

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23658207

研究課題名(和文) 蛍光を利用したキセノン水和物形成過程の可視化

研究課題名(英文) Visualization of the process of water structured by fluorescence imaging

研究代表者

大下 誠一 (Oshita, Seiichi)

東京大学・農学生命科学研究科・教授

研究者番号：00115693

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：蛍光試薬(ウラニン)を溶解させた水溶液にキセノンガスを加圧溶解させ、水が構造化する過程を蛍光強度の変化として捉えた。一方、構造化が進んでキセノン水和物が形成された場合には、構造化した水と水和物結晶が混在する状態になる。この状態を、蛍光強度の違いにより可視化した。その結果、水の構造化の程度の視認に最適なウラニン濃度は 5×10^{-11} M、気体水和物と混在する液状の水の識別では 5×10^{-5} Mであることが示された。

研究成果の概要(英文)：Xenon gas was pressurized and dissolved into water containing fluorescent reagent (uranine) and the process of the water structured was visualized by the difference in fluorescent intensity. In this case, the appropriate concentration of uranine was revealed to be 5×10^{-11} M. Once xenon hydrate was generated, the solution became a mixture of structured water in liquid phase and hydrate in solid phase. In this case, the appropriate concentration of uranine to recognize each phase was 5×10^{-5} M.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農業工学・農業情報工学

キーワード：水の構造化 蛍光 キセノンガス 気体水和物

1. 研究開始当初の背景

生物試料の保存、生体の冬眠あるいは麻酔のメカニズムに関連して、麻酔ガスが生体中で水和物結晶を形成したり、水を構造化させたりするという議論がある。

この議論は、1961年の Pauling、Millerらの論文に端を発し、今日まで議論や検証が行なわれてきている。例えば Pauling は、全身麻酔の際の分圧と、その気体が水和物結晶となる際の平衡圧との関係を示した。これに対し、体内での温度・圧力条件が水和物結晶生成に必要な条件からかけ離れているため、麻酔学の分野では現在のところ水和物結晶の生成による麻酔説は受け入れられていない(例えば Miller, 1969)。

しかし、その説は完全に否定されたわけではなく、それ以降も研究は行なわれた。水和物生成ガスの麻酔効果については、脂質(すなわち細胞膜など)への溶解による現象論的解釈が主流であり、細胞や組織、あるいは個体などの生体試料との関連性が比較的多数研究されている。しかし、水和物結晶との関連について議論している研究は、現在でもほとんどない。しかも、細胞や組織における水の構造化や気体水和物の形成過程は未解明のまま残されている。

近年、Xe ガスによる水の構造化を用いて、農産物や植物細胞の代謝を抑制する研究が行われている。大下ら(1996)は、Xe 分圧 0.25~0.94MPa、温度 6°C の条件でモヤシに Xe ガスを溶解させると、Xe ガス分圧が高くなる程モヤシ付着細菌の増殖が低下したことを報告した。また、モヤシの変色についても、Xe ガスで水の構造化を行うことで、色変化が抑制され、品質がより保持されることを報告している。大下ら(1996)は、オオムギ子葉鞘細胞において、288K 下での原形質流動速度が、Xe 分圧 0.5MPa 下では、大気圧下における速度 $5.9 \mu\text{m/s}$ から $4.1 \mu\text{m/s}$ に低下したことを指摘し、Xe ガスを用いた水の構造化による代謝抑制の可能性を示した。また、Xe 分圧 0.4~0.7MPa、温度 288K 条件下で Xe ガスによって水の構造化を行うと、7日間保存後の細胞の生存率が上昇することも報告した。大下ら(1997)は、ブロッコリ断片において、Xe 分圧 0.39MPa、温度 279K 条件下で Xe ガスによって水の構造化を行い、切断面の酸化による褐変を調べた結果、Xe ガス処理区では褐変が生じなかったことを指摘した上で、呼吸代謝が抑制される可能性を示した。松嶋ら(2000)は、カーネーション切り花において、Xe 分圧 0.5MPa、温度 20°C 条件下で 24 時間水の構造化を行った結果、切り花内部の水分が良好に維持され、花持ちの期間が延長されたことを報告した。Zhan(2008)は、アスパラガスに 1.1MPa、4°C の Ar-Xe(圧力比 2:9)を 24h 処理してから 12 日間貯蔵した結果、呼吸および苞の開き速度が抑制され、ビタミン C の損失が抑制され、通常貯蔵と比べ、より品質が保たれたことを報告した。

