

# 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

—NMRによるプロトン緩和時間の観察—

Formation of Structured Water and Gas Hydrate by the Use of Xenon Gas  
in Vegetable Tissue

—Observation of the Proton Relaxation Time by NMR—

安藤 寛子\*      鈴木 徹\*\*

Hiroko ANDO      Toru SUZUKI

川越 義則\*      牧野 義雄\*      大下 誠一\*†

Yoshinori KAWAGOE      Yoshio MAKINO      Seiichi OSHITA

\*東京大学大学院農学生命科学研究科 (113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1)  
 Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo  
 (1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113- 8657)

\*\*東京海洋大学海洋科学部食品生産学科 (108-8477 東京都港区港南 4-5-7)  
 Department of Food Science and Technology, Tokyo University of Marine Science  
 and Technology  
 (4-5-7 Konan, Minato-ku, Tokyo 108- 8477)

## Summary

Freezing is a valuable technique for food preservation. However, vegetables are known to be softening remarkably after freezing and thawing process. It is expected to find alternative technique instead of freezing. Recently, the application of structured water and/or gas hydrate had been attempted to prolong the preservation of vegetable. In this study, the formation process of structure water and/or gas hydrate in pure water and carrot tissue was investigated by using NMR relaxation times,  $T_1$  and  $T_2$ , of which applying condition was up to 0.4MPa and 0.8MPa at 5°C. Under the pressure of 0.4MPa, no gas hydrate was appeared, however, at 0.8MPa, formation of gas hydrate was recognized in both water and carrot tissue. Once the gas hydrate formation process in carrot tissue started,  $T_1$  and  $T_2$  increased remarkably. After that, as the gas hydrate developed, then  $T_1$  and  $T_2$  turned to decrease. Since this phenomenon was not observed in pure water, it is suggested that behavior of NMR relaxation time just after the formation of gas hydrate in carrot tissue may be peculiar to compartment system such as inter and intracellular spaces.

**Keywords :** Preservation technique, Gas hydrate, NMR relaxation time, Water, Carrot tissue

†Fax: +81 3-5841-8174 E-mail: aoshita@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

## 1. 緒 言

凍結保存は食品の劣化を抑え、その品質を長期にわたり保持できる保存法である。常温において劣化の早い野菜などの農産物も、凍結保存法を用いることで長期間、その品質を保つことが期待できる。しかし、生鮮農産物を凍結・解凍すると組織は著しく軟化し、水々しい張りのある構造を失ってしまう。そのため、この変化を防ぎ、生鮮状態を長期間保持可能な、新たな保存法の開発が望まれている。しかし、未だ凍結保存法に変わる有効な長期保存法は見出されていない。

高圧・低温で水に疎水性ガスを封入すると、疎水性ガス分子を中心に水分子が水素結合によって籠状構造を取り、それらが多数結合した巨視的結晶構造を成した氷様結晶クラスレート水和物が生成される。このクラスレート水和物の生成直前の過程では、構造化した水と呼ばれる氷状のクラスターを多く含んだ水が生成されると考えられている<sup>1)</sup>。クラスレート水和物や構造化した水は、物理化学的な視点から様々な研究が行われ、その物性や構造特性が少しずつ明らかにされている<sup>2-5)</sup>。しかしながら、こういった現象の実践的な利用は、天然ガスなどの輸送技術<sup>6-8)</sup>に留まり、生物学的な応用例や利用法の検討はほとんどされてこなかった。

こういったなか近年、疎水性ガスを農産物組織内に溶解させることで、常温で農産物の保存性を向上させる試みがなされた。1996年、大下ら<sup>9)</sup>はオオムギ子葉鞘の細胞内溶液にキセノンガス(以下 Xe)を常温下で溶解させることで、原形質流動速度の低下、細胞片の生存率の向上を示し、その原因として細胞内の水の構造化を示唆した。その後、モヤシ、<sup>10)</sup> ブロッコリー<sup>11)</sup>、<sup>12)</sup>、カットキャベツ<sup>13)</sup>で Xe による水の構造化を利用した変色、呼吸の抑制、保存期間の向上が示された。しかしながら、農産物内の水の構造化を直接明らかにした研究例はない上、農産物の様な組織構造を持った材料内でのクラスレート水和物の生成さえ明らかにされていない。また、上記疎水性ガスによる水の構造化を用いた農産物の保存法の検討は常温下で行われたものであり、少なからず圧力付加を要する。

