因として考えられる。すなわち、クライマクテリック期に起こるような復元性のない萎凋時には膜透過性の増大で無機イオン、糖などの流失が起こり、細胞内の浸透ポテンシャルが増大する。膜透過性の増大によって引き起こされる花弁細胞内の無機イオンなどが細胞外へ流出する割合

は、萎凋中では新鮮な細胞の約5倍、萎凋後は約20倍におよぶといわれている[3]。

膜透過性の増大は、蒸散速度の増大にも関係していると考えられる。図30より、クライマクテリック期前までの蒸散速度は、吸水速度との差がほぼ一定の状態で変化した。しかし、クライマクテリック上昇以降、呼吸速度の増加に伴って蒸散速度が上昇し、一方で吸水速度が急激に減少した結果、その後も両者の差が増大したまま推移した。これは、花弁の細胞の膜透過性が増大した結果、水分が花弁から急激に蒸散したためと考えられる。その際の蒸散の多くは、試料の葉は萼近くの2枚のみであり、カーネーションの花弁には気孔がないとされること[46]から、花弁表面のクチクラ層から行われていると考えられる。このとき、花弁表面のクチクラ層の下は表皮細胞であり、萎凋中の花弁からの水分蒸発においては、細胞膜の劣化により細胞外に流出した水分が蒸発すると考えられる。従ってその際の蒸散速度の増加と同時に起こる吸水速度の減少が、クライマクテリック型のカーネーションにみられる急激な萎凋の原因と考えられる。これまで蒸散による水分損失により花弁の萎凋が進行すると理解されていたが、本章で示した吸水速度および蒸散速度の差から定量的に示された例は見あたらない。

クライマクテリック期以前の段階においても、切り花の呼吸代謝と水収支は密接な関係を持つと考えられる。本実験において、収穫後4日目から9日目にみられる呼吸速度が減少する期間は、吸水速度および蒸散速度ともほとんど変化はみられなかった。これは、切り花体内の水ポテンシャルが一定に保たれ、かつ、細胞膜の機能が十分働いているためと考えられる。その後、収穫後9日目以降からクライマクテリック上昇の直前、呼吸速度は横這いになったが、吸水速度は蒸散速度に追随する形で減少を示した。この現象については以下の原因が考えられる。Smithら[41]はカーネーション花弁内組織の電子顕微鏡写真を撮影し、クライマクテリック上昇以前にわずかながら液胞膜の崩壊が観察されたと述べている。またEzeら[7]の実験結果によると、カーネーション切り花からのエチレン発生が急激に増加する以前に細胞膜の透過性が増加し始め、膨圧が減少する。これら既往の研究を考慮すると、本実験結果でみられた現象は、クライマクテリック期以前に吸水速度が減少していることから細胞膜の劣化による膨圧の減少が始まっているが、蒸散速度が増加しないことから明らかであるように膜機能の消失まではいたらず、このため急激な萎凋を示さなかったと解釈される。このようなクライマクテリック以前の吸水速度の減少を示す老化過程は、既往の研究で行われている生体重変化のみから吸水速度を算出する方法では明瞭にはなっていなかった。すなわち、本法を用いて切り花の老化過程であるクライマクテリック上昇前段階での膨圧減少および膜透過性の増大による生体内部の水の動きを水収支から捉えることが可能であった。

2 無極性ガスによる水収支の変化

図31にキセノン処理区および対照区の蒸散速度と吸水速度の経時変化を示す。図中の実線と破線は、それぞれキセノン処理区と対照区のクライマクテリックマクシマムを示す。本章で行った3回の実験では、蒸散および吸水速度とも回を追って増加した。4月から7月は、気温が上昇する時期に当たる。実験中の保存温度は、常に20℃ に保たれた。しかし、生産中および輸送中の高温により、カーネーションの生理的活性が活発になった結果、蒸散速度が増加し、それに伴い吸水速度も増加したと考えられる。しかし、その間の呼吸速度に関しては、キセノン処理区は若干増加しているが対照区では逆に減少した。この減少については今後の検討が必要であると考えられる。

4月と7月の実験においてキセノン処理区の蒸散速度は、クライマクテリックマクシマムまでの期間では対照区とを比較して常に低く抑えられた。また、対照区の花持ちが13日間と長期であった5月の実験にあっても、キセノン処理区と対照区の蒸散速度の履歴は、ほぼ同一の変化を示した。この結果は、キセノン処理区は、対照区と比較して蒸散が抑えられる傾向にあることを示すと考えられる。また、常に対照区の蒸散速度が大きいにもかかわらず、キセノン処理区の吸水速度が対照区の吸水速度とほぼ同じか、大きい値を示す傾向にあった。すなわち、キセノン処理区の保水の状態は、対照区より良好であった。前章では、キセノン処理は切り花内部の水を保持し脱水を抑える働きを持つことが示唆された

が、同様のことが水収支の計測からも明らかになった。水ストレスによってエチレン生成が促進される例があることを考慮すると、キセノン処理によって内部の水分状態が良好に保たれたことが、クライマクテリックマクシマムが遅延する効果の一因であると考えられる。

第6節　本保存法の市場への適用性

本章の結果では、カーネーション切り花の花持ちが平均より3日から4日延長した。前章を含め得られた結果を総合すると、無極性ガスによる水の構造化が切り花の鮮度保持におよぼす効果は次の2点であると考えられる。1点は、水の構造化によって水の束縛が強くなり生体反応が抑制される効果である。別の1点は、同じく水の束縛が強くなることによって切り花からの蒸散が妨げられ、切り花内の水の状態が良好に保たれる効果である。これらの相乗効果が切り花の鮮度保持として働くと思われるが、後者は切り花にかかる水ストレスの軽減に効果的だと考えられる。国内の市場においては、ほとんどのカーネーション切り花は段ボールケース横詰めの乾式輸送で流通される。また、カーネーション切り花には出荷の前処理剤としてSTSが広く用いられるが、STS剤はエチレン発生の抑制にはなるが、脱水を抑える効果はない[14]。そのため、流通過程で水ストレスにさらされる可能性があり改善が求められている。このような問題を考慮すると、無極性ガスによる水の構造化は、新しい切り花の鮮度保持法として検討するに足る適用性を持つと考えられる。

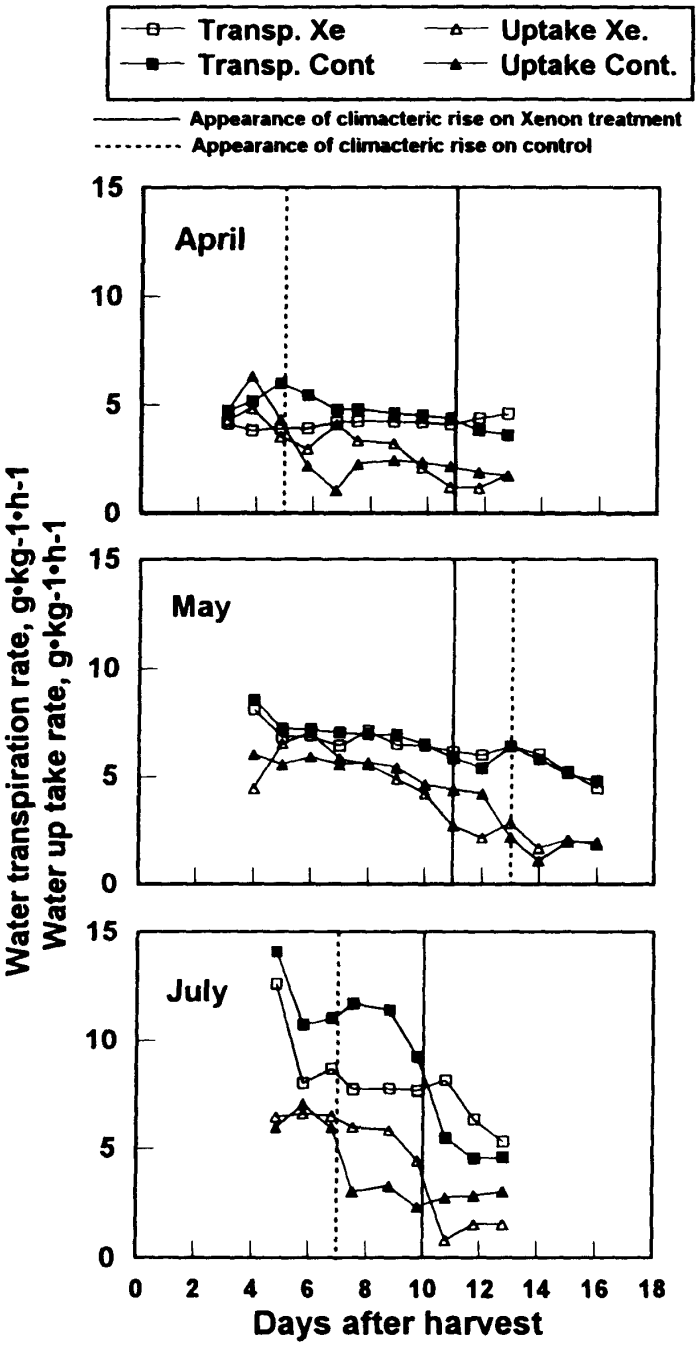


図31　キセノン処理区および対照区の蒸散速度と吸水速度の経時変化

第7節　摘要

無極性ガスによる処理を行ったカーネーション切り花の生理的応答を明らかにするために、切り花の呼吸速度、吸水速度および蒸散速度を連続および非破壊で計測するシステムを構築した。その際、計測チャンバ内の湿度変化の蒸散速度に対する影響を無視するために、チャンバ内湿度をほぼ一定に調整した。

本章で試料として使用したカーネーション切り花フランセスコ種はクライマクテリック上昇型の花卉であると確認された。また、キセノン処理を行ったカーネーション切り花のクライマクテリックマクシマムは、平均的な花持ちの7日より3日から4日遅延することが明らかになった。

本計測システムを用いて、呼吸代謝および水収支の計測を行った結果、クライマクテリック上昇時に吸水速度が減少し、蒸散速度が増加するという結果が得られた。これは、生理学的な現象である、クライマクテリック上昇時にみられる花弁の細胞膜の膜透過性の増大を反映したものと考えられた。すなわち、本計測システムを用いた呼吸代謝および水収支の同時かつ連続計測によって、細胞レベルの微視的な生理的状態変化を巨視的な計測を用いて非破壊で説明することが可能であった。

キセノン処理を行ったカーネーションは、対照区より蒸散速度が小さく吸水速度が大きい傾向にあった。切り花内部の水の状態が良好に保たれたことが、クライマクテリックマクシマムが遅延する効果の一因であると考えられた。以上の結果から、本保存法はカーネーション切り花の鮮度保持効果を持ち、実際の市場で十分な適用性を持つと結論された。

第6章　結　　論

第1節　本研究で得られた結果

本研究は、無極性ガスを利用して切り花の鮮度保持を行うことを目的として行われた。緒論において述べたように、無極性ガスは切り花内に溶解すると、細胞内の水が構造化し、生体反応が抑制され鮮度保持効果が得られると考えられ、オレンジキャンドル種のカーネーション切り花で効果が確認されている。本論ではとくに、水の構造化によって水の動きが変化することに着目し、主として、切り花内の水移動の変化という観点から、無極性ガスによる水の構造化の鮮度保持効果を解明することを目的とした。以下に各章ごとの要約を述べる。

1　切り花からの無極性ガスの脱離速度(第2章要約)

無極性ガスを利用した保存法のカーネーション切り花に対する適用性を明らかにするために、まず、切り花体内において無極性ガスによる水の構造化がどの程度持続するかを検討する必要がある。ここでは、無極性ガスの溶解の状態をその脱離過程から明らかにすることを目的とした。実験の結果以下のことが確認された。

1) 切り花および水からの脱離過程は、いずれも2次の反応速度式で回帰された。以下、切り花からの脱離過程を水と同様の単純な界面からの脱離であると仮定し、両者の比較をおこなった。
2) 水からの脱離速度は、脱離表面積に比例した。一方、切り花の脱離表面積と速度定数の比例関係は、比例定数が水とほぼ同じである例と、その約1/3程度低い値である例が見られた。両者の差は、切り花の生理的状態によって脱離する表面積が変化するためと考えられた。
3) 切り花の脱離過程は2時間から3時間の間でほぼ終了した。よって、その後のキセノン処理の効果は、大気下において、水に飽和して溶解しているキセノン、および、生体高分子の疎水基近傍で会合しているキセノンによると考えられた。

2　切り花内部における水の動的状態(第3章要約)

本章では、無極性ガスによる水の構造化が切り花内の水の動的状態に与える影響を明らかにするために、^{1}H-NMRによる縦緩和時間T_1の測定を行った。測定の結果以下のことが明らかになった。

1) 切り花子房部の平均的T_1は、約0.4秒から0.8秒の間にあり、時間の経過に伴い長くなった。しかし、48時間にわたってキセノン処理区のT_1は対照区より小さな値を示し、無極性ガスによる水の構造化によって、組織内の水の束縛が強くなったと考えられた。
2) 上記の平均的T_1を得た同一のデータについて2つの指数近似式を用い解析した結果、0.1秒から0.3秒の範囲および0.4秒から0.8秒の範囲にある2種類のT_1が得られた。短いT_1を持つ水成分(以下I成分と称す)は水の束縛が強い部分、また、長いT_1を持つ成分(以下II成分と称す)は水の束縛が弱い部分の水の動的状態を示すと考えられた。対照区ではII成分のT_1が長くなったが、キセノン処理区では顕著な変化が見られなかった。

3) 試料中の全プロトンに対する成分 II の存在割合では、対照区において時間の経過に伴い増減が観察された。キセノン処理区では、成分 II の存在割合の変化は低く抑えられた。これは、細胞の老化および細胞内の液胞と原形質間の水移動の抑制を示すと推察された。

3　無極性ガスによる水ストレスの抑制効果（第 4 章要約）

本章では、第 3 章の結果を受け、水の構造化によって切り花内部の水移動が低減すると仮定し、切り花の水ストレスの抑制効果として働く可能性について検討した。中性子イメージングによる結果を以下に示す。

1) 中性子イメージングによって、カーネーション切り花の水分分布を解析可能である良好な画像を得ることができた。
2) 0.5、0.6、0.7MPa のキセノン処理区では、水ストレス下においても階調値の最頻値は対応する対照区より明るい階調に存在し、切り花内の水分量が多いことが示された。その結果、無極性ガスによる処理は、対照区と比較して切り花内の水が保持されることが明らかになった。特に、子房部において水が保持される傾向が顕著であった。
3) 水分分布の等高線図の経時変化、および階調値の累積相対度数分布曲線の経時変化では、キセノン処理区が対照区と比較してカーネーション切り花内部の水分量が増加する傾向が顕著であった。すなわち、無極性ガスによって初期の吸水能力が維持されたと考えられた。

4　無極性ガスによる処理を行った切り花の生理的応答（第 5 章要約）

本保存法の効果を総合的に判断するために、無極性ガスによる水の構造化が切り花の生理的状態に与える影響を明らかにすることを目的とした。特に、水の構造化による水移動の変化と生理的状態変化との関係を明らかにするために、切り花の蒸散速度および吸水速度と、生理的状態と密接な関係にある呼吸速度を連続および非破壊で計測するシステムを構築し計測を行った。計測の結果以下のことが明らかになった。

1) 本章で試料として使用したカーネーション切り花フランセスコ種はクライマクテリック上昇型の花卉であることが確認された。
2) キセノン処理を行ったカーネーション切り花のクライマクテリックマクシマムは、平均的な花持ちの 7 日より 3 日から 4 日遅延することが明らかになった。
3) 呼吸代謝および水収支の計測を行った結果、クライマクテリック上昇時に吸水速度が減少し、蒸散速度が増加するという結果が得られた。これは、生理学的な現象である、クライマクテリック上昇時にみられる花弁の細胞膜の膜透過性の増大を反映したものと考えられた。
4) キセノン処理を行ったカーネーションは、対照区より蒸散速度が小さく吸水速度が大きい傾向にあった。切り花内部の水の状態が良好に保たれたことが、クライマクテリックマクシマムが遅延する効果の一因であると考えられた。以上の結果から、本保存法はカーネーション切り花の鮮度保持効果を持ち実際の市場で十分な適用性を持つと結論された。

第 2 節　結論および今後に残された課題

本研究では、切り花内の水移動の変化という観点から、無極性ガスによる水の構造化による鮮度保持効果についての解明を試みた。^{1}H-NMR の測定では、キセノン処理を行った切り花内において水の束縛の状態が強くなったことが確認され、細胞内から細胞外への水移動の抑制が推察された。中性子イメージングによる水分分布の測定では、水ストレス後の水分量はキセノン処理を行った試料で多かった。また、キセノン処理区は対照区より、常に水収支が高い値を示した。以上を総合すると、無極性ガスによる水の構造化によって、切り花内から外部へ水が移動しにくくなったことが示された。結論としては、水の構造化によって、切り花内部から外へ向けての水移動が抑制されることで切り花内の水分状態が良好に保たれ、結果的に萎凋の延長など鮮度保持効果の一因となると考えられた。

しかし、無極性ガスによる水の構造化が、どのように上述した水移動を抑制させたのかは明確にはな

らなかった。本論では、構造化によって水の束縛の状態が強くなったことがT_1測定から示されたが、無極性ガスによる疎水性相互作用が、細胞外への水移動を防ぐ要因は他にも考えられる。例えば、生体反応自体が不活発になり生体膜の劣化が遅延すること、あるいは疎水性相互作用による生体膜のコンホメーション変化により水移動が起こりにくくなることである。このような水の構造化が生体に与える影響のメカニズムの解明は、鮮度保持に必要な無極性ガス分圧や処理温度などを検討する上で手助けになると考えられる。今後は、水の構造化が生体に与える影響についてより詳しく検討する必要性があると思われる。また、希に無極性ガスによる処理で白斑が生じた。図32に白斑の顕微鏡写真を示す。白斑が生じる原因としては、試料を高圧下に置くこと、あるいはその後の復圧によるダメージなどが挙げられるが、明確な原因を明らかにすることはできなかった。このような無極性ガス処理によるダメージの有無についても今後検討する必要がある。

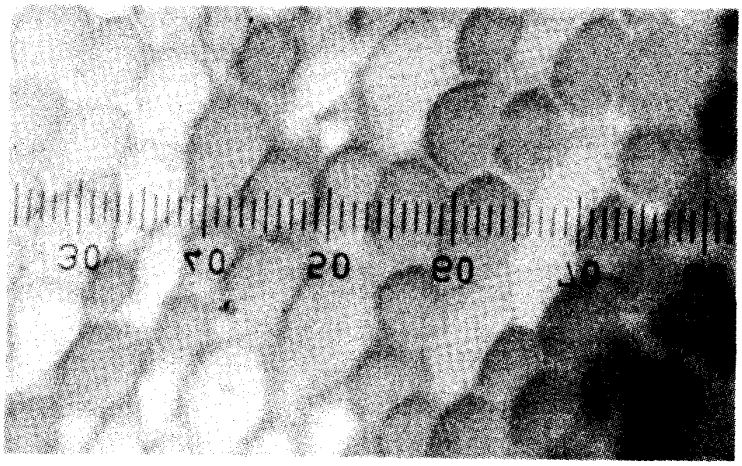


図32　カーネーションに生じた白斑

本保存法を市場で用いる場合の問題点としては、本報において無極性ガスとして使用したキセノンガスが高価であること、および、処理に当たって高圧をかけるためそれに耐える施設を用いる必要があることが挙げられる。それらの問題について、コスト面に関しては、代替ガスや使用したガスの再利用などが考えられる。また、高圧処理に関しては、現在は確実な効果を期待するために高圧で処理を行っているが、前述した麻酔のモデルを考慮すると常圧に近いガス分圧で効果が現れ、供給圧力を低くできる可能性がある。今後は、最適な処理時のガス分圧の解明など、より実用に近い研究を進める必要がある。

謝　辞

本論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・環境工学専攻瀬尾康久教授には終始適切な御指導また懇切なる御校閲を賜りました。ここに深く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたりましては、東京大学大学院農学生命科学研究科生物・環境工学専攻大下誠一助教授には終始懇切な御指導および貴重な御助言、公私にわたる御厚情を頂きました。心より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・環境工学専攻助手川越義則氏には、実験の遂行、研究の全般にわたり献身の御助言、御協力を頂きました。氏の細やかな御配慮に、厚く感謝いたします。

琉球大学農学部生物生産学科生産システム工学講座秋永孝義教授、同上野正実教授、同川崎聖司助教授、同鹿内健志助教授には、研究活動を行う上で貴重な御助言、御協力、および暖かい励ましを頂きました。ここに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中西友子助教授および日本原子力研究所東海研究所中性子科学センター松林政仁氏には、第4章における中性子水分イメージングの遂行にあたりまして、懇切なる御教授および多大な御協力を頂きました。深く御礼申し上げます。

本研究における実験装置および切り花の入手に際しては、タバイエスペック(株)中村謙治氏、第一園芸プランテック(株)是枝一春氏の多大なる御尽力を頂きました。また実験装置の作成では、東京大学大学院農学生命科学研究科技官井本博美氏に貴重な御助言、ご協力を頂きました。心より感謝申し上げます。

宇都宮大学農学部岩渕和則助教授には、学部・修士時代から今日まで、研究に対するアプローチは氏の御指導の賜であり、常に貴重な御助言を頂きました。また、国立農業工学研究所大井節男氏には、研

究活動を行う上で御助言や励ましを頂きました。ここに、深く御礼申し上げます。

記 号 表

x_2	：キセノンの溶解度	—
C	：チャンバ内のキセノン濃度	$mol \bullet kg^{-1}$
C_{chm}	：チャンバ内の CO_2 濃度—	
Ce	：平衡濃度	$mol \bullet kg^{-1}$
J_Q	：呼吸速度	$mg\text{-}CO_2 \bullet kg^{-1} \bullet h^{-1}$
J_{tran}	：蒸散速度	$g \bullet kg^{-1} \bullet h^{-1}$
J_{up}	：吸水速度	$g \bullet kg^{-1} \bullet h^{-1}$
k	：速度定数	$s^{-1} \bullet mol^{-1} \bullet kg$
M	：試料の質量	kg
M_0	：熱平衡における磁化	$A \bullet m^{-1}$
M_t	：時間 t 後の磁化	$A \bullet m^{-1}$
P_{chm}	：チャンバ内圧力	Pa
Q	：容器内における CO_2 の質量	mg
Q'	:t 時間後の容器内における CO_2 の量	mg
R	：気体定数	$8.314\ J \bullet mol^{-1} \bullet K^{-1}$
p_T	：温度 T での水の密度	$g \bullet cm^{-3}$
T	：温度	K
t	：時間	—
T_1	：縦緩和時間	s
V	：水の体積	cm^3
V_{chm}	：チャンバ容積	m^3
W	：水の質量	g
W_{tran}	：任意の時間における試料の質量	g
$W_{tran'}$	:t 時間後における試料の質量	g
W_{up}	：任意の時間における吸水速度計測容器内の水の質量	g
$W_{up'}$	:t 時間後における吸水速度計測容器内の水の質量	g

参考文献

1. 相賀徹夫 1988 園芸植物大事典 1, 第 1 版 ,483-492, 小学館 , 東京
2. 荒川洋治 1998 水の書 , 第 1 版 , 共立出版 , 東京
3. Borochov A. Woodson W.R.1989 Physiology and Biochemistry of Flower Petal Senescence, Hort. Rev.,11: 15-43
4. Brochov A. Mayak S. Broun R.1982 The involvement of water stress and ethylene in senescence of cut carnation flowers, Journal of Experimental Botany,33: 1202-1209
5. Brummer R.G. Burnett B.B. Schreiner H.R. 1967 Effects of Helium Group Gases and Nitrous Oxide on HeLa Cells., J. Cell. Physiol.,67: 385-392
6. Ewing G.J. Ionescu L.G.1974 Dissociation Pressure and Other Thermodynamic Properties of Xenon-Water Clathrate. Journal of Chemical and Engineering Data,Journal of Chemical and Engineering Data, 19(4): 367-369

7. Eze J.M.O. Mayak S. Thompson J.E. Dumbroff B.D.1986 Senescence in Cut Carnation Flowers Temporal and Physiological Relationships among Water Status Ethylene Abscisic Acid and Membrane Permeability, Physiologia Plantarum,68: 323-328
8. Gadian D.G.1995 NMR and its applications to living system,Scecond Edition,187, Oxford Science Publications,Oxford
9. Halevy A.H. Mayak S. 1981 Senescence and postharvest physiology of cut flowers part 2. ,Hort. Rev.,3: 59-141
10. 橋本篤 大下誠一 1996 水の構造化を利用した野菜の貯蔵，農業機械学会誌 ,58(5):35-41
11. 平沢正 1999 植物の環境応答- 生存戦略とその分子機構-, 第1版 ,50-58, 秀潤社，東京
12. 市村一雄 1996 切り花における収穫後の生理機構 (1), 農業および園芸 ,71(3):23-26
13. 稲松照子 1987 センサー実用事典（第一版）（大森豊明編），第1版 ,130-131, フジ・テクノシステム，東京
14. 井上元章 1997 切り花の鮮度保持マニュアル（日本花普及センター監修），第2版 ,4-9, 流通システム研究センター，東京
15. 井上眞理 賀来章輔 1994 植物体の環境ストレス応答の ^{1}H-NMR による研究，低温生物工学会誌 ,40(2):16-24
16. Ishida N. Kobayashi T. Koizumi M. Kano H.1989 ^{1}H-NMR Imaging of Tomato Fruits, Agric. Biol. Chem., 53(9): 2363-2367
17. Iwaya-Inoue M. Yoshimura K. Yamasaki H. Kaku S.1993 Characteristic Changes in Relaxation Times of Water Protons in Vigna radiata Seedlings Exposed to Temperature Stress, Plant Cell Physiology, 34(5): 705-711
18. Jones R.B. Hill M.1993 The Effect of Germicides on the Longevity of Cut Flowers, J. Amer. Soc. Hort. Sci., 118(3): 350-354
19. Kaku S. Iwaya-Inoue M.1990 Factors Affecting the Prolongation of NMR Relaxation Times of Water Protons in Leaves of Woody Plants Affected by Formation of Insect Galls, Plant Cell Physiology, 31(5): 627-637
20. Kaku S.1993 Monitoring Stress Sensitivity by Water Proton NMR Relaxation Times in Leaves of Azaleas That Originated in Different Ecological Habitats, Plant Cell Physiology, 34(5): 535-541
21. 賀来章輔 井上真理 1993 ^{1}H-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
22. 隈元保子 渡辺剛史 井上真理 1998 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
23. 功刀滋 1995 生体物理化学，第1版 ,104-110, 産業図書，東京
24. Lide D.R. 1999 CRC Handbook of Chemistry and Physics , CRC Press, 80th edition 886-889
25. Maxie E.C. Farnham D.S. Mitchell F.G. Sommer N.F. Parsons R.A. Snyder R.G. Rae H.L.1973 Temperature and Ethylene Effects on Cut Flowers of Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.), J.Amer. Soc. Hort. Sci., 98(6): 568-572
26. Mayak S. Halevy A.H. 1971Water-stress as the cause of failure of flower bud opening in iris. ,J.Am.Soc.Hort.Sci.,96: 482-483
27. Mayak S Garibaldi E.A. Kofranek A.M.1977 Carnation flower longevity, Microbial Populations as related to silver nitrate stem impregnation, J. Amer. Soc. Hort. Sci., 102(5): 637-639
28. Mayak S. Vaadia Y. Dilley D.R.1977 Regulation of Senescence in Carnation (*Dianthus caryophyllus*) by Ethylene, Plant Physiology,59: 591-593
29. Mohr H. Schopfer P1995 Plant Physiology,First Edition,33, Springer,Berlin

30. 中西友子 1998 中性子線による植物中の水のイメージング，化学と生物 ,36(12):789-797
31. Nichols R.1968 The Response of Carnations (*Dianthus Caryophyllus*) to Ethylene, Hort Science,43: 335-349
32. 日本化学学会 1993 化学便覧基礎編改訂 4 版，改訂 4 版，II 156- II 157, 丸善，東京
33. 農林水産省統計情報部 19994 次農林水産統計表- 成 9 年-10 年-, 第 1 版 ,430-433, 農林統計協会，東京
34. Oshita S. Seo Y. Kawagoe Y1996 Extension of vase life of cut carnations by structured water ,Acta Horticulturae,440: 657-662
35. Oshita S. Seo Y. Kawagoe Y.1998 Relaxation Time of Protons in Intracellular Water of Vegitables and Its Respiration, 13th International Congress on Agricultural Enfineering, International Commission of Agricultural Engineering,6: 109-108
36. 大下誠一 M.A. ラハマン 川越義則 瀬尾康久 橋本篤 1997 水の構造化による農産物の貯蔵（第 2 報)- 農産物の代謝抑制-, 農業機械学会誌 ,59(1):29-35
37. 大下誠一 橋本篤 瀬尾康久 1996 水の構造化による農産物の貯蔵（第 1 報)- 植物細胞の代謝抑制-, 農業機械学会誌 ,58(6):31-37
38. 大城閑 細川宗孝 矢澤進 1998 花卉園芸で活躍するバイオテクノロジー，生物と化学 ,36(8):512-522
39. Pauling L. 1961 A Molecular Theory of General Anesthesia, Science, 134 No.3471: 15-21
40. 佐藤茂 1993 高等植物におけるエチレン生成の生化学，化学と生物 ,31(7):430-439
41. Smith M.T. Saks Y. van Staden J.1992 Ultrastructural Changes in the Petals of Senescing Flowers of Dianthus caryophyllus L., Annals of Botany,69: 277-285
42. Snaar J.E.M. Van As H.1992 Probing Water Compartments and Membrane Permeability in Plant Cells by 1H NMR Relaxation Measurements, Biophysical Journal,63: 1654-1658
43. Spikman G.1986 The effect of water stress on ethylene production and ethylene sensitivity of freesia inflorescences, Acta Horticulturae,181: 135-140
44. 上平恒 逢坂昭 1989 生体系の水，第 1 版，講談社サイエンティフィック，東京
45. 上平恒 木田惇 1982 プロピオン酸- 水および *t*- ブチルアルコール- 水系における各成分の自己拡散係数，日本化学学会誌 ,124:539-542
46. van Doorn W.G. 1997Water relations of cut flowers ,Hort. Rev. ,18: 1-85
47. Woodson W.R. Park K.Y. Larsen P.B. Wang H.1991 Expression of Ethylene Biosynthetic Pathway Transcripts in Senencing Carnation Flowers, Plant Physiology,99: 526-532
48. Wu M.J. van Doorn W.G. Reid M.S.1991Variation in the senescence of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) cultivars. II . Comparison of sensitivity to exogenous ethylene and the ethylene binding,Scientia Horticulturae,48:109-116