安藤(2010)は、組織内に形成する気体水和物の割合を 35%以下に留めることで、保存温度 5°C において、腐敗に至るまでの期間を延長できることを報告した。王ら(2011)は、オオムギ子葉鞘細胞において、1°C、1.0MPa を適用した Xe 保存区では凍結保存区より顕著に高い生存率が維持され、細胞に与える損傷が少ないことを報告した。

上記の様に、水の構造化及び水和物形成・解離は農産物の長期保存に大きく貢献する可能性が示されている。しかし、水の構造化の程度の視認、水和物形成・解離プロセスの詳細な観察は未だ達成されていない。

2. 研究の目的

水に無極性気体を溶解させると水分子の熱運動がバルク水よりも抑制された状態になる(上平、多田羅, 1998)。これを水の構造化と言うが、構造化が更に進むと水素結合した水分子のかごの中に気体分子が入った構造の気体水和物が形成される(鈴木, 1980)。

一方、水の構造化や気体水和物が食品の保存性を向上させることが報告されているが(大下ら, 1996; Zhang et al., 2008)、構造化の程度や水和物の形成割合などは明らかにされていない。これらの知見は、保存性向上のメカニズム解明に不可欠であるが、構造化の程度を簡便に知る方法が無いため、細胞や組織における気体水和物の形成過程は未解明のままに残されている。

そこで本研究は、蛍光画像を利用して水の構造化の程度及び気体水和物の形成過程を可視化することを目的とした。

3. 研究の方法

蛍光色素ウラニン($\text{C}_{20}\text{H}_{10}\text{O}_5\text{Na}_2$)水溶液を Xe 雰囲気下に曝し、水の構造化及び気体水和物形成を進行させ、その過程の輝度を比較することで、水の構造化の程度の視認、気体水和物形成箇所の観察が可能であるか検討した。

ウラニンを $5 \times 10^{-3} \sim 5 \times 10^{-13}\text{M}$ の各濃度になるよう溶解させ、耐圧容器(柴田科学(株))に封入し、ガスボンベを接続して Xe を導入した。サーモレギュレータ(Thermomix UB, B.Braun)によってブラインを耐圧容器の二重壁内に循環させて、容器内温度が 1°C になるよう制御した。その様子を蛍光顕微鏡(BX-51, OLYMPUS)によって観察し、その映像を高速ビデオカメラ(VCC-H1600C, デジモ)によって撮影した。また、その画像から画像全体の輝度値の平均値と標準偏差を算出した。

4. 研究成果

(1) 結果と考察

ウラニン濃度 $5 \times 10^{-5}\text{M}$, $5 \times 10^{-7}\text{M}$, $5 \times 10^{-9}\text{M}$, $5 \times 10^{-11}\text{M}$ で行った実験において、水の構造化が進むと蛍光は褪色した(図 1)。また、気体水和物形成も蛍光は褪色し、気体水和物が形

成された箇所は暗く蛍光を発しなかった(図2)。

ウラン濃度 $5 \times 10^{-3} \text{M}$ においては、気体水和物の急速な形成とウラン粒子の析出が起り、水の構造化に伴う蛍光褪色は観察不可能であった。また、ウラン濃度 $5 \times 10^{-13} \text{M}$ においては、蛍光強度が低過ぎた為、水の構造化に伴う蛍光褪色は観察不可能であった。

ウラン濃度 $5 \times 10^{-5} \text{M} \sim 5 \times 10^{-11} \text{M}$ の範囲では、水の構造化に伴う蛍光褪色はウラン濃度が低濃度である程、顕著に表れた。よって、蛍光観察による水の構造化の程度の視認を行うのに最適なウラン濃度は、蛍光観察可能な濃度の中で最も低濃度である $5 \times 10^{-11} \text{M}$ であることが示された。