この操作を低温下で行えば水の構造化あるいはクラスレート水和物の生成は、より低い圧力で達成されるという利点が考えられる。さらに、低温下では農産物の保存効果の促進も期待される。しかしながら低温やマイナス温度領域での疎水性ガスの利用検討はほとんどされて来なかった。そこで、疎水性ガスをを用いた水の構造化を低温・マイナス温度領域で利用する農産物保存法の可能性を探ること究極目的としながら、本研究ではまず、基礎として、1) 低温域での疎水性ガスの純水への溶解、およびクラスレート水和物の生成前後での水の動態変化、また、2) 低温域で疎水性ガスの農産物内への溶解、およびクラスレート水和物生成前後での組織内溶液の動態変化を NMR (Nuclear magnetic resonance) 緩和時間より検討した。

NMR は試料の非破壊測定を可能にし、生体に近い状態下における情報が得られる。特にプロトン NMR は緩和時間、 $T_1$ 、 $T_2$ の測定を通して水分子の分子間相互作用の情報を与える<sup>14)</sup>。そのため従来、NMR 緩和時間の測定は、生体組織内の水の状態を把握する方法、特に細胞内外の水の状態を理解するのに適した方法として利用されてきた<sup>15)</sup>。また、 $T_1$ は溶液中の水の自己拡散や粘度といった物理的状態の変化<sup>16)</sup>や、細胞膜の状態変化<sup>17)</sup>を間接的に知ることにも可能である。そして、 $T_2$ は $T_1$ で得られる情報より、時間スケールの短い緩和時間を示し、タンパク質の水和状態の変化を観測した研究例<sup>18)</sup>が報告されている。しかし、NMR を利用したクラスレート水和物に関する研究では、疎水性ガス分子の状態を調べる目的でホストガス分子の緩和時間の測定<sup>19)</sup>、<sup>20)</sup>やケミカルシフト<sup>21)</sup>の測定例が報告されているものの、クラスレート水和物のプロトン緩和時間に関する報告はほとんどない。したがって本研究で試みる純水、及び、農産物内でのクラスレート水和物生成過程における NMR プロトン緩和測定は、基礎科学的に貴重な情報が得られるものと期待される。本研究では、凍結保存実験でもよく使用されているニンジン組織を用い、疎水性ガスには、既往の応用研究でも使用された比較的溶解度の高い Xe を用いた。

## 2. 試料の調製

水におけるクラスレート水和物の生成を確認するため、脱気した超純水 0.4ml (関東科学) を NMR 用耐圧試料管 (最高使用圧力 1MPa) に入れ、試料とした。農産物として、収穫後数日内に市販量販店より購入した青森県産および埼玉県産のニンジン (*Daucus carota* L.) 組織を、直ちに 4mm×4mm×10mm に切り出し、NMR 用耐圧試料管に入れ、生鮮試料とした。ただし、ニンジン組織は、組織の中心・外皮を切除し、Fig.1 に示す様に柔組織のみを使用した。

これらの試料に Xe (99.995%, 岩谷) を用い Fig.2 に示す圧力付加ユニットを通して試料にかかる圧力を調節した。ただし、Xe を入れる前に、先立って、パufferタンクおよび配管内の空気を十分排気した後、ガスを導入した。

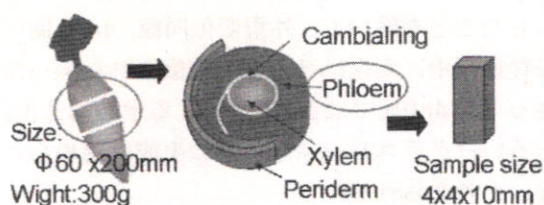


Fig. 1 Preparation scheme of carrot sample for NMR.

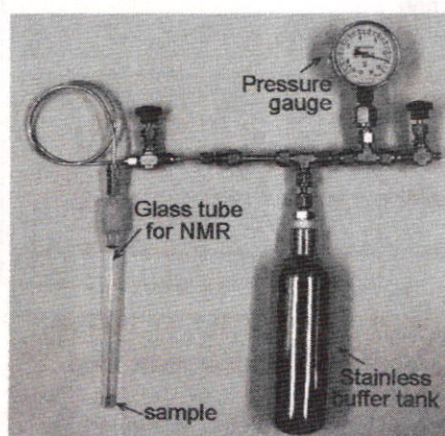


Fig. 2 Pressure unit for introducing Xe into the sample tube. Xe gas was filled in a stainless buffer tank (200ml) to keep a given pressure.

水の場合、5°Cではクラスレート水和物の生成に必要な Xe 分圧は約 0.3MPa<sup>2,2)</sup>、また、0.1MPa

では5時間で溶解平衡に達するとされる<sup>2,3)</sup>。そのため、本研究では、Xe 分圧を 0.4MPa および 0.8MPa とし、雰囲気温度 5°Cにて 14 日間貯蔵し、水、およびニンジン組織それぞれの NMR 緩和時間の変化を観察した。

## 3. NMR 緩和時間測定法と状態変化観察法

試料内プロトンの NMR 緩和時間  $T_1$ ,  $T_2$  の測定には、25MHz の NMR スペクトルメーター (JNM - MU25A, JOEL) を用いた。 $T_1$  は Saturation recovery 法、 $T_2$  は CPMG 法を用いた。ただし、固体のクラスレート水和物の  $T_2$  を測定するため、純水試料においては  $\mu$ s オーダーの  $T_2$  の測定を solid echo 法を用いて行った。NMR の原理および詳しい測定法の説明については他文献を参照されたい<sup>1,4)</sup>。測定時の試料温度は、NMR スペクトルメーターに温度可変装置 (NM - PR / MU25, JOEL) を装着させることで 5°Cに保った。測定用 NMR 用耐圧試料管には直径 10mm のガラス管を用い、5 個の試料について測定を行った。また、同時に外観の変化をデジタルカメラ (E990, Nikon) で撮影した。

## 4. 結果と考察

### 4.1 純水におけるクラスレート水和物の生成

0.4MPa の Xe 分圧では、14 日の保存期間中、外観の観察においてクラスレート水和物の生成は確認できなかった。5°Cにおける Xe クラスレート水和物の生成条件として知られる Xe 分圧は約 0.3MPa<sup>2,2)</sup> とされており、本研究で用いた 0.4MPa は十分クラスレート水和物が生成する条件下にあったと考えられる。しかし、0.3MPa<sup>2,2)</sup> なる数値は、一旦、高圧・低温下でクラスレート水和物を生成させ、圧力を減少させることで得られる相平衡状態を保つのに必要な圧力であり、クラスレート水和物の保持に必要な圧力である。したがって、核発生を要する自発的クラスレート水和物の発生には、Xe 分圧は 0.3MPa、また、本実験で用いた 0.4MPa より高い分圧が必要であったと考えられる。

一方、0.8MPa では、Fig.3 に示す様にクラスレート水和物の生成が確認された。多くの研究

で示されている様に<sup>24) - 26)</sup>, Xe クラスレート水和物も水とガスの境界面に生成し始め (Fig.3 - 2day), ガス - 水境界面にフィルム状に成長した. このフィルム状のクラスレート水和物が生成すると, Fig. 3 - (a) に示す様に, その後のクラスレート水和物の成長が抑制され, 保存期間 14 日においてもクラスレート水和物が試料全体に成長しなかった. そのため, 本研究では, 1 日ごとに衝撃を与え, 表層面のクラスレート水和物を破壊・攪拌し, その成長を促進させた. その結果, Fig. 3 - (b) に示す様に, クラスレート水和物の生成・成長が確認された.

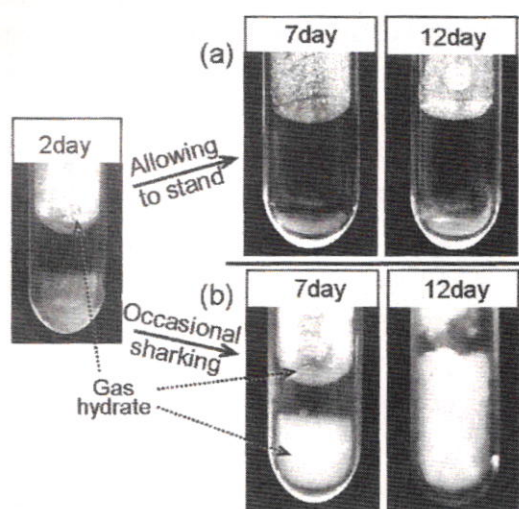


Fig. 3 Formation of gas hydrate in water at 0.8Mpa, 5°C. (a) Sample was allowed to stand during 14 d. (b) sample was occasional sharked.

既往の研究において, クラスレート水和物の生成は, 過飽和塩溶液などからの塩結晶の析出過程に類似した現象と考えられている<sup>27)</sup>. 本研究の結果においても, 0.8MPa, 保存2日の試料では, Xeが高濃度に溶解していると考えられる水表面にのみクラスレート水和物が生成していた. また, 近年ではMD (Molecular Dynamics) シミュレーションによってクラスレート水和物の核生成や成長過程は, 氷核生成および成長に類似した現象であることが示唆されている<sup>28)</sup>. さらに, 氷結晶を疎水性ガスに曝露することでクラスレート水和物の生成時間の短縮が可能であることが示されている<sup>27), 29)</sup>. いずれにせよ, クラスレート水和物の核生成や成長メカニ

ズムは, 十分理解されておらず, 本研究においても外観の観察からは十分な定量的議論はできなかった.

NMR 緩和時間の測定結果を Fig.4, 5 に示す. 測定したいずれの試料においても, NMR 緩和時の変化は同様の挙動を示したが, クラスレート水和物の生成速度には若干の差があるため, 本論では各測定値の平均値は使用せず, 1 試料における測定結果の例を示した. 加圧前の水の NMR 緩和時間は,  $T_1$  (◆); 約 1700ms,  $T_2$  (○); 約 1450ms であった. 既往の研究において, 5°C における水の  $T_1$  は約 1880ms とされており<sup>16)</sup>, 本研究では, 常磁性物質である酸素の脱気を行ったが, 不十分であり残存する溶存酸素の影響のため若干低い NMR 緩和時間になったと考えられる.

Fig.4 に 0.4MPa の NMR 緩和時間の変化を示す. 保存 14 日で  $T_2$  が僅か 1250ms 程度まで減少したことを除いて, 外観変化同様, 14 日間の保存期間中に変化はほとんど観察されなかった. 従って, 0.4MPa では Xe 溶解による水の構造化, あるいはクラスレート水和物の生成は認められないと考えられる.

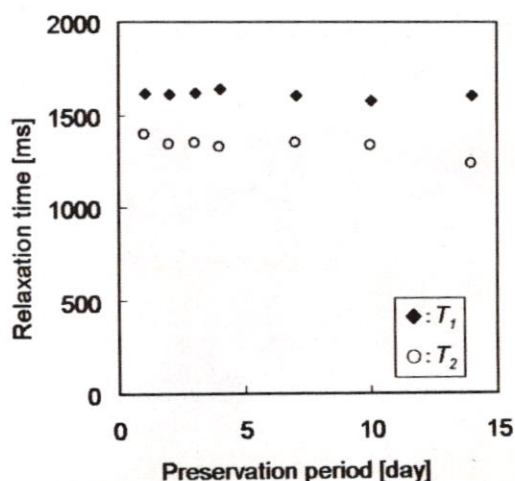


Fig. 4 Change of proton relaxation times  $T_1$  (◆) and  $T_2$  (○) for water before and after formation of gas hydrate at 0.4MPa, 5°C.

次に 0.8MPa 付加後, 生成を促進した試料における NMR 緩和時間の変化を Fig.5 に示す. 0.8MPa では, 14 日の保存期間中,  $T_2$  は連続的減少を示した. Fig.3 の外観変化と併せると, 少

量のクラスレート水和物が生成した保存2日後で $T_2$ は約1250ms, 7日目には約950msとなり, 12日目には約600msまで減少し, 最終的には一定値に収束することが確認された. 一方,  $T_1$ は2日目に約1600msと, わずかに減少したに留まり, 以降, 変化が見られなかった.

既往の研究において, Is型構造を持つメタンクラスレート水和物内のプロトンの $T_2$ は, 0.01ms以下であることが示されている<sup>31), 31), 32)</sup>. この非常に短い $T_2$ は, 石<sup>30)</sup>や氷<sup>33)</sup>など固体試料とほぼ同程度の値であり, クラスレート水和物を生成している水分子の動きが強く束縛されていることを裏付けている. 一方, 同クラスレート水和物の $T_1$ についての報告は, 100ms~1000msと非常に広い範囲に渡っている<sup>32), 34)</sup>. これは $T_1$ が, 使用するNMRの周波数に依存することにも拠るが, クラスレート水和物生成試料の状態の相違, すなわち, 水中におけるクラスレート水和物生成量による影響であると推察される. 本研究では,  $T_1$ は圧力, およびクラスレート水和物の生成によらず, 保存期間中, 純水とほぼ同一の値を維持していた. このことから, 試料中には, 純水と同一の運動性を持つ成分が多く存在すると考えられる.

本研究で生成したXeクラスレート水和物のNMR緩和時間が, 同じIs型構造から成るメタンクラスレート水和物と<sup>30)</sup>同等であると考えられると, 本研究で得られた $T_2$ は数オーダー長く, その値は多孔質内に存在する束縛された水<sup>32)</sup>や植物細胞内の水<sup>35)</sup>に等しいオーダーである. 一方, 同試料を固体の $T_2$ 測定が可能であるSolid echo法<sup>36), 37)</sup>を用いて測定した結果, Fig.6に示すように, 保存14日後の試料で固体のプロトンの動きを反映すると考えられるシグナルが非常に短い時間に確認された. しかし, このシグナルの検出量は全試料の1%以下であり, 正確な $T_2$ の算出はできなかった.

これらの結果より, 0.8MPaで得られたクラスレート水和物が生成した試料は, 外観上, 全体にクラスレート水和物が生成した様に思われるが, 実際のクラスレート水和物の生成量は非常に少なく, 大部分が水, もしくはガス溶解水であったと推察される. また, 観測された $T_2$ の減少に対する解釈として, Xe溶解による構造化し

た水とする考え方もあるが, クラスレート水和物間に閉じ込められたことによる多孔質内の束縛水である可能性も考えられ, 今後, より詳細な検討が必要であると考えられる.

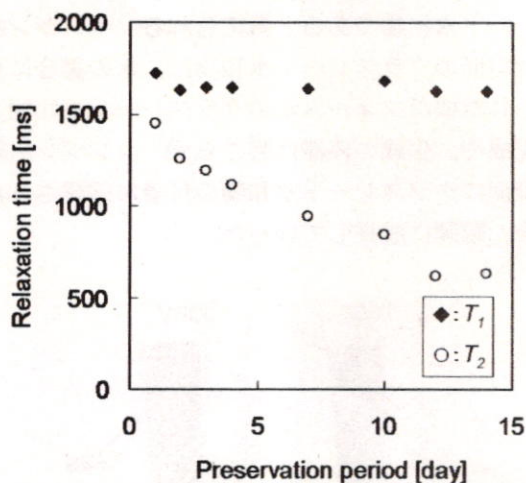


Fig. 5 Change of proton relaxation times  $T_1$  (◆) and  $T_2$  (○) for water before and after formation of gas hydrate at 0.8MPa, 5°C.

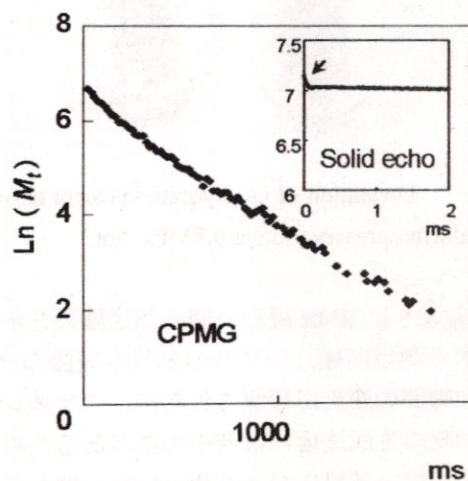


Fig. 6 Free induction decays on CPMG and Solid echo methods for proton signal in water after 14day storage at 5°C, 0.8MPa. Arrow indicates decay signal from solid component.

#### 4.2 ニンジン組織内におけるクラスレート水和物の生成

0.4MPaの圧力では水同様, ニンジン組織においてもXeの溶解に伴う外観の変化は見られなかった. 一方, 0.8MPaの場合, 保存3日でニンジン組織表面に少量の氷様物質の付着が確認で

きた。0.8MPaにおける外観変化を Fig.7 に示す。3日以降、クラスレート水和物は、時間経過と共に表面部分で増加した。本研究では、保存温度 5°Cであり、氷結晶は生成しない。よって、ニンジン組織表面に付着した氷様結晶はクラスレート水和物であると考えられる。ニンジン組織表面のクラスレート水和物は、水の場合に見られた様なフィルム状のクラスレート水和物の生成や、生成の停滞は起こらず、ニンジン組織表面にクラスレート水和物の付着が確認された後、順調に成長していった。

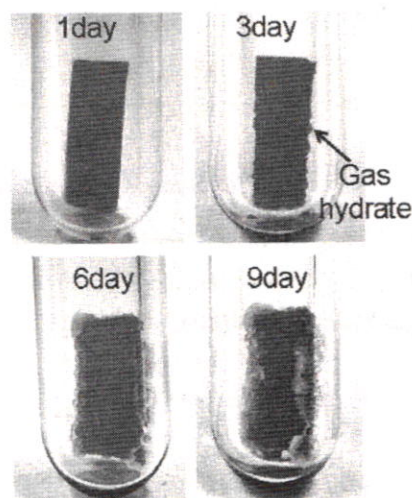


Fig. 7 Formation of gas hydrate in carrot tissue during preservation at 0.8MPa, 5°C.

Fig.8, 9 に NMR 緩和時間の測定結果を示す。純水の測定同様、いずれの試料も同様の NMR 緩和時間の変化が観測されたが、クラスレート水和物の生成速度には若干の差があるため、本研究では 1 試料における測定結果の例を示した。Xe 付加前のニンジン組織の NMR 緩和時間は、 $T_1$  (◆); 約 330ms,  $T_2$  (○); 約 190ms であった。既往の研究において、植物中の NMR 緩和時間は、数百 ms 程度の値であることが知られており<sup>35)</sup>、ニンジン組織の NMR 緩和時間として妥当であると考えられる。0.4Mpa 付加後 (Fig.8), 保存 6 日後で  $T_1$ ; 360ms,  $T_2$ ; 220ms 程度まで若干の増加を示し、その後は減少し  $T_1$ ; 350ms,  $T_2$ ; 210ms で一定となった。このわずかな増減は、圧力付加を行わず 5°Cにて保存したニンジン組織においても、保存 7 日前後で

$T_1$ ,  $T_2$  が共に 10ms 程度上昇することが確認された (非発表データ未報告) ことから、保存時のニンジン自体のダメージ応答によるものであり、Xe による影響ではないものと推察される。

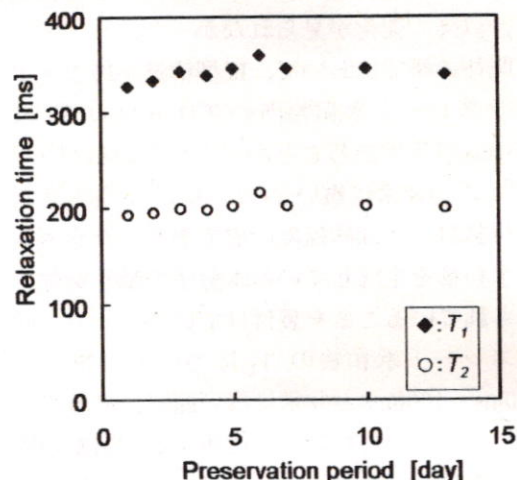


Fig. 8 Change of proton relaxation times  $T_1$  (◆) and  $T_2$  (○) for carrot tissue kept at 0.4MPa, 5°C.

一方、Fig.9 に示す様に 0.8MPa におけるニンジン組織の NMR 緩和時間は、クラスレート水和物の生成と同時に、明らかな変化を示した。すなわち、NMR 緩和時間の変化と、Fig.7 の外観変化を併せて判断すると、ニンジン組織に少量のクラスレート水和物が生成した保存 3 日目において、 $T_1$ ; 約 570ms,  $T_2$  は約 280ms まで急激に上昇し、その後、クラスレート水和物の成長に伴って NMR 緩和時間は減少し、一定値 ( $T_1$ ; 約 340ms,  $T_2$ ; 約 160ms) に収束する変化を示すことが確認された。ニンジン組織で得られた数百 ms という  $T_2$  の値から考えて、先に示した水中のクラスレート水和物と同様、本研究ではニンジン細胞内溶液、もしくは Xe が溶解し、ある程度構造化した細胞内溶液の NMR 緩和時間が測定されたと考えられる。

農産物における NMR 緩和時間の上昇は、保存による劣化に伴い観測され、細胞構造の破壊によって水の束縛が弱まるためと考えられている<sup>17), 38), 39)</sup>。本研究で観測された NMR 緩和時間の大きな上昇も、クラスレート水和物の付着が確認された時に上昇していたことから、クラスレート水和物結晶の生成による細胞構造への激しいダメージに由来すると考えられる。

また、上昇した NMR 緩和時間が減少した理由として、クラスレート水和物の成長に伴い、組織内の水分が減少したためとも考えられる。以上のことより、ニンジン組織においても Xe 分圧 0.8MPa において、クラスレート水和物の生成が可能であることが確認された。さらに、NMR 緩和時間は、組織の細胞構造に由来した特有の挙動を示すことが観測された。しかし、本研究において、細胞内への Xe の溶解や溶解による組織内溶液の構造化状態を直接観察することはできず、X線などの測定が必要と考えられる。また、本研究では、組織内の溶液に着目し CMPG 法を用いた  $T_2$  測定を行ったが、今後、ニンジン組織に生成するクラスレート水和物の  $\mu s$  オーダーの  $T_2$  も明らかにする必要がある。

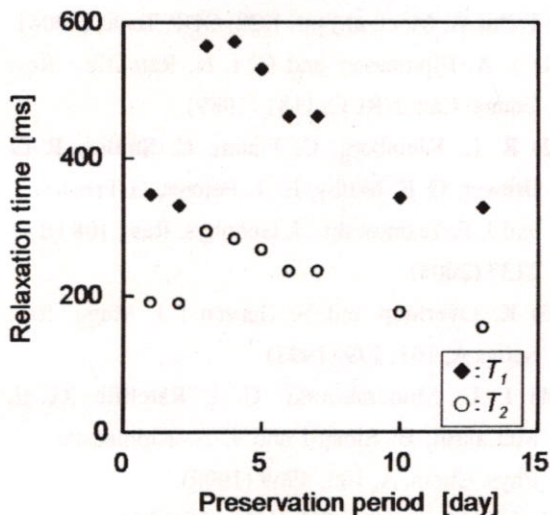


Fig. 9 Change of proton relaxation times  $T_1$  (◆) and  $T_2$  (○) for carrot tissue before and after formation of gas hydrate at 0.8 MPa, 5°C.

## 5. 結論

純水およびニンジン組織を用いた疎水性ガスの溶解、クラスレート水和物の生成に伴う NMR 緩和時間の変化を検討した。その結果、純水において外観上クラスレート水和物の生成が確認されても、NMR 緩和時間の変化からは、試料内のクラスレート水和物の生成量は非常に少ないことが示された。また、ニンジン組織においても 0.8MPa の Xe 分圧でクラスレート水和物の生成が可能であり、特に組織表面で多量のクラ

スレート水和物が生成することが確認された。ニンジン組織でクラスレート水和物が生成した場合、細胞構造へのダメージによって一旦 NMR 緩和時間が大きく上昇することが観測され、純水とは異なる NMR 緩和時間の変化が示された。本研究では当初目的とした Xe 溶解に伴う構造化した水を明確に捉えることはできなかった。しかし、ニンジン組織における Xe 付加によるクラスレート水和物の生成過程や、特に NMR 緩和時間の変化を初めて示すことができたと考えられる。こういった知見は今後、水の構造化を詳細に検討するために必要な基礎的なデータとなると考えられる。また、クラスレート水和物研究において、生体試料における生成過程を詳細に検討した例はなく、本研究の結果は農産物の保存のみならず、一般的に生体組織内でのクラスレート水和物の影響を知る上で意味ある結果を示すことができたと考えられる。

## 謝辞

本研究は平成 19 年度科学研究費補助金(課題番号 19 - 11965) の助成を受けて行われました。謹んで感謝の意を表します。

## 文献

- 1) 鈴木啓三：「水および水溶液」, pp.198, 共立出版, 東京(1980).
- 2) 内田努, 伊藤英之助：低温科学, 64, 173 (2005).
- 3) E. D. Sloan : Ind. Eng. Chem. Res., 39 (9), 3123 (2000).
- 4) J. Baumert : Kiel University, Dissertation (2004).
- 5) S. Takeya, W. Shimada, Y. Kamata, T. Ebinuma, Uchida T., Nagao J., and Narita H. : J. Phys. Chem. A, 105 (42), 9756 (2001).
- 6) B. Miller and E. R Strong: Am. Gas Assoc. Mon., 28 (2), 63 (1942)
- 7) 内田 努:日本結晶成長学会誌, 28(2), 70, (2001)
- 8) 海老沼孝郎：日本エネルギー学会誌, 81 (10), 908 (2002).
- 9) 大下誠一, 橋本篤, 瀬尾康久:農業機械学会

- 誌, 58(6), 31(1996).
- 10) 橋本篤, 大下誠一 : 農業機械学会誌, 58 (5), 35 (1996).
  - 11) 大下誠一, M.A. ラハマン, 川越義則, 瀬尾康久, 橋本篤 : 農業機械学会誌, 59 (1), 29 (1997).
  - 12) S. Oshita, Y. Seo and Y. Kawagoe : *Agricultural Engineering International : the CIGR E journal*, Vol. I (1999).
  - 13) Y. Makino, M. Kawahashi, S. Kuroki, T. Shinmura, Y. Kawagoe and S. Oshita : *Agricultural Engineering International, the CIGR E journal*, 8 (6), Manuscript BC 05 018, Vol. III (2006).
  - 14) ファラーベッカー(赤坂一久, 元敏明 訳) : 「パルスおよびフーリエ交換 NMR」, 吉岡書店, 京都(1976).
  - 15) R. V. Mathur-de : *Prog. Biophys. Molec. Biol.*, 35, 103 (1979)
  - 16) J. H. Simpsonsont and H. Y. Carr : *Phys. Rev.* 94, 630 (1954).
  - 17) S. Oshita, T. Fukumoto, Y. Nakai, I. Sotome, D. Ajiro, H. Tsuchiya, S. Kuroki, Y. Kawagoe and Y. Makino : *Cryobiology and Cryotechnology*, 52 (1), 11 (2006).
  - 18) G. D. Fullerton, J. L. Potter and N. C. Dornbluth : *MRI*, 1(4), 209 (1982).
  - 19) J. A. Ripmeester, C. I. Ratcliffand and I. G. Cameron : *J. Phys. Chem. B*, 108 (3), 929 (2004).
  - 20) D. W. Davidson, Y. P. Handa and J. A. Ripmeester : *J. Phys. Chem.*, 90 (24), 6549 (1986).
  - 21) S. Gao, W. House, and W. G. Chapman : *J. Phys. Chem. B*, 110 (13), 6549 (2006).
  - 22) T. Y. Makogon, A. P. Methaand and E. D. Solan Jr. : *J. Chem. Eng. Data*, 41 (2), 315(1996).
  - 23) H. L. Clever (Edits.) : “Solubility Data series 2” , (ed. by L. H. Clever), pp.141, Pergamon press, New York (1979).
  - 24) Z. Huo, E. Freer, B. Sannigrahi, D. Knauss and E. D. Sloan : *Chem. Eng. Sci.*, 56 (17), 4979 (2001).
  - 25) K. K. Ostergaard, B. Tohidi, R. W. Burgass, A. Danesh and A. C. Todd : *J. Chem. Eng. Data*, 46 (4), 703 (2001).
  - 26) C. J. Taylor: *Colorado School of Mines Masters Thesis* (2006).
  - 27) S. E. Deny and A. K. Carolyn: “Clathrate hydrate of natural gases”, 3rd ed., (ed. by Deny S. E. and Carolyn A. K), CRC press, New York (2007).
  - 28) M. Mastumoto, S. Saito, and I. Ohmine : *Nature*, 416, 409 (2002).
  - 29) 関根義也, 媚山政良, 榎清, 眞山工 : 第 18 回寒地技術シンポジウム寒地技術論文・報告集 (青森, 2002), Vol.18, pp. 521-525, 青森 (2002).
  - 30) T. S. Collett, M. W. Lee, F. R. R. Goldberg and T. Williams : “Proceedings of the Ocean Drilling Program, Scientific Results” Vol.204, (ed. by Tréhu, A. M. et. al.) pp. 1-22, ODP, Texas (2006).
  - 31) J. A. Ripmeester and C. I. N. Ratcliffe : *Res. Coun. Can. NRCC*, 1181 (1989).
  - 32) R. L. Kleinberg, C. Flaum, C. Straley, P. G. Brewer, G. E. Malby, E. T. Peltzer, G. Friederich and J. P. Yesinowski : *J. Geophys. Res.*, 108 (B3), 2137 (2003).
  - 33) K. Overloop and V. Gerven : *J. Magn. Res. Series A*, 101, 179 (1993).
  - 34) I. L. Moudrakovski, C. I. Ratcliffe, G. E. McLaurin, B. Simard and J. A. Ripmeester : *J. Phys. Chem. A*, 103, 4969 (1999).
  - 35) J. E. M. Snaar and H. V. As : *Biophys. J.*, 63 (6), 1654 (1992).
  - 36) V. J. McBrierty and D. C. Douglass : *J. Polymer Science: Macromolecular Reviews*, 16, 295 (1981).
  - 37) N. Boden and M. Mortimer : *Chem. Phys. Lett.*, 21 (3), 538 (1973).
  - 38) S. Oshita, A. Maeda, Y. Kawagoe, H. Tsuchiya, S. Kuroki and Y. Seo.: *Biosystems Engineering*, 95 (3), 397 (2006).
  - 39) S. Oshita, H. Samarakoon, Y. Makino, Y. Kawagoe and I. Farkas : *CIGR 3rd (Naples, Italy, 2007)*, pp. 24-26, Section VI, Naples (2007).