気体水和物と混在している溶液状態の水を、蛍光観察により視認できることが示された。その輝度は、ウラン濃度が高濃度である程、気体水和物との輝度の差が大きかった。よって、蛍光観察により気体水和物中に残存する溶液状態の水を識別するのに最適なウラン濃度は、蛍光観察可能な濃度の中で最も高濃度である $5 \times 10^{-5} \text{M}$ であることが示された。

これらの水の構造化及び気体水和物形成に伴う蛍光褪色の要因は以下の様に考えられる。ウラン分子のサイズは約 $9 \times 10^{-10} \text{m}$ と算出され、気体水和物の水分子のケージサイズ $7.95 \times 10^{-10} \text{m}$ 、 $8.60 \times 10^{-10} \text{m}$ (菅原武, 2005) よりも大きい。したがって、気体水和物の水分子のケージ内にウラン分子は取り込まれない。その為、気体水和物が形成されると、溶媒和する水分子が無くなる為ウラン分子は析出し、蛍光を発しなくなると考えられる。一方、水の構造化に伴う蛍光褪色の要因には、濃度消光、溶媒緩和による溶媒効果の二つが考えられる。濃度消光とは、蛍光色素濃度が一定濃度以上になると蛍光が褪色する現象のことであり、水の構造化が進行することで、液体部分が濃縮され見かけのウラン濃度が上昇することで起こると考えられる。溶媒緩和による溶媒効果とは、溶媒分子の再配向により蛍光が安定化する現象のことであり、水の構造化によって溶媒分子の再配向が阻害されることで蛍光が褪色すると考えられる。しかし、水の構造化に伴う蛍光褪色はウラン濃度が低濃度な程顕著に表れた。

これは濃度消光による蛍光褪色機構とは矛盾するので、水の構造化に伴う蛍光褪色の要因は濃度消光ではなく、溶媒緩和による溶媒効果だと考えられる。

(2) 結論

- ①水の構造化及び気体水和物形成に伴って蛍光が褪色したことから、蛍光画像による水の構造化の程度の視認の可能性が示された。
- ②実験を行う上で最適なウラン濃度は、水の構造化の程度の視認は $5 \times 10^{-11} \text{M}$ 、気体水

和物と混在する液状の水の識別は $5 \times 10^{-5} \text{M}$ であることが示された。

- ③水の構造化に伴う蛍光褪色の要因は溶媒緩和による溶媒効果であり、気体水和物形成に伴う蛍光褪色の要因は水分子のケージ内にウラン分子が取り込まれない為であると考えられる。

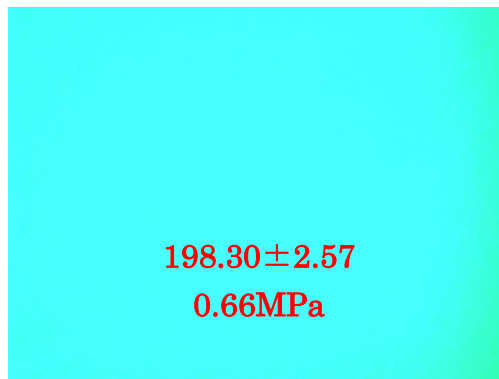


図 1 (a) 0h

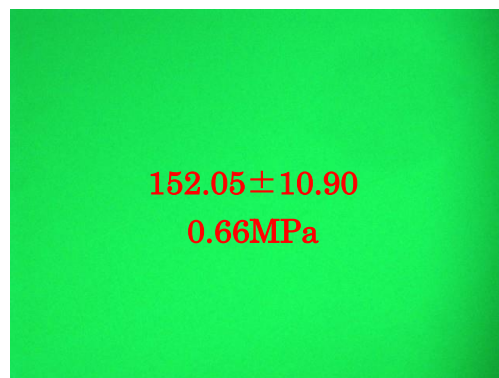


図 1 (b) 1h

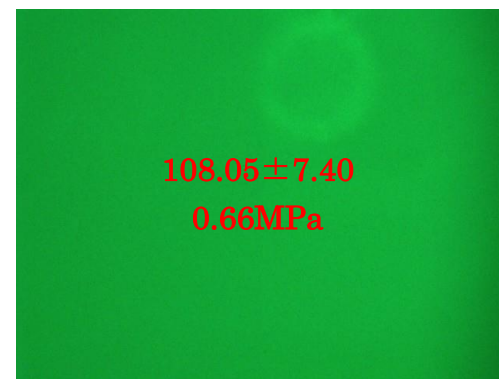


図 1 (c) 2h

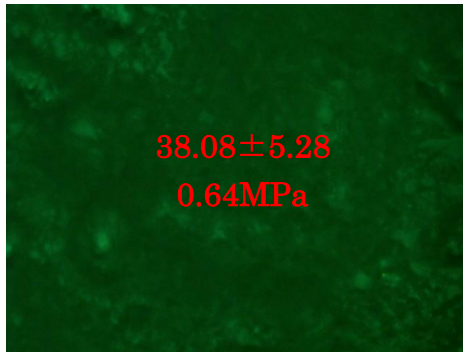


図 1 (d) 23h

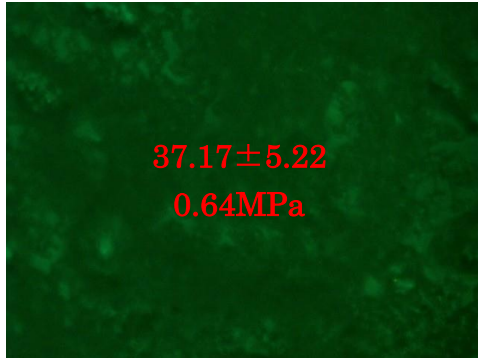


図 1 (e) 24h

図 1 ウラニン濃度 $5 \times 10^{-11} \text{M}$ における
0h(a), 1h(b), 2h(c), 23h(d), 24h(e)の蛍光画像
(画像中央数字は輝度、2h は気体水和物
形成直前の時間)

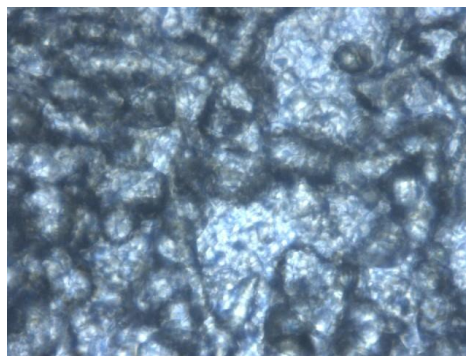
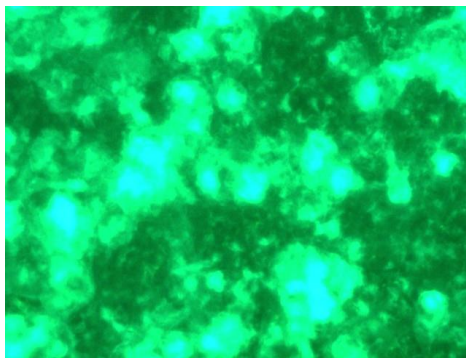


図 2 ウラニン濃度 $5 \times 10^{-5} \text{M}$ における
44h 後の蛍光画像(上図)と通常の顕微鏡
画像(下図)
(蛍光の明るい部位が液体状の水)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① 市原裕也, 大下誠一, 牧野義雄, 川越義則, 王蕾: 蛍光画像を利用した水の構造化の程度の推定, 低温生物工学会誌, 57, 査読有, 2011, 67-70

[学会発表] (計 1 件)

- ① 市原裕也, 王蕾, 大下誠一, 牧野義雄, 川越義則: 蛍光画像を利用した水の構造化の可視化の試み, 第 70 回農業機械学会年次大会, 2011 年 9 月 28 日, 弘前大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大下誠一 (OSHITA SEIICHI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授
研究者番号: 00115693

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし