

脱水冷凍における
組織内熱・物質輸送と損傷機構の研究

2013年3月

九州工業大学 大学院工学府

奥 祐一郎

目次

第1章 序章	1
1.1 緒言	1
1.2 細胞生存率に対する冷却速度の影響と氷晶成長機構	3
1.2.1 N 曲線	3
1.2.2 凍結曲線と解凍曲線	4
1.2.3 氷晶成長速度と核生成頻度	5
1.3 組織の凍結・解凍時における水分挙動	7
1.3.1 過冷却と氷核生成	7
1.3.2 細胞内核生成	10
1.3.3 固液界面における溶質掃出しと平衡分配係数	12
1.3.4 凝固点降下	14
1.3.5 細胞膜を介した水分輸送	15
1.4 脱水冷凍法	18
1.4.1 従来の脱水冷凍	18
1.4.2 マイクロ波減圧乾燥法を用いた脱水冷凍	19
1.5 冷凍保存に関する研究の現状	22
1.5.1 解凍過程に着目した既存報告	22
1.5.2 数値解析を利用した既存報告	23
1.6 本論文の研究内容	25
第2章 マイクロ波デハイドロフリージングによる凍結魚肉組織の冷凍・解凍特性	28
2.1 緒言	28
2.2 実験装置および実験方法	31
2.2.1 マイクロ波減圧乾燥	31
2.2.2 試料の予備脱水および冷凍	32
2.2.3 解凍方法およびドリップロスの測定	33
2.2.4 凍結・解凍後の組織観察	33

2.2.5	解凍状態の顕微鏡観察.....	35
2.3	実験結果と考察.....	36
2.3.1	魚肉組織における氷晶の大きさ.....	36
2.3.2	サバの解凍挙動.....	38
2.3.3	タイの解凍過程における再結晶化.....	43
2.4	結論.....	48
第3章	魚肉組織の冷凍過程における数値解析と実験との比較.....	50
3.1	緒言.....	50
3.2	解析モデルおよび数値解析方法.....	51
3.2.1	二重セルモデル.....	51
3.2.2	冷凍過程の数値解析.....	52
3.2.3	凍結因子の決定.....	53
3.2.4	熱伝導.....	55
3.2.5	物質移動.....	57
3.2.6	膜輸送.....	58
3.2.7	数値解析パラメータと熱物性値.....	59
3.3	魚肉組織の冷凍過程における温度測定.....	60
3.4	結果と考察.....	61
3.4.1	表面層および中心部の温度履歴（実験結果との比較）.....	61
3.4.2	細胞外固相率分布.....	62
3.4.3	細胞収縮率.....	63
3.5	結論.....	65
第4章	魚肉組織由来溶液の溶質分配係数の測定.....	67
4.1	緒言.....	67
4.2	溶液の方向性凝固観察実験.....	67
4.2.1	供試試料.....	67
4.2.2	方向性凝固観察実験装置および実験方法.....	68
4.3	固液界面近傍における液相濃度の評価.....	71
4.4	溶質分配係数の評価.....	73
4.5	実験結果と考察.....	74

4.5.1	方向性凝固過程における固液界面の様相	74
4.5.2	NaCl 水溶液の凝固点降下度と相図および理論式との比較	76
4.5.3	固液界面における液相濃度の変化	76
4.5.4	NaCl 水溶液および魚肉組織由来溶液の分配係数	78
4.6	結論	80
第 5 章	魚肉組織の冷凍過程における細胞収縮と細胞ダメージとの関係	82
5.1	緒言	82
5.2	解析モデルおよび数値解析方法	82
5.2.1	二重セルモデルの簡略化	82
5.2.2	温度回復法を利用した熱伝導計算	83
5.2.3	物質移動と固液界面における溶質掃出し	84
5.2.4	凝固点の算出	85
5.2.5	細胞内核生成理論 (Toner モデル)	85
5.2.6	浸透圧差と蒸気圧差に起因する細胞膜を介した水分輸送	89
5.3	計算条件	90
5.4	解析結果と考察	93
5.4.1	組織内の状態 (固相率・濃度・温度)	93
5.4.2	細胞外液における物質移動の影響	99
5.4.3	予備脱水の影響	100
5.4.4	魚種の影響	103
5.5	結論	107
第 6 章	凍結魚肉組織の解凍過程における水分の再結晶化	109
6.1	緒言	109
6.2	想定される再結晶化プロセス	109
6.3	解凍過程の数値解析方法	110
6.4	計算条件	110
6.5	解析結果と考察	113
6.5.1	温度, 細胞内外濃度および細胞サイズの時間変化	113
6.5.2	細胞内外液の固相率, 濃度および温度分布	114
6.5.3	解凍時再結晶化の検証	118

6.6 結論.....	120
第7章 組織細胞内における氷晶成長速度の実験評価.....	122
7.1 緒言.....	122
7.2 タマネギ表皮組織における凍結挙動の顕微鏡観察実験.....	122
7.2.1 供試試料.....	122
7.2.2 実験装置および実験方法.....	123
7.3 氷晶成長状態の評価方法.....	126
7.4 実験結果と考察.....	128
7.4.1 細胞内水分挙動.....	128
7.4.2 細胞内氷晶の成長.....	129
7.4.3 細胞内における氷晶成長速度.....	130
7.4.4 氷晶成長速度と魚種の違いによる解凍後組織損傷の差異に関する考察	132
7.5 結論.....	133
第8章 総括.....	135
参考文献.....	140
謝辞.....	149

記号表

第1章

A	:	表面積	$[\text{m}^2]$
C_1, C_2	:	動力学パラメータ	
D	:	水分子の拡散係数	$[\text{m}^2/\text{s}]$
E	:	内部エネルギー	$[\text{J}]$
G	:	自由エネルギー	$[\text{J}]$
k_0	:	平衡分配係数	
k_B	:	ボルツマン定数	$[\text{J}/\text{K}]$
L	:	水分子1個あたりの凝固潜熱	$[\text{J}]$
r	:	クラスター半径	$[\text{m}]$
S	:	エントロピー	$[\text{J}/\text{K}]$
T	:	温度	$[\text{K}]$
T_f	:	凝固点	$[\text{K}]$
t	:	時間	$[\text{s}]$
U	:	氷晶成長速度	$[\text{m}/\text{s}]$
V_c	:	水分子クラスター体積	$[\text{m}^3]$
Greek symbols			
ΔG_V	:	水と氷との自由エネルギー差	$[\text{J}]$
ΔT	:	過冷却度	$[\text{K}]$
$\Delta\mu$:	化学ポテンシャル差	$[\text{J}]$
θ	:	固体とクラスターとの接触角	$[\text{deg}]$
ρ_c	:	水分子クラスターの密度	$[\text{kg}/\text{m}^3]$
σ	:	界面エネルギー	$[\text{J}/\text{m}^2]$
Subscripts			
cl	:	クラスターと過冷却水間	
sc	:	クラスターと異質粒子間	
sl	:	異質粒子と過冷却水間	
$l \rightarrow c$:	過冷却水からクラスター	

Superscripts

* : 臨界

第2章

a : 氷晶の長径 [m]
 b : 氷晶の短径 [m]
 d_e : 氷晶相当直径 [m]
 V_d : 収縮した筋組織の断面積 [m²]
 V_i : 凍結前の筋組織の断面積 [m²]

第3章

A_{cell} : 細胞表面積 [m²]
 C : NaCl 濃度 [wt.%]
 C_p : 比熱 [kJ/(kg·K)]
 D : NaCl の拡散係数 [m²/s]
 d_{cell} : 細胞直径 [m]
 E_{Kp} : 活性化エネルギー [kJ/mol]
 F_s : 固相率
 I : 氷の体積分率 [m³/m³]
 K_p : 膜透過率 [m³/(N·s)]
 L_h : 融解潜熱 [kJ/kg]
 O : タンパク質などの体積分率 [m³/m³]
 R : 一般気体定数 [J/(mol·K)]
 T : 温度 [°C]
 T_f : 凝固点, 融点 [°C]
 t : 時間 [s]
 V : 体積分率 [m³/m³]
 V_w : 膜を介した水分輸送量 [m³]
 W : 溶液の体積分率 [m³/m³]

Greek symbols

Nomenclature

ρ	:	密度	[kg/m ³]
ρ_s	:	質量濃度	[kg/m ³]
λ	:	熱伝導率	[W/(m·K)]

Subscripts

C	:	細胞内
X	:	細胞外
w	:	水分

第4章

C	:	溶質濃度	[wt.%]
F_s	:	固相率	
G	:	自由エネルギー	[J]
k	:	分配係数	
L	:	長さ	[m]
R	:	一般気体定数	[J/(mol·K)]
S	:	エントロピー	[J/K]
T	:	温度	[°C]
T_f	:	溶液の凝固点, 溶液の融点	[°C]
$T_f^{\text{H}_2\text{O}}$:	水の凝固点, 水の融点	[°C]
x_w	:	水のモル分率	
x_s	:	溶質のモル分率	

Greek symbols

ΔH_{fus}	:	融解潜熱	[J/(mol)]
μ	:	化学ポテンシャル	[kg/m ³]

Subscripts

0	:	初期
L	:	液相
S	:	固相

第5章および第6章

A_{cell}	:	細胞表面積	[m ²]
b	:	温度係数	[1/K]
C	:	溶質濃度	[wt.%]
C_p	:	比熱	[J/(kg·K)]
D	:	NaCl の拡散係数	[m ² /s]
F_s	:	固相率	
h	:	組織表面での熱伝達率	[W/(m ² ·K)]
i^*	:	臨界半径をもつクラスターの数	
K_p	:	膜透過率	[m ³ /(N·s)]
K_{pg}	:	T_g における膜透過率	[m ³ /(N·s)]
k	:	溶質の分配係数	
L	:	組織の厚さ	[m]
N_c^u	:	未凍結細胞の数	
PIF	:	細胞内核生成確率	
R	:	一般気体定数	[J/(mol·K)]
s	:	界面位置	[m]
T	:	温度	[°C]
T_{air}	:	雰囲気温度	[°C]
T_f	:	溶液の凝固点, 溶液の融点	[°C]
T_g	:	参照温度	[°C]
$T_f^{\text{H}_2\text{O}}$:	水の凝固点, 水の融点	[°C]
t	:	時間	[s]
V_C	:	細胞占有率	
x_s	:	溶質のモル分率	
z	:	組織表面からの距離	[m]
Greek symbols			
ΔH_{fus}	:	融解潜熱	[J/mol]
ΔP	:	氷と過冷却水との蒸気圧差	[Pa]
ΔT	:	過冷却度	[K]

Nomenclature

$\Delta\Pi$:	浸透圧差	[Pa]
η	:	粘性係数	[Pa·s]
θ	:	クラスターと膜との接触角	[deg]
κ	:	熱力学パラメータ	[K ⁵]
λ	:	熱伝導率	[W/(m·K)]
ρ	:	密度	[kg/m ³]
Ω	:	動力学パラメータ	[1/(m ² ·s)]

Subscripts

0	:	等張時, 初期値
C	:	細胞内
het	:	不均質核生成
<i>i</i>	:	氷
<i>l</i>	:	水
<i>v</i>	:	水蒸気
X	:	細胞外

第 1 章

序章

1.1 緒言

時間の経過に伴って変性・劣化が生じる食品・生体において、その長期保存の必要性が高まっている。その中で、時間・空間的制約の解消を達成すると同時に、良質な長期保存が実現可能と考えられることから、冷凍保存技術が食品流通から医療分野にまで広く浸透している（阿部, 2011; 鈴木, 2012）。一方、冷凍によって発生した氷晶が細胞や組織の損傷を引き起こし、壊死させることが冷凍保存の大きな障害となるため、氷晶による細胞損傷を如何に軽減するかが冷凍保存分野における喫緊の課題となっている。また、冷凍品の解凍は最終的な細胞状態を決定する上で重要な復元操作であり、高品位な長期保存を行うためには冷凍保存に関する包括的な提言が求められる。冷凍保存の操作条件としては冷却・加温速度がとりわけ注目されており、各速度は氷晶成長や細胞復元に大きな影響を与える。しかし、食品・生体が実に様々な形態をとる故に、冷凍・解凍条件が一意的に定まることはなく、個々の違いや冷凍・解凍過程における水分挙動の解明、ならびに今後の更なる技術の進歩が期待されている。

ここで、代表的な冷凍保存品とその特徴を Table 1.1 に示す。現在までのところ、精

Table 1.1 Biological substances for cryopreservation.

	Single-cell	Multi-cell
Examples	sperm, embryo	food, biological tissue
Size	micrometer-size	centimeter-size
Cryopreservation	partly established	un-established

子、卵子、胚といった小さな単一細胞においてのみ、細胞全体を均一に急速凍結することが技術的に可能となっており、冷凍保存技術が確立されている。実際に、赤血球の冷凍保存では 1000 °C/min 以上の急速冷却が適用され、100 %に近い生存率が得られている（棚澤ら, 1992）。このような高冷却速度下では、細胞内液が非結晶のアモルファス状態（ガラス化, vitrification）となり、細胞内に大きな氷晶が形成されないため、細胞も氷晶成長によるダメージを受けない。しかし、単一細胞から細胞組織へと保存対象が大きくなると、異種細胞の集合体である場合が多いことや、熱抵抗の大きい組織全体を均一に急速凍結することが問題となる。後者の問題では、組織内部における空間的な冷却速度のばらつきが生じるため、冷却速度の遅い領域では細胞外凍結が生じて組織の凍結が進行する。また、臓器や植物のような組織細胞では、細胞内外液の凍結様相が異なる。すなわち、細胞内水分が細胞膜あるいは細胞壁によって隔離されているのに対し、細胞外では凍結界面を隔てるものがなく、凍結が容易に伝播すると考えられる。一方で、細胞内水分の凍結は個々の核生成現象に左右されるため、細胞内外での凍結の不均一が熱的不均一を増す可能性がある。さらに、細胞外凍結に起因する細胞内外での浸透圧差によって、細胞が脱水収縮すると考えられる。

冷凍保存は主に（1）冷凍前処理、（2）冷凍、（3）貯蔵、（4）解凍の四つの過程で構成され、食品・生体の冷凍保存技術を確立するためには、それぞれの過程における最適な処理条件と方法を提案する必要がある。現状として、単一細胞に関する研究報告例が豊富であるのに対し、細胞組織については十分でない背景がある。また、保存品を活用する際には解凍時の影響を大きく受けると予想されるが、冷凍過程に比べて解凍過程に関する報告が少ないという点も問題となっている。このことから本論文では、細胞組織の冷凍・解凍過程における細胞損傷に関する検討を行った成果をまとめることにする。本章の残りの部分では、まず、冷却速度と細胞生存率の定性的な関係である N 曲線を引用し、冷却速度に応じた細胞凍結状態について述べた後に、組織損傷に影響する氷晶成長メカニズムを説明する。さらに、細胞が存在することで生じる水分挙動について整理した上で、氷晶による細胞損傷の低減を目的とした技術である脱水冷凍に触れ、中でもマイクロ波デハイドロフリーズングについて詳しく述べる。

1.2 細胞生存率に対する冷却速度の影響と氷晶成長機構

1.2.1 N 曲線

Mazur ら (1970; 1984) は、赤血球やネズミの卵母細胞などの単細胞生物の冷凍保存について研究を行い、冷却速度と生存率の間に存在する定性的な関係を N 曲線として示している。Fig. 1.1 はその概略図であり、図中に示されるように生存率を高める二つの冷却速度が存在する (N2 および N4)。N4 に相当する冷却速度では、細胞内外の水が瞬間的に凍結されてガラス化する。この場合、細胞損傷が起こらないため生存率が高くなる。単一細胞の冷凍保存では、N4 に属する冷却速度が実際に適用されている。一方、食品や生体などの細胞組織では、熱抵抗の問題から比較的ゆっくりと冷却されることが多い。この場合、まず細胞外水分が凍結して結晶が形成されて、外部溶液濃度が高くなる。その結果、細胞内外の浸透圧差が駆動力となって細胞内水分が細胞膜を介して外部へと移動し、移動した水分は細胞外の氷晶の表面で凍結する。これを細胞外凍結といい、Fig. 1.1 の N1 から N2 に属する冷却速度において生じる。N2 に対する N1 での生存率の低さは、水分の過剰流出によって細胞内の電解質濃度が高

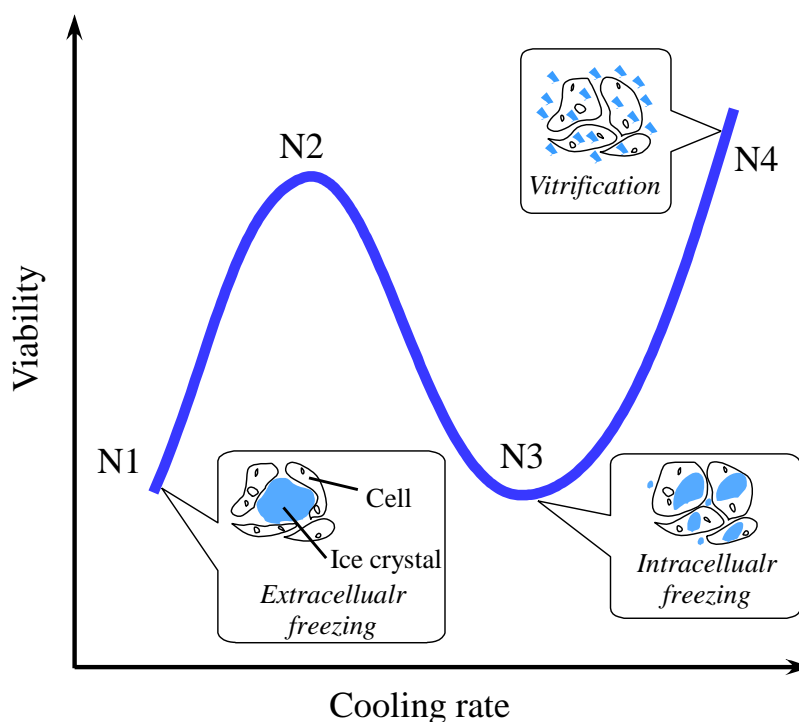


Fig. 1.1 Effects of cooling rate on cell viability.

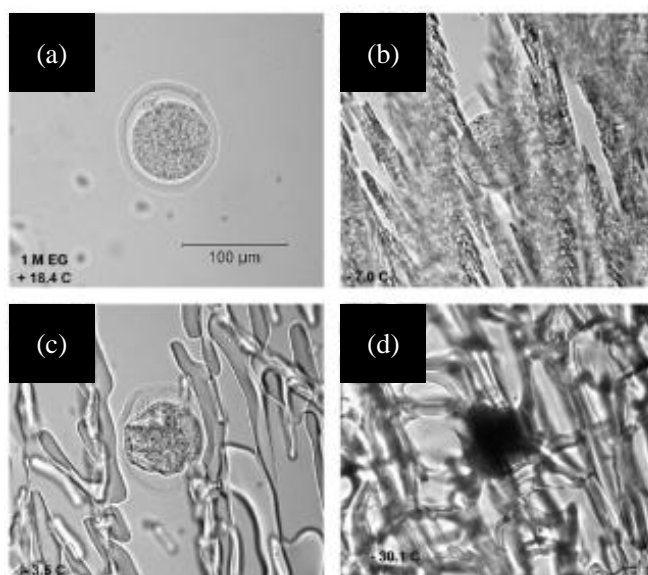


Fig. 1.2 Freezing behavior of mouse oocyte in solution (Mazur et al., 2005):

(a) Unfrozen; (b) Extracellular freezing; (c) Melting process after extracellular freezing; (d) Intracellular freezing occurs at -30°C .

くなって起こる塩害,あるいは細胞収縮や細胞外氷晶の成長に起因する物理的な細胞膜損傷の発生が要因となっている. 氷晶成長と細胞脱水が致命的なレベルに達していない場合にはN2のように生存率が上昇する. また, ガラス化を生じない程度の冷却速度(N3)では,細胞膜を介した水分移動が生じる前に水分が細胞内で凍結してしまう. この細胞内凍結と呼ばれる状態では,氷晶が細胞膜へ致命的な損傷を与える可能性が高くなるため,冷凍保存において避けるべき凍結状態と言える. ここで,ネズミ卵母細胞の懸濁液を凍結させた際の顕微鏡写真(Mazur et al., 2005)を Fig. 1.2 に示す.

Fig. 1.2 の(a)は未凍結状態, (b)は細胞外凍結時, (c)は細胞外凍結後に融解させた状態, (d)は -30°C で細胞内液が凍結した状態をそれぞれ示している. デンドライト状の細胞外氷晶により, Fig. 1.2(c)の時点では細胞形状の変形が見られるが, Fig. 1.1 のN2のように細胞外凍結が支配的な状況で,塩害や細胞膜の物理的損傷を防止していく方法が装置コストの面からも現実的であると考えられる (Choi and Bischof, 2011).

1.2.2 凍結曲線と解凍曲線

立方体形状に切り出したマグロの冷凍時温度履歴(凍結曲線)と,スライスされたサバの解凍時温度履歴(解凍曲線)を Fig. 1.3a, b にそれぞれ示す. どちらもサンプル中心部を測温した結果である. (I)は常温にあるサンプルから熱を取り除く冷却期間,

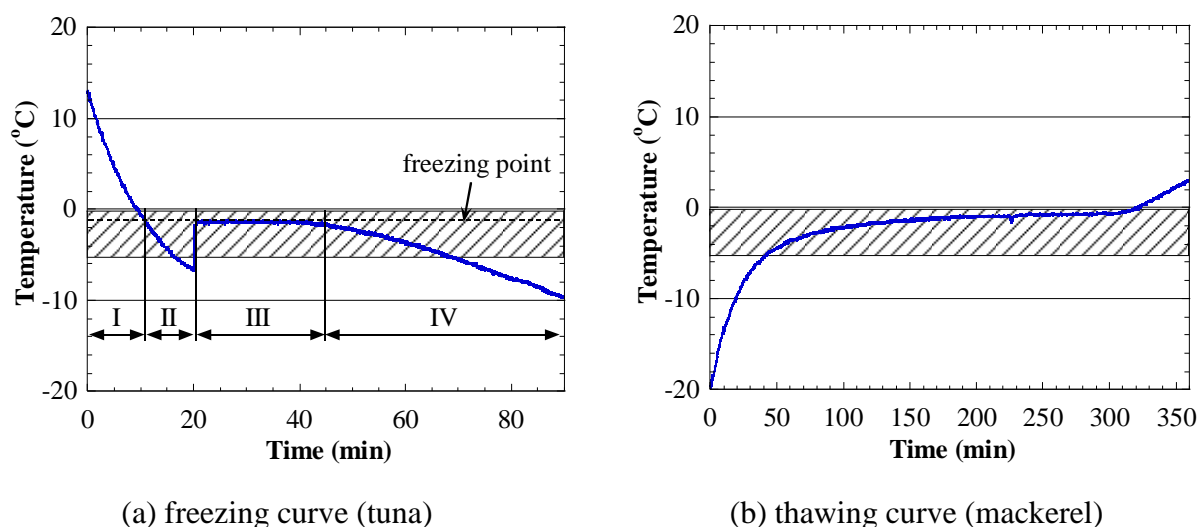


Fig. 1.3 Freezing and thawing curves. Shaded areas are the region of ice crystals growing rapidly.

(II)は平衡凝固点以下においても水分が液体のまま存在する過冷却期間，(III)は過冷却解消後に残りの水分が凍結する平衡凝固期間，(IV)は水分が全て凍結して再び温度が下がる冷却期間である．図中の斜線部は最大氷晶生成帯と呼ばれる温度帯を示している（田中・小嶋, 1991）．一般的にこの温度帯は $-1 \sim -5^{\circ}\text{C}$ と考えられているが，実際は保存対象によって差異がある．この温度帯では氷晶の成長が速く，大きな氷晶が形成されてしまうことから，素早く通過することが冷凍過程での定石となっている．Fig. 1.3bは緩慢解凍を施した例であるが，一般的に冷凍過程よりも解凍過程に時間がかかる．これは水の熱拡散率 ($1.466 \times 10^{-7} \text{ m}^2/\text{s}$) が氷の $1/8$ 程度であることに加え，外部加熱による解凍ではサンプル表層部に液相が形成されるため，熱抵抗が時間と共に増加してしまうことに起因している．したがって，最大氷晶生成帯の通過に関しては冷凍過程以上の注意が必要となる．しかし，素早く通過すると同時に細胞内への復水も促進しなければ，良好な解凍を実現することはできない．

1.2.3 氷晶成長速度と核生成頻度

本項では，前述した最大氷結晶生成帯における氷晶成長メカニズムを示すことにする．過冷却水中で氷核が一旦生成されると，その核を中心に氷が成長する．すなわち，氷の成長は水分子が氷核に組み込まれていく過程である．その過程における氷晶成長

速度 U は

$$U \propto D \left[1 - \exp\left(-\frac{\Delta G_V}{k_B T}\right) \right] \quad (1.1)$$

の比例関係で表される。ここで、 ΔG_V はバルクの水と氷との間の自由エネルギー差、 k_B はボルツマン定数、 T は温度である。 D は水と氷の界面での水分子の拡散係数であり、アレニウスの式で表される。成長速度 U を温度 T に対してプロットした概略図が Fig. 1.4 である。比較のため、過冷却水中における均質核生成頻度も示している。氷晶成長速度は 0°C に近い温度でピークをとり、温度が下がるにつれて小さくなる。一方、 0°C に近い温度帯での核生成頻度は低く、約 -40°C で核生成頻度が最大となり (福迫・稲葉, 1996), さらに低温になると分子運動が抑制されて氷核生成確率が低下する。Fig. 1.4 から、 0°C に近い温度では氷核が生成されにくい状況にあるが、氷晶の成長は速いことがわかる。したがって、過冷却状態のまま冷却を行って最大氷晶生成帯を通過し、成長速度の遅い温度帯に入ることができれば、氷核形成後も微細な氷晶を維持して保存されることが考えられる。

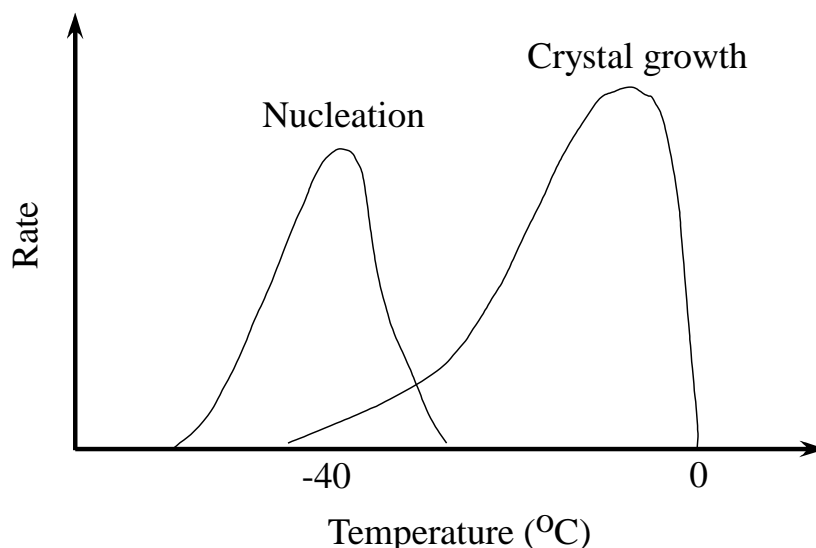


Fig. 1.4 Ice crystal growth rate and ice nucleation rate.

1.3 組織の凍結・解凍時における水分挙動

1.3.1 過冷却と氷核生成

純水の平衡凝固点は 0°C であるが、小さな液滴あるいは緩慢冷却を行う場合にはそれより低い温度でもすぐには凍結せず、液体の状態が維持される。この現象を過冷却状態といい、水の凝固が核生成過程を経ることに起因して生ずる準安定状態である。溶質の析出などが起きない系において、平衡凝固点以下の水溶液中では氷が最も安定な相である。しかしながら、氷の生成過程で微細な氷核が生じる場合は、新たな氷と水の界面の表面自由エネルギーをともなうため、系内はエネルギー的に不利となる。その結果、氷核は液体に戻り、過冷却状態が維持される。安定した氷の形成には、表面自由エネルギーの増加分を補う氷核生成が必要となる。また、氷核生成過程には二つの場合が存在する。まず、氷核が水分子同士の揺らぎによってのみ形成された場合、その氷核生成過程を均質核生成と呼ぶ。他方、氷核が異質粒子上で形成された場合、その氷核生成過程を不均質核生成という。

まず、均質核生成に基づいた氷核生成について示す。絶対温度 T の過冷却水中において、体積 V の水分子球状クラスターを考える。このクラスター中に、1 個の水分子が組み込まれる場合、物質の自由エネルギー G は、

$$G = E - TS \quad (1.2)$$

で与えられ、 E は内部エネルギー、 S はエントロピーを表す。温度と自由エネルギーの関係を模式的に示したのが Fig. 1.5 である。自由エネルギーは、それぞれの相状態で一定の傾きをもった直線で表され、直線が交差する点の温度が相変化温度となる。図中の青色の実線は、過冷却状態における自由エネルギーを示している。したがって、一定温度における相変化による自由エネルギー変化は

$$\Delta G = \Delta E - T\Delta S \quad (1.3)$$

となる。過冷却水中の水分子クラスターに水分子が 1 個組み込まれる場合、固液相間の内部エネルギー差 ΔE は水分子 1 個あたりの凝固潜熱 L に対応するものである。また、 ΔS は凝固点 T_f において固液相間の平衡が成り立つことから、

$$\Delta S = L/T_f \quad (1.4)$$

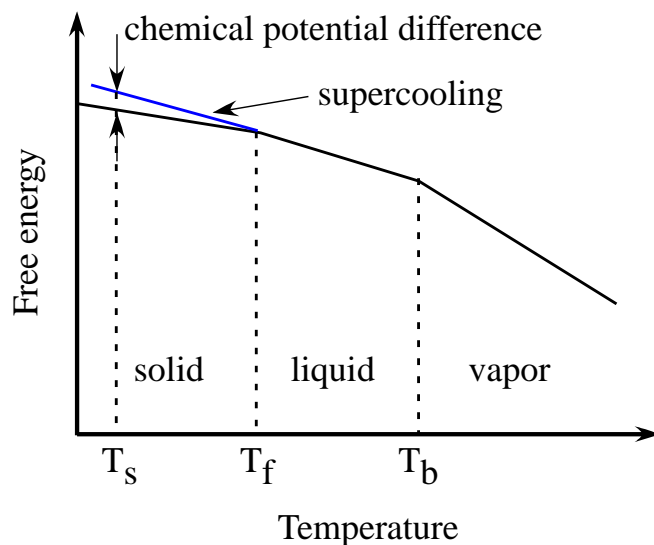


Fig. 1.5 Free energy vs. temperature.

と表され、過冷却相と固相の化学ポテンシャル差 $\Delta\mu$ は次式で表される。

$$\Delta\mu = \frac{L(T_f - T)}{T_f} = \frac{L\Delta T}{T_f} \quad (1.5)$$

この式は、過冷却水から氷晶が形成されるために必要な核生成の駆動力を表している。水分子クラスターのサイズが小さいことから、その体積に対する表面積の比は非常に大きなものとなり、クラスターと過冷却水との界面に作用する界面エネルギー σ_{cl} がクラスターの成長を抑制することになる。したがって、半径 r の水分子クラスターに対する、液体から固体への相変化にともなう正味の自由エネルギー変化は

$$\Delta G_{l \rightarrow c} = 4\pi r^2 \sigma_{cl} - \frac{4}{3}\pi r^3 \rho_c \Delta\mu \quad (1.6)$$

となる。ここで、 ρ_c は水分子クラスターの密度である。ここで、自由エネルギー変化とクラスター半径との関係を Fig. 1.6 に示す。氷核の半径が臨界半径 r^* を越えたときに自由エネルギー障壁 ΔG^* を乗り越えることがわかる。自由エネルギー変化の式を r で微分し、0とおけば、臨界半径および最大自由エネルギー変化が求まる。

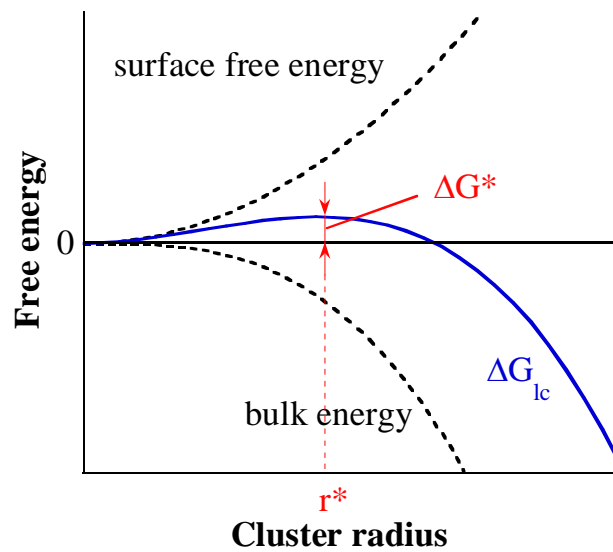


Fig. 1.6 Free energy as a function of cluster radius.

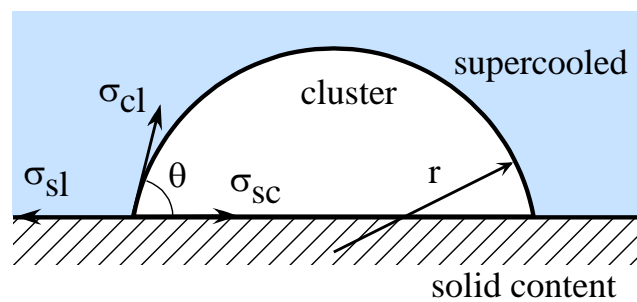


Fig. 1.7 Cluster formed on an insoluble particle (heterogeneous nucleation).

$$r^* = \frac{2\sigma_{cl}}{\rho_c \Delta\mu}$$

$$\Delta G^* = \frac{16\pi \sigma_{cl}^3}{3(\rho_c \Delta\mu)^2} \quad (1.7)$$

いったん臨界半径を乗り越えると、その後組み込まれる水分子はその系の自由エネルギーを一方向的に減少させるので、 r^* 以上の氷核はエネルギー的に安定して成長することができ、初めてマクロな意味での氷となることができる（福迫・稲葉, 1996）。

氷核生成において、均質核生成が起こることは極めて少なく、通常は容器の壁面や液中に存在する不純物（溶液ならば溶質などの異物質）を核生成場と介する不均質核生成が起こる。不均質核生成に基づいた氷核生成を考えるために、水分子クラスターが異質粒子表面で生成される場合を考える（Fig. 1.7）。固体表面における氷核生成で

は、半径 r での自由エネルギー変化 ΔG が次式で表される。

$$\Delta G = -\rho_c V_c \Delta\mu + (\sigma_{sc} - \sigma_{sl}) A_{sc} + \sigma_{cl} A_{cl} \quad (1.8)$$

ここで、 σ は界面エネルギーで、サブスクリプトの sc は固体とクラスター、sl は固体と過冷却水、cl はクラスターと過冷却水との界面をそれぞれ示す。固体とクラスターとの接触角を θ とすると、Young の式からそれぞれの界面エネルギーの相互関係は

$$\sigma_{sc} - \sigma_{sl} = -\sigma_{cl} \cos\theta \quad (1.9)$$

となる。また、水分子クラスター体積 V_c 、表面積 A_{sc}, A_{cl} は次式で求められる。

$$\begin{aligned} V_c &= \frac{1}{3} \pi r^3 (2 - 3\cos\theta + \cos^3\theta) \\ A_{sc} &= \pi r^2 (1 - \cos^2\theta) \\ A_{cl} &= 2\pi r^2 (1 - \cos\theta) \end{aligned} \quad (1.10)$$

均質核生成の場合と同様に、臨界半径 r^* における最大自由エネルギー変化を求めると

$$\begin{aligned} r^* &= \frac{2\sigma_{cl}}{\rho_c \Delta\mu} \\ \Delta G^* &= \frac{4\pi \sigma_{cl}^3}{3(\rho_c \Delta\mu)^2} (2 - 3\cos\theta + \cos^3\theta) \end{aligned} \quad (1.11)$$

が得られる。得られた ΔG^* の式から、接触角が 180° で水分子クラスターは異質粒子表面に濡れなくなり、均質核生成の状態となることがわかる。

1.3.2 細胞内核生成

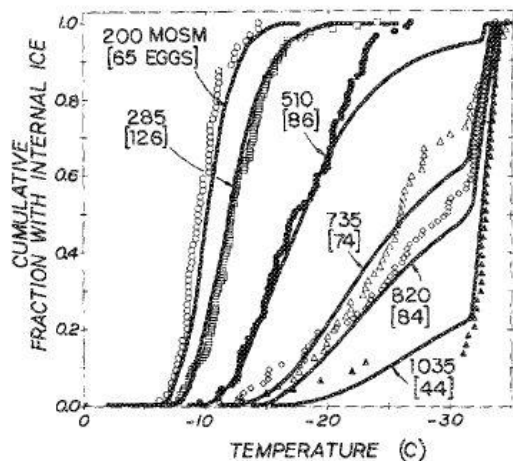
食品・生体組織の冷凍保存において、細胞内凍結による細胞損傷は回避すべき問題である。前項で述べた過冷却と核生成は細胞内凍結の過程にも含まれており、細胞内凍結による損傷を防ぐ観点から、細胞内核生成を予測する現象論的な式がいくつか提案されている (Karlsson, 2010)。Mazur (1989) が提案したモデルは非常にシンプルであり、次の条件を満たす場合に限り、瞬時に細胞内核生成が生じると仮定している。まず、(1) 細胞内液の温度が核生成温度の予測値よりも低く、(2) 過冷却度が 2 K 以上であること。そして、(3) 水の体積分率が 10 % 以上であることの 3 つである。Mazur

は上記モデルを用い、凍害防御剤（グリセリンや DMSO）の溶液に懸濁されたネズミ胚の細胞内凍結を評価している。Pitt らが提案したモデルでは、細胞内核生成の確率 PIF が累積分布関数として次式のように記述されている。

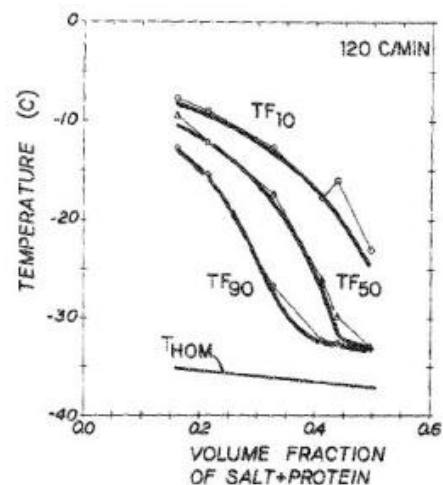
$$\text{PIF}(t) = 1 - \exp\left\{-\int_0^t [\Delta T(t)/C_1]^{C_2} dt\right\} \quad (1.12)$$

ここで、 t は時間、 ΔT は過冷却度、 C_1 と C_2 は動力的パラメータであり、このモデルはイヌの臍島細胞における細胞内凍結の確率予測などで適用されている (Liu et al., 1997)。

Toner ら (1990) は、細胞表面での核生成 (surface-catalyzed nucleation, SCN) と、細胞内の粒子を核とする核生成 (volume-catalyzed nucleation, VCN) の二つが細胞内核生成を記述する上で必要であると述べている。SCN は細胞膜表面上での不均質核生成であり、細胞膜とクラスターとの間の接触角の効果により、均質核生成より高い温度 (-5 から -20 °C) で凍結が起こる。同様の理由で VCN についても、均質核生成より高い温度 (-30 から -35 °C) で凍結が起こる。どちらの場合も動力的パラメータ Ω 、熱力的パラメータ κ 、接触角 θ という 3 つのパラメータに支配されている。Toner の



(a) Comparison of predicted and experimental temperature dependence of the cumulative fraction of oocytes with IIF.



(b) Comparison of percentage of predicted and experimental IIF as a function of volume fraction of solutes.

Fig. 1.8 Predictions of intracellular ice formation (NaCl solution: 200~1035 mOsm, 120 °C/min) (Toner et al., 1990).

モデルによって細胞内凍結を予測した結果が Fig. 1.8 であり，理論値と実験値がよく一致していることがわかる．比較的高い温度での細胞内凍結が細胞の死につながることを考えれば，Toner らの細胞内核生成理論による凍結予測法は生存率を評価する上で有効である．Tsuruta ら（1998）によれば，タマネギ表皮細胞にグリセロール溶液を添加し，その細胞内凍結挙動の顕微鏡観察を行った結果，Toner らの SCN の考え方によって現象を整理できるとしている．

1.3.3 固液界面における溶質掃出しと平衡分配係数

食品などには様々な物質で構成される溶液が含まれており，溶液の凝固は純水の凍結と異なった凝固過程を示す．溶液が凝固する際には，溶質が液相に排出されて濃い未凍結部ができる．この溶質掃出しのメカニズムについては，次の理由が述べられている．例として NaCl 水溶液を考えると，水分子は 2 個の水素原子と 1 個の酸素原子が共有結合したもので，水素側と酸素側はそれぞれ正と負の電荷を帯びている．水分子が結晶化する際には近くの水分子と水素結合し，Fig. 1.9a のような四面体配位をとる構造となる．しかし，NaCl がイオン化して Na^+ が液中に存在すると，負の電荷をもつ酸素原子が Na^+ 側に向くように配向し，イオン近傍の水分子は特徴的な配向状態となる (Fig. 1.9b)．イオンに影響を受けた水分子は，周囲の水分子のみの水素結合により発達する氷晶から排除される．そのため， Na^+ イオンなどを含む水溶液を冷却すると凝固点降下が起こる以外に，イオンを含む部分の水は結晶化せず，固液界面から液体のまま排出されることになる (福迫・稲葉, 1996; 多田ら, 2009)．このことから水溶

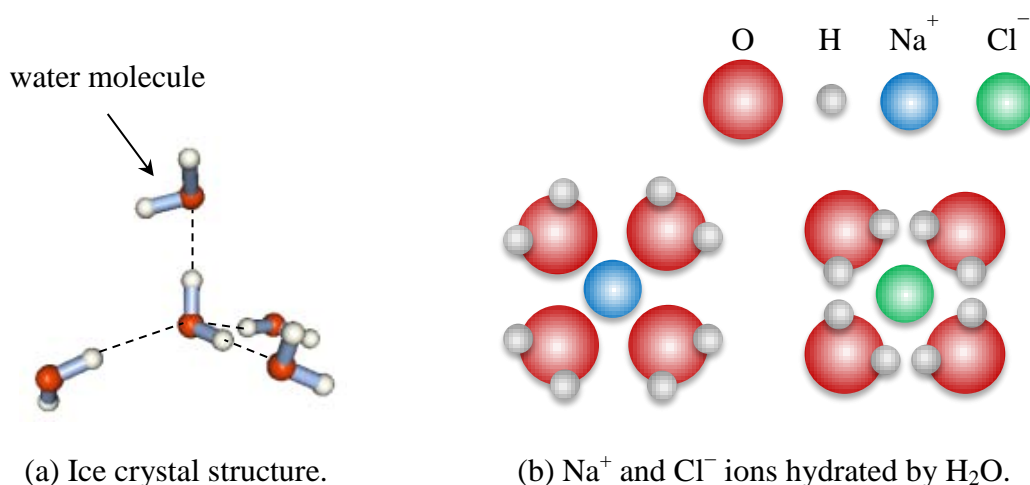


Fig. 1.9 Mechanisms of solute redistribution.

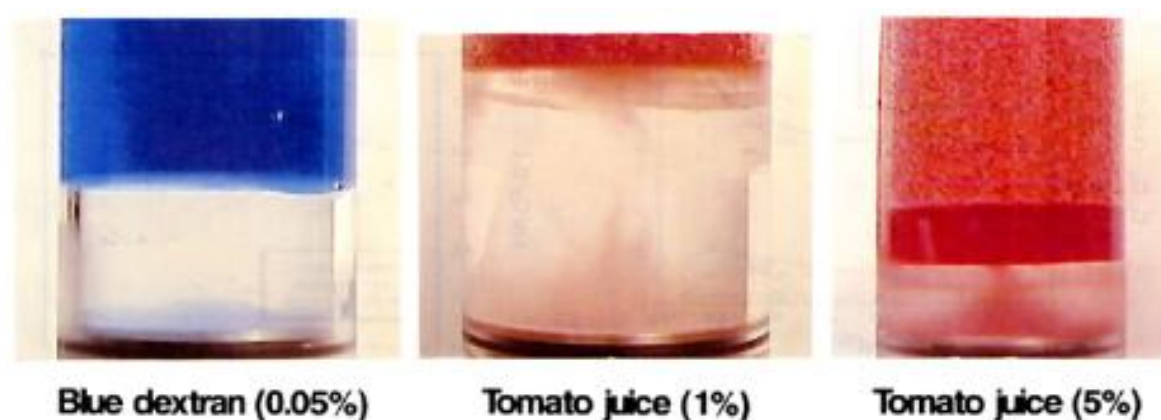


Fig. 1.10 Solutions concentrated by the Progressive Freeze-Concentration method (Liu et al., 1999).

液の凝固は、固液界面における溶質掃出し、拡散をともなう相変化熱・物質移動の問題と考えられる。

固液界面における溶質掃出しの考え方は、合金などの凝固過程における偏析問題の中で多用されている (Illingworth et al., 2005; Voller, 2006)。食品・生体に関連するところでは、液状食品の凍結濃縮率向上を目的とした濃縮法とその成果が示されている (Miyawaki et al., 1998; Liu et al., 1999; Petzold and Aguilera, 2009)。Liu らはトマトジュース (成分 4.3 wt.%) の方向性凝固過程において、固液界面近傍の液側を攪拌することで未凍結部への溶質移動を促進し、溶質が含まれない単一氷晶を形成した。その攪拌速度および界面進行速度を変化させた結果、最大で 18.8 wt.% の濃縮液を生成している。Fig. 1.10 は凍結濃縮させた溶液の写真であり、カラーの部分が高濃縮液を示し、下部には溶質を含んでいない氷が形成されている。

固液界面における溶質掃出しを考える上で重要なファクターが平衡分配係数 k_0 である。固液界面で局所平衡が仮定されている場合、界面固相濃度 C_{solid} は界面液相濃度 C_{liquid} と次のような関係がある。

$$C_{\text{solid}} = k_0 C_{\text{liquid}} \quad (1.13)$$

この固相と液相の濃度差によって、溶液が凝固した時に濃縮部が現れるようになる。平衡分配係数は重要因子であるが、界面が時々刻々と移動する中で瞬時の界面濃度を

実験的に測定することは困難である。また、界面進行速度が大きいと固相内に溶質がトラップされるため、界面が超低速で移動している場合でないと正確に評価されない。そのため、平衡分配係数の代わりにみかけの分配係数や有効分配係数という形で利用されている。Matsuda and Kawasaki (1997) は、方向性凝固（凍結速度 2.9~10.9 mm/h）させた溶液固相部と残液部との濃度比をみかけの分配係数として定義し、濃度 5000 mg/L のグルコース溶液と NaCl 溶液のみかけの分配係数が~0.95 であったと述べている。前出の凍結濃縮率改善に関する報告の中でも、界面進行速度 50 mm/h の下で界面を攪拌しない場合だと、有効分配係数（方向性凝固溶液の固相部と残液部との濃度比）が~0.95 であると示されている (Liu et al., 1999)。また、凍結速度 0.1~1.0 mm/h の範囲で方向性凝固実験を行った高橋ら (2011) は、みかけの分配係数に固相部濃度と初期溶液濃度との比を用いて評価した結果、凍結速度が速く、初期濃度が高いほど分配係数が高くなると考察しており、Butler (2001) も同様の傾向を示している。

1.3.4 凝固点降下

純粋な水は 1 atm の雰囲気下では 0 °C で凝固する。しかし、NaCl やブドウ糖など他の物質が溶けた水はより低温で凝固するようになる。この現象を凝固点降下という。溶液は水と溶質が混合したエントロピーの大きい状態なので、純粋な水よりも自由エネルギーが低い。したがって、より低い温度で凝固が起きる。食品・生体に含まれる水にはそれ以外の成分が溶質として、あるいは分散質として含まれている。そのため、凝固点降下が食品・生体の冷凍過程における一つの特徴となる。一般的に、凝固点降下は溶質の濃度に比例しており、高濃度であるほど凝固点が低くなる。凝固点降下に関しては、Woods ら (1999) が NaCl 水溶液に凍害防御剤（エチレングリコール）を添加し、示差走査熱量測定によってその凝固点を求めている。また、凍害防御剤と NaCl の添加量の比をとり、溶質濃度に対する凝固点 T_f の整理式を示している。

$$T_f = (-0.676 + 4.77 \times 10^{-3} R)C - (7.64 \times 10^{-3} + 2.75 \times 10^{-5} R)C^2 \quad (1.14)$$

ここで、 R はエチレングリコールと NaCl の質量比、 C は全溶質の質量パーセント濃度である。

NaCl 水溶液の相図を簡略化して Fig. 1.11 に示す。溶質が水に溶解しているとき、溶液の凝固点は相図から求まる。冷却開始後、a 点に相当する濃度の溶液は 0 °C で凝固しないが、b 点に到達すると凝固し始める。過冷却が生じなければ、溶質が排出さ

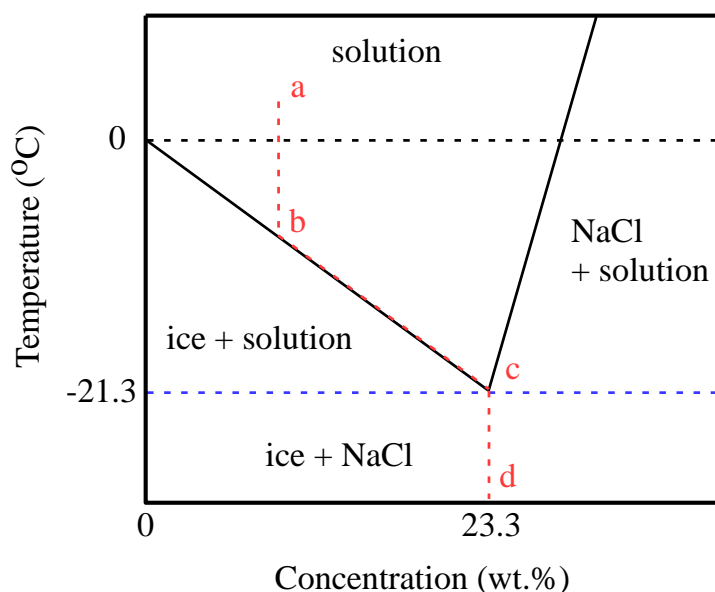


Fig. 1.11 Schematic of phase diagram of NaCl solution.

れてより高濃度な溶液となり，さらに低温で凝固する．これは，c 点（共晶点）に達するまで継続する．共晶点は，平衡状態で溶液が液体として存在できる最も低い温度であり，共晶点以下での溶液は氷と溶質で構成される．

1.3.5 細胞膜を介した水分輸送

細胞は、「細胞膜に囲まれ，原則的には内部に 1 個の核を持つ生体の構造的かつ機能的単位」と定義されており，1665 年には Hooke によってラテン語由来の「cell」という言葉が提唱された（日本機械学会編，1997）．細胞は大きく原核細胞と真核細胞の二つに分けられる．前者には細菌や藍藻植物が該当し，後者は上記以外の細胞性の生物に含まれている．真核細胞内には膜で仕切られた複雑な細胞小器官が多数存在する．多細胞生物では，これら細胞が集合して組織を形成し，さらに特定の機能を果たす器官や系を構成している．ここで，Fig. 1.12 に代表的な動物細胞の構造を示す．細胞は細胞膜によって取り囲まれ，内部には核やゴルジ体などの小器官が多数存在している．生体膜という言葉があるが，細胞が有している膜の中でも細胞膜や細胞内膜のことを狭義に意味している（妹尾，1987）．生体膜は様々な形態や働きを備えており，細胞壁や外皮とは違って代謝活性を有している．生体膜にはたくさんの種類があり様々な働きをするが，その厚さは共通して約 8.5 nm のほぼ一定値をとる．また，どの膜も脂質とタンパク質を主成分としている．細胞膜については，タンパク質の分布が均一でなく，大別して膜の表面にあって比較的容易に抽出されるものと，膜の内部に埋もれて

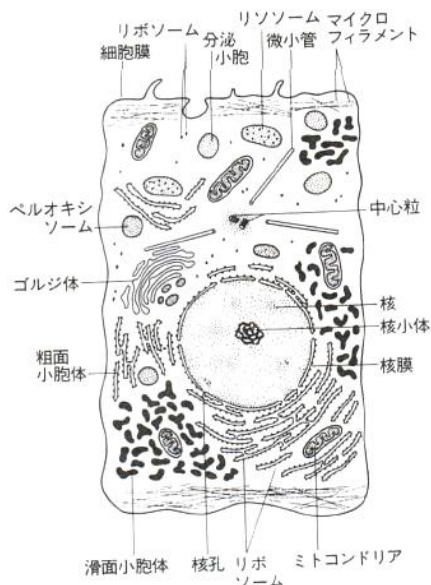


Fig. 1.12 Schematic of an animal cell structure (妹尾, 1987).

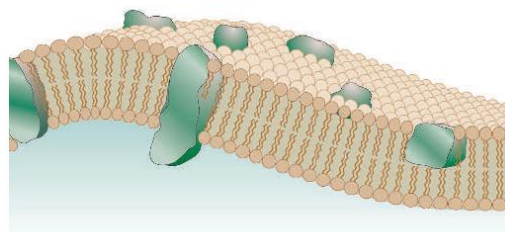


Fig. 1.13 General models for membrane structure, Singer-Nicolson 'fluid mosaic model' (Engelman, 2005).

いて抽出しにくいものの二種類が確認されている。これらの結果から、Singer と Nicolson は Fig. 1.13 に示すような流動性モザイクモデルを提案している (Engelman, 2005)。リン脂質の親水基が外側になるように並んだ二重層にタンパク質が点在する構造をとっており、細胞表面からは糖タンパク質が突出していて、細胞間の相互作用に参与していることが知られている。

細胞膜の主な役割は、細胞内外を隔てる境界としての役割だけでなく、細胞内と外界との相互作用の場として非常に重要な働きを持っている。その働きは大きく分けて、物質の透過、情報の伝達、そして反応の場である。外界から細胞内へ、逆に細胞内から外界へ出入りする物質は必ず膜を通る。膜は物質の透過を制御しており、正常な条件下では必要な物質だけを膜が輸送し、有害なものを排除する。また必要な物質の外部への流出を防ぎ、不要なものを排出する働きをしている。そのため、高品位な冷凍保存を実現するには細胞膜を保護することが不可欠である。細胞膜の透過選択性は、膜が単なる受動的な仕切りではなく、能動的な機能を示している。一般的に細胞膜は半透膜とみなされ、溶媒である水がよく透過する一方で、溶質であるイオンや有機分子は透過しにくいという性質がある。

水が膜を透過する際の駆動力の一つに、細胞内外の溶液濃度の違いに起因する浸透

圧差が挙げられる。浸透圧差による膜輸送を理解するために、Fig. 1.14 のような半透膜を介して水とスクロース水溶液が隣り合う状況を考える。半透膜は溶質（スクロース）を通さないため、水溶液側の水分子はスクロースの存在によって移動しにくい状態となる。逆に水側の水分子は膜透過して水溶液側に移動する。移動後の水と水溶液の体積がそれぞれ変化するため、移動前の体積になるように水溶液側に圧力を加えるとする。この圧力は浸透圧と呼ばれ、溶液の濃度が高いほど大きくなり、作用する方向は水分子が溶液側に移動する方向として定義される。冷凍保存における浸透圧差が生じる例としては細胞外凍結が挙げられる。細胞外凍結の進行とともに溶質掃出しによって細胞外の未凍結部の濃度が上昇し、細胞内液との浸透圧差が生じて細胞内から細胞外へと水分子が移動する。その結果、細胞収縮を起し塩害が発生する可能性も

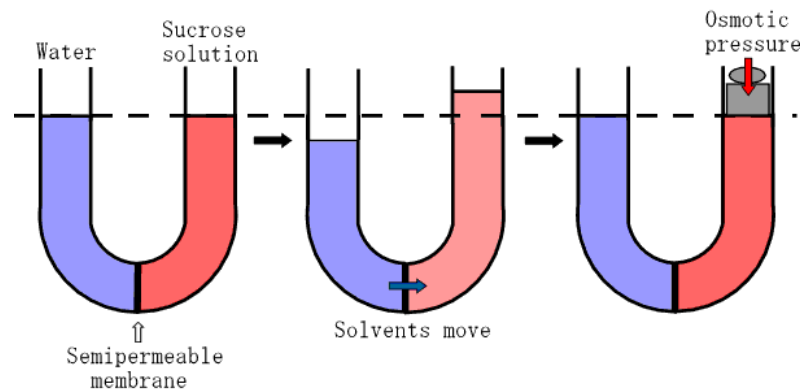


Fig. 1.14 Moisture transport through a membrane due to an osmotic pressure difference.

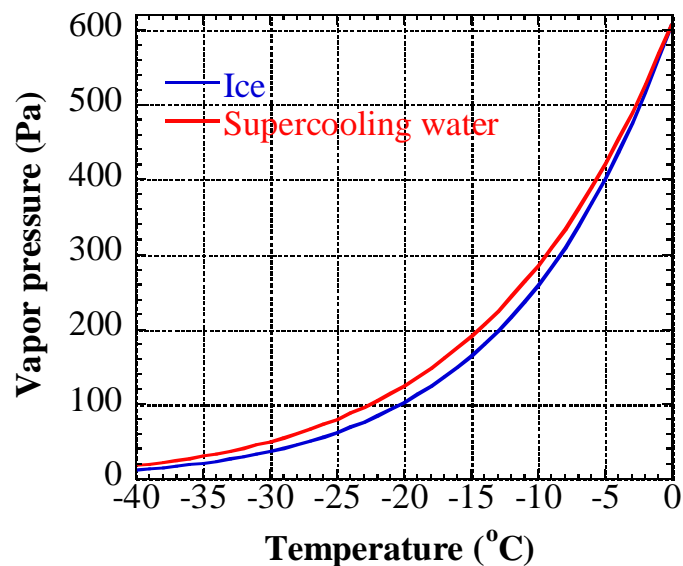


Fig. 1.15 Vapor pressure curves of ice and super-cooling water.

ある。

膜を介した水分輸送については、蒸気圧差が駆動力となる場合も考えられる。Fig. 1.15 は低温における氷と過冷却水の蒸気圧曲線である。図から、わずかではあるが過冷却水と氷との間に蒸気圧差が存在していることがわかる。したがって、冷凍あるいは解凍過程において、細胞外凍結が支配的かつ細胞内液が過冷却状態にあるとすれば、細胞内の水分子は蒸気分子となり細胞膜を透過して細胞外へ移動しやすくなる。移動した蒸気分子は細胞外の氷晶の表面で昇華すると考えられる。

1.4 脱水冷凍法

1.4.1 従来の脱水冷凍

食品の冷凍保存を行う場合、一般的には細胞外凍結が支配的であり、食品中に存在する水分が細胞外氷晶へと変化する。この氷晶が冷凍過程において成長し、周囲の組織や細胞膜を破壊するくらいの大きさになると、ドロップの流出による解凍後の品質低下が避けられなくなる。このことから、予め食品中水分を幾分除去し、核生成後の氷晶成長を抑制する方法として脱水冷凍法が用いられている。従来の脱水方法には、高濃度の糖液や食塩水に浸漬することで浸透圧作用により脱水を促す浸透圧脱水や、温風などで直接的に表面から乾燥させる温風乾燥などが挙げられる。しかし、浸透圧脱水は高濃度の溶液に時間をかけて浸漬する必要があるため、食品の味や色味を変えてしまうデメリットがある。そのため、昨今では脱水シートと呼ばれる半透膜を利用して、食品のもつ本来の味や香りの保存性を高める工夫がなされている(保井ら, 1996; 濱田ら, 2003)。温風乾燥については、食品内部の水分を除去する効率が悪く、すでに乾燥した表面に対して余分な熱を加えてしまう。その結果、表面状態が乾燥前より悪化してしまい、食感などに影響を与える可能性がある(Ramallo and Mascheroni, 2010)。

食品の中でも果物や野菜は高い含水率を有しており、急速凍結も併用して脱水冷凍されることが多い。そのため、脱水冷凍が冷凍品に与える効果を調査した既往研究が多くなされている。Delgado and Rubiolo (2005) は新鮮なイチゴと浸透圧脱水後のイチゴを凍結・解凍し、SEM による組織観察を行って浸透圧脱水条件と組織構造との関係を示している。また、ニンジン、ブロッコリ、ポテトに対してスクロース溶液での浸透圧脱水を施し、各試料の凍結・解凍・復水後のレオロジー特性を測定した研究もある(Ohnishi and Miyawaski, 2005)。Prinzivalli ら (2006) は、試料にイチゴを用い

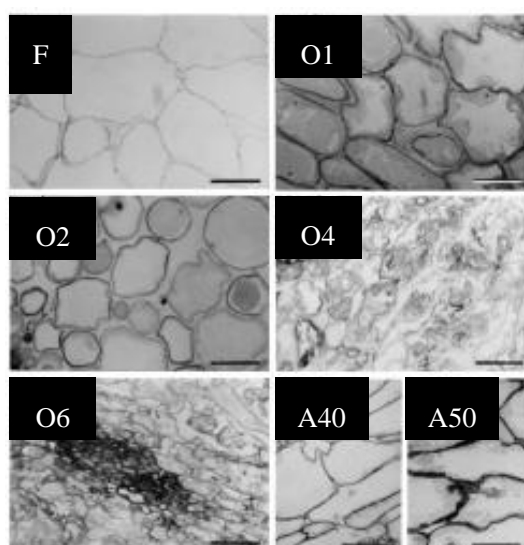


Fig. 1.16 Photomicrograph of microstructure of strawberries after osmotic dehydration or hot-air drying (Prinzivalli et al., 2006).

て浸透圧脱水時間が組織構造，テクスチャー，ペクチン組成に及ぼす影響を調べている． Fig. 1.16 は Prinzivalli らが顕微鏡観察したイチゴの組織写真である． 図中の F は脱水前， O は浸透圧脱水後， A は温風乾燥後の試料を示し， 数字は処理時間を意味する． 脱水前の細胞形状と比較して， 脱水時間が多くなるほど細胞が小さくなり， 細胞膜が歪む． 脱水によって凍結時の氷晶成長は抑えられるが， O6 のような状態まで脱水されると食感がなくなってしまうため， 食品としての価値が失われる．

1.4.2 マイクロ波減圧乾燥法を用いた脱水冷凍

前述したように，浸透圧作用や温風乾燥を利用した水分除去にはいくつかのデメリットがある． これらのデメリットを解消する方法としてマイクロ波減圧乾燥法（鶴田・林，2006）が挙げられ，この技術を用いた脱水冷凍（マイクロ波デハイドロフリーズ）が提案されている． これまでに，マグロとイチゴにマイクロ波デハイドロフリーズを施し，予備乾燥による冷凍時間の短縮，ならびに凍結時の氷晶成長を抑制する効果が示されている（鶴田・ハミディ，2008）． また，サバを試料とした解凍挙動の観察を行い，氷晶成長に起因する組織損傷を軽減することで，解凍時において冷凍前の細胞形状へ復元できる可能性が示唆されている（ハミディ・鶴田，2009）．

マイクロ波減圧乾燥法の原理図を Fig. 1.17 に示す． マイクロ波減圧乾燥の特色の一つは，真空容器内を減圧し沸点を下げて常温乾燥を可能とすることである． Fig. 1.18 は水の蒸気圧曲線を示しており，約 5 kPa 程度まで減圧された雰囲気では約 30 °C で

水が蒸気となる。この温度帯であれば乾燥体への熱的ダメージはほとんどないと考えられる。二つ目は、マイクロ波によって選択的に水分へ蒸発潜熱を供給し乾燥を行うことである。これによって、効率的な予備脱水を行うことができる。脱水冷凍にマイクロ波減圧乾燥法を適用する最大の利点は、食品中の水分分布を冷凍に適した分布に変化させる点である。Fig. 1.19 は 3 cm 角のダイコンをマイクロ波減圧乾燥によって

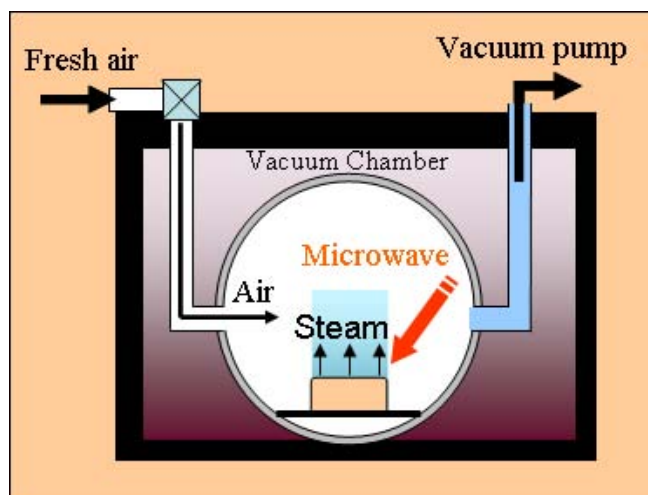


Fig. 1.17 Microwave vacuum drying with air intake system.

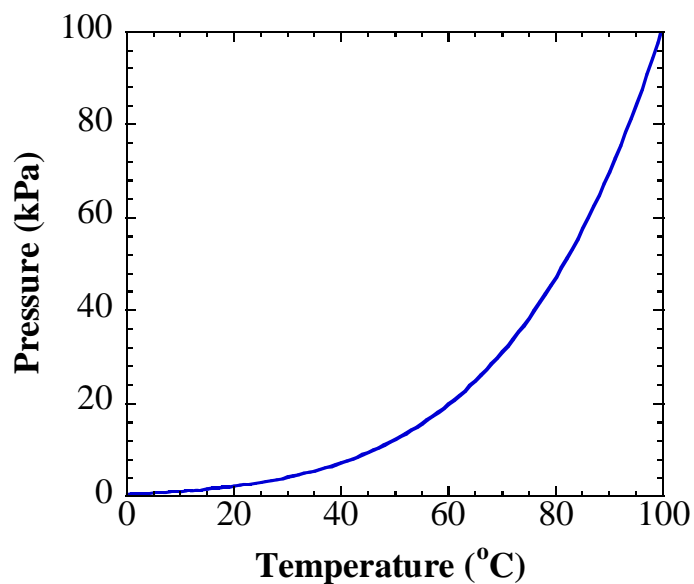


Fig. 1.18 Vapor pressure curve of water.

乾燥させた際の内部水分分布を捉えた MRI 画像である (田中ら, 2007). マイクロ波減圧乾燥を施すことによって, 試料内部の水分が外表面に滲み出して常温で蒸発するため, 水分が表層部に多く, 内部に少ないという特徴的な分布を呈していることが図からわかる. 冷凍時には, 表層部は急冷が可能であり, 冷却速度の落ちる内部では水分が減じられており, 氷晶成長を抑える点において効果的な水分分布が形成されている. 食品中などに存在する水は二種類に区別され, 一つは自由水, もう一つは結合水と呼ばれている. 自由水は熱力学的に自由に運動することのできる状態の水である. その一方で, 食品中の可溶性成分を溶かしているほか, 主成分であるタンパク質の活性基, あるいは炭水化物の活性基である水酸基などと水素結合しているものが結合水である. 予備乾燥時の乾燥速度は終始同一ではなく, 自由水は容易に気化するが結合水は気化しにくい. また冷凍過程では, 結合水が食品の構成成分と結合してその活性基を安定化していることから, $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ くらいまで冷却しても凍結しないと言われている.

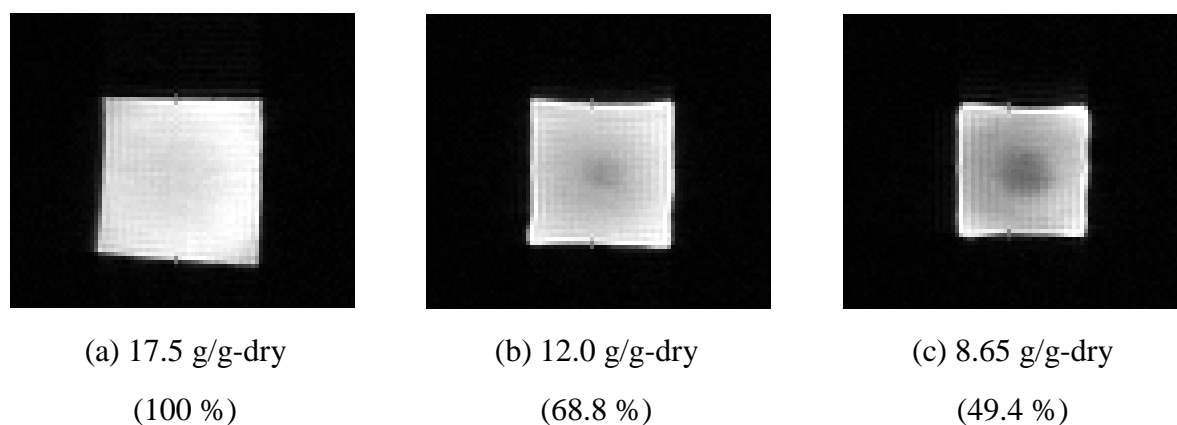


Fig. 1.19 MRI images of radishes (3 cm squares) after microwave vacuum drying (田中ら, 2007).

1.5 冷凍保存に関する研究の現状

1.5.1 解凍過程に着目した既存報告

冷凍過程を経た食品・生体は解凍されて初めて利用の道が開かれる。そして、解凍過程において氷晶を融かし、可能な限り元の状態へ戻るようにすることが最良の解凍法となる。とはいえ、解凍によって冷凍時の組織損傷が改善されることはないため、冷凍・解凍過程のそれぞれで最適な方法・条件を選択することが必要となる。解凍時の主な損傷要因には、水の再結晶化が挙げられる。再結晶化は、解凍中に小さな氷晶の融解と結合が同時に起こることで、より大きな氷晶が形成される現象である (Cao et al., 2003)。正確な定義は、「結晶固化完了後の結晶の数、大きさ、形状、方向性、周期性の度合いの変化」とされていて、解凍に限った話ではない (萩原, 2011)。再結晶化に起因する損傷の痕跡や、高濃度溶液の凍結過程における氷晶成長を顕微鏡観察した報告 (Hagiwara et al., 2002; 小城ら, 2006) はいくつかあるが、組織内での発生機構および条件に関して詳細を示した研究例は少ない。とはいえ、解凍を速めることによって再結晶化の防止が可能となることから、急速解凍を推奨する意見が多くなっている。

冷凍過程においては、細胞内凍結が発生しない冷却速度で急速凍結させることが、氷晶による組織損傷を防ぐための定石となっている。対照的に、解凍過程については冷凍や貯蔵過程に比べて知見が少なく、様々な見解が示されている。例えば、御木と西元 (1987) は凍結魚の解凍において、品質の良否を決定する因子が解凍前の品質・解凍速度・解凍終温度・解凍方法の4つであるとし、解凍速度については微生物的な衛生上の問題から、できるだけ低温で迅速に解凍を行うことが理想であると述べている。また、解凍終温度が低いほど、ドリップロスを抑制する傾向にあり、解凍終温度の影響は大きいと考察している。この他にも、急速解凍に優位性のあることを示した報告がある (阿部ら, 2009; Eastridge and Bowker, 2011)。阿部ら (2009) は、解凍速度と解凍魚肉タンパク質の変性度およびドリップ流出量との関係を魚種別に示し、急速解凍によって変性が抑制されるとともにドリップ量が少なくなると論じている。Seki and Mazur (2008) の研究によれば、ネズミの卵細胞を解凍する場合、2200 °C/min 以上の解凍速度で素早く解凍することで、失透 (devitrification) を起こさずに高い生存率が得られるという。

一方、尾藤 (1986) はマアジおよびコイを試料に用い、解凍硬直と解凍速度の関係を考察し、融点付近での緩慢解凍が解凍硬直の抑制に有効であることを示唆している。また、細胞外凍結した氷が水になり、再び筋組織がその水を吸収するための時間確保も考慮すべき点である (福迫・稲葉, 1996; 日本冷凍空調学会編, 2000)。多田ら (1996) は、細胞壁から単離された小麦プロトプラストの凍結・解凍実験を行い、細胞の吸水・回復挙動と生存状態との関係を示している。その中で、プロトプラストのように細胞膜が脆い細胞をゆっくり凍結した場合、膜の保護を念頭において解凍速度を決める必要性が示されている。すなわち解凍過程において、細胞への急激な水分流入や細胞外からの大きな浸透圧ストレスは膜に大きな負担を与えるため、損傷を低減するために緩慢解凍が有効であるとしている。

1.5.2 数値解析を利用した既存報告

近年の計算機の進歩にともない、単一細胞や食品・生体組織を保存対象とした冷凍・解凍過程の数値解析が行われている。分子スケールでは、凍害防御剤であるエチレングリコールとグリセリンの水素結合能への温度および濃度の効果や、細胞膜を模した脂質膜の構造や透過性に対するジメチルスルホキシド (DMSO) の影響が分子動力学 (MD) シミュレーションによって示されている (Weng et al., 2011; Lin et al., 2012)。また、MD シミュレーションを用いたグリセリン溶液のガラス転移温度予測が Li ら (2008) によって行われており、示差熱量測定値との比較が示されている。

単一細胞程度の大きさになると、細胞膜を介した水分輸送に着目したモデルが提案されており、冷凍過程での細胞収縮を含む計算結果が示されている。Mazur and Koshimoto (2002) は、マウス精子の冷凍保存における高冷却速度 (260, 530 °C/min) での生存率低下について、細胞内氷核生成以外の原因を探るために数値計算を行っている。Mao ら (2003) は単一細胞と氷晶との間で起こる相互作用に着目し、食塩水で満たされた半透膜で形成される閉空間を細胞と見なしてモデル化している。計算結果には細胞外溶液の凝固領域が発達する様子も示されており、Mazur のモデルとの比較も行われている。また、細胞タイプごとに細胞内核生成と氷晶成長を予測するモデルの提案や、細胞内液のガラス転移を誘起するための CPA 添加温度の最適化が報告されている (Yang et al., 2009; Liu et al., 2012)。少数ではあるが、冷凍保存された単一細胞の解凍について数値計算を行った例がいくつかある。Karlsson (2001) は、冷凍時に非結晶状態にある細胞内液が解凍過程で結晶化する現象 (devitrification) において、

冷凍時の細胞脱水がどのような影響を及ぼすかを数値的に検証している。Weng ら (2010) は、細胞膜を介した水分輸送現象を非理想溶液の仮定に基づいてモデル化し、冷凍・解凍過程の数値解析結果と理想溶液での結果との比較を行っている。

サイズの大きい食品・生体が対象となると、冷凍過程における凍結時間や組織表面での熱伝達率を予測するために数値解析が行われている (Delgado and Sun, 2001)。一方、組織細胞の収縮状態の把握を目的として、冷凍過程における細胞内核生成を考慮した熱・生物物理学モデルが提案されており、血管部と細胞部を表現するために Fig. 1.20 のような Krogh シリンダーをベースとしたモデルが提案されている (Bischof and Rubinsky, 1993; Devireddy et al., 2002)。Hayashi ら (1994) は簡易化された物理化学モデルを用いて、単一細胞あるいは生体組織を対象とした冷凍過程におけるマイクロスケール挙動解析を行っている。また、解凍過程の数値解析に関する既存報告が比較的少ない中で、このモデルは解凍過程での細胞挙動シミュレーションにも適用されている (百生ら, 1996)。白樫と棚澤 (1995) は、細胞同士が離れていると見なせる組織を対象として、他の報告でも考慮されている細胞内外液間の膜輸送のみならず、物質輸送が細胞外の基質においても存在すると仮定したモデリングを行っている。この白樫・棚澤の数値解析モデルは、生体組織だけでなく溶液系食品材料の凍結においても利用されている (上西ら, 2003)。

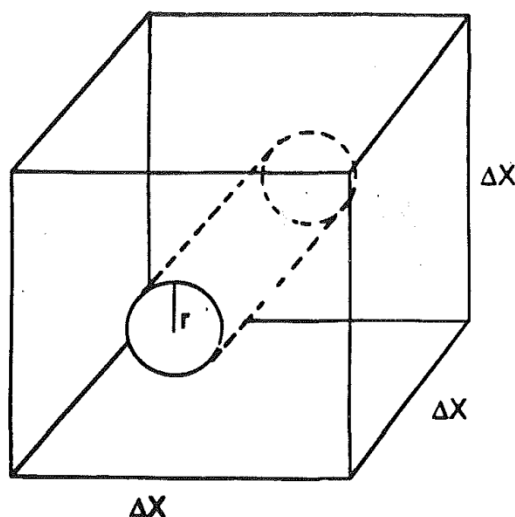


Fig. 1.20 Krogh cylinder model (Devireddy et al., 2002).

1.6 本論文の研究内容

食品・生体の冷凍保存の研究分野では、実験と解析の両面において解凍過程に関する既存報告がまだ少なく、明確な指針が示されていない現状がある。解凍速度は解凍品の最終状態を決定する上で重要なファクターとなるが、再結晶化防止と細胞膜保護・細胞復元との観点が相反しているため、意見が収束していない。また、組織の冷凍保存をシミュレートする数値解析モデルとして、細胞脱水や核生成理論を取り入れた例がいくつかあるものの、冷凍・解凍時の組織状態をこと細かく示しているものは少ない。それ故に本論文では、食品・生体の冷凍保存を改善するために行われる脱水冷凍法について、その冷凍と解凍過程における組織内の熱・物質移動現象を明らかにするとともに、氷晶による組織損傷機構との関連を調べ、より高品位な冷凍保存を可能とするための冷凍・解凍方法に関する提言を行うことを目的としている。

本論文の構成と概要を以下に示す。

第1章「序章」では、まず、細胞の凍結保存に関して従来述べられている生存率と冷却速度との関係および氷晶成長機構について説明した。さらに、細胞組織内で起こる現象への理解を深めるために、細胞が存在することで生じる水分挙動について整理した。また、氷晶成長の抑制効果を有する脱水冷凍法の一つであるマイクロ波デハイドロフリージングの概要ならびに既往研究を紹介するとともに、本論文の研究目的を示した。

第2章「マイクロ波デハイドロフリージングによる凍結魚肉組織の冷凍・解凍特性」では、再結晶化防止と細胞膜保護・細胞復元との間で解凍速度に関する意見が相反している背景を踏まえて、脱水冷凍を施した魚肉組織（サバとタイ）について、解凍速度と魚種による組織損傷の違いを調べ、冷凍・解凍特性との関連を検討している。その中で、タイの筋組織内部において再結晶化による損傷が確認されたため、その発生形態を明らかにすることが本論文での大きな目標となっている。

第3章「魚肉組織の冷凍過程における数値解析と実験との比較」では、魚肉組織の冷凍過程における予備脱水の影響を明らかにすることを目的とし、組織内の熱・物質移動を記述するための二重セルモデルを構築し、数値解析を行って実験結果と比較している。

第4章「魚肉組織由来溶液の溶質分配係数の測定」では、脱水冷凍においてその影響が顕著になると予測される凍結濃縮効果を考慮するため、固液界面における溶質掃出しを記述する溶質の分配係数を実験的に評価している。測定対象には、生体の冷凍保存に関する数値解析で多用されている NaCl 水溶液に加え、第2章で魚種の違いを確認するために取り扱ったサバとタイの組織液を選定している。方向性凝固観察法を用いた実験観察によって、溶質分配係数を簡易的に測定できる方法を提案するとともに、計測値について先行研究との比較を行い、本手法の有効性を確認している。

第5章「魚肉組織の冷凍過程における細胞収縮と細胞ダメージとの関係」では、第3章で提案した二重セルモデルに、細胞内核生成理論と氷・過冷却水間での蒸気圧差に基づく水分輸送機構を導入する。このモデルを用いて冷凍過程の数値解析を再度行い、細胞収縮と細胞損傷との関係について調査している。中でも、マイクロ波減圧乾燥による予備脱水と魚種の違いに着目し、パラメータを変えて数値解析を行うことによってそれらの影響を定量的に評価している。

第6章「凍結魚肉組織の解凍過程における水分の再結晶化」では、タイの筋組織内部で発生した再結晶化が melt/refreeze に起因する現象であるかの検証を目的とし、二重セルモデルを用いた解凍過程の熱・物質移動数値解析を行っている。その結果、melt/refreeze に基づいて想定した再結晶化プロセスが起こり得ないと考えられ、氷晶成長が解凍時再結晶化の主な原因になるという考えに帰着している。

第7章「組織細胞内における氷晶成長速度の実験評価」では、第6章で得られた結果を踏まえ、タマネギ表皮組織における細胞内水分の凍結挙動を顕微鏡観察している。特に、含水率の氷晶成長速度への影響を検討した結果について述べており、細胞内氷晶の成長抑制に対する予備脱水の有効性を実験結果から論じている。また、タイの筋組織内部での再結晶化による損傷については、氷晶成長速度の影響が大きいことを推察している。

第8章「総括」では、本論文の研究で得られた成果について述べている。

第2章

マイクロ波デハイドロフリーズングによる凍結魚肉組織の冷凍・解凍特性

2.1 緒言

冷凍された食品は解凍処理を経て使用されることがほとんどである反面、解凍方法・条件の影響に関する知見は少なく、様々な見解が述べられている。特に解凍速度については、タンパク質変性や再結晶化を防止する観点から迅速な解凍を推奨する意見（阿部ら, 2009; Eastridge and Bowker, 2011）と、筋組織への水分再吸収プロセスや細胞膜保護を重視して緩慢解凍を支持する意見（多田ら, 1996; 福迫・稲葉, 1996）とに分かれているが、それぞれの利点を有する解凍速度が一意的に定まるようにも思われる。すなわち、冷凍時には Mazur の N 曲線という大まかな指針が示されているように、解凍過程においても検証を積み重ねることで、生存率あるいは組織復元率に対する解凍速度の影響を明らかにすることが重要と考えられる。

また、凍結時の組織状態が解凍後の復元に影響することも検討すべき部分であることから、Hamidi (2009) は、マイクロ波デハイドロフリーズングを施したサバの凍結組織の融解過程を顕微鏡観察し、解凍時の組織復元に対する組織内氷晶サイズの影響について次のように考察している。Fig. 2.1 は、未凍結状態のサバの筋組織と -80°C で凍結した組織の顕微鏡写真である。ほとんどの氷晶が筋組織の外側に生成しており、細胞外凍結が支配的であることがわかる。また、氷結晶の成長によって筋組織が機械的ストレスを受け、新鮮な状態と比べて収縮している様子を確認できる。次に、冷却温度条件と脱水量を変えて得られた氷晶相当直径と筋組織の圧縮の度合いについて評価した結果が Fig. 2.2 である。横軸は氷晶相当直径であり、縦軸に凍結前のサバの筋組織の大きさ（断面積で評価し、 V_i とする）と凍結時の氷晶成長によって収縮した

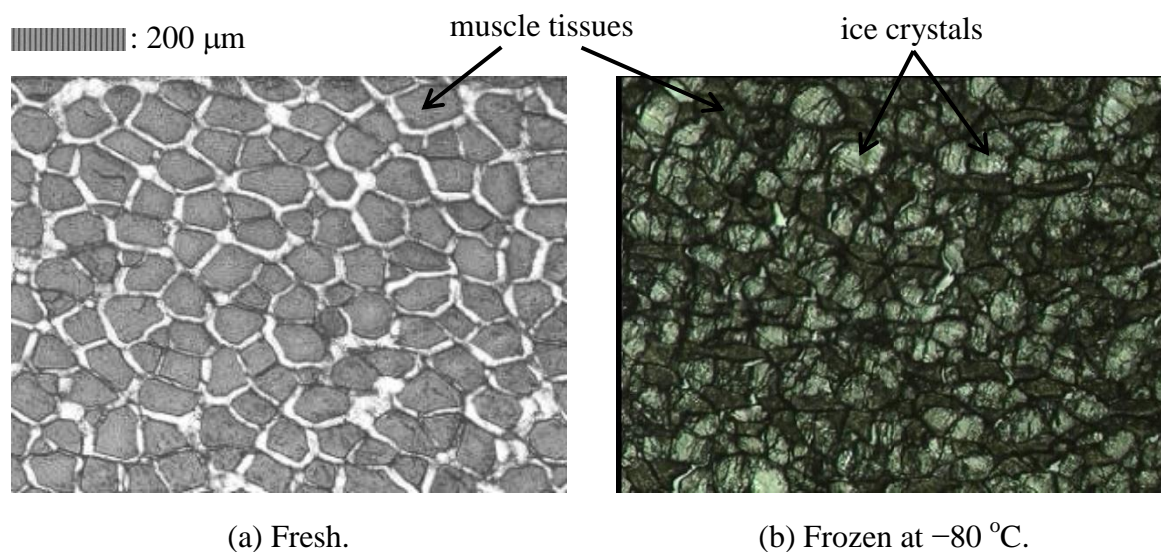


Fig. 2.1 Photomicrographs of cross section of mackerel.

筋組織の大きさ (V_d) の比を示しているが、氷晶サイズが大きくなるほど筋組織が収縮変形している。また、解凍した筋組織の復元割合と氷晶による収縮率 V_d/V_i との関係が Fig. 2.3 である。 V_d/V_i が 0.8 以上では 60 % 以上に復元するが、氷晶による収縮が進むと急激に復元率が低下している。上記の Hamidi による結果と考察から、凍結時の氷晶によるストレスが小さい筋組織ほど解凍後に復元する割合が高まる、つまり解凍過程の水分再吸収が重要になると考えられる。そこで本章では、氷晶の微細化を可能とするマイクロ波デハイドロフリージングを施した魚肉組織について、解凍速度および魚種による違いを調べ、冷凍・解凍特性を検討することにする。

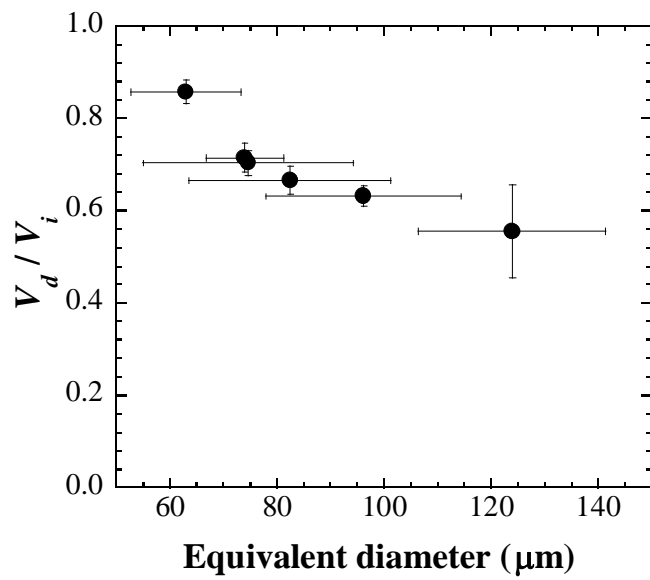


Fig. 2.2 Volume of deformed muscle fiber after freezing (V_d) normalized by initial volume of muscle before freezing (V_i) as a function of equivalent ice crystal diameter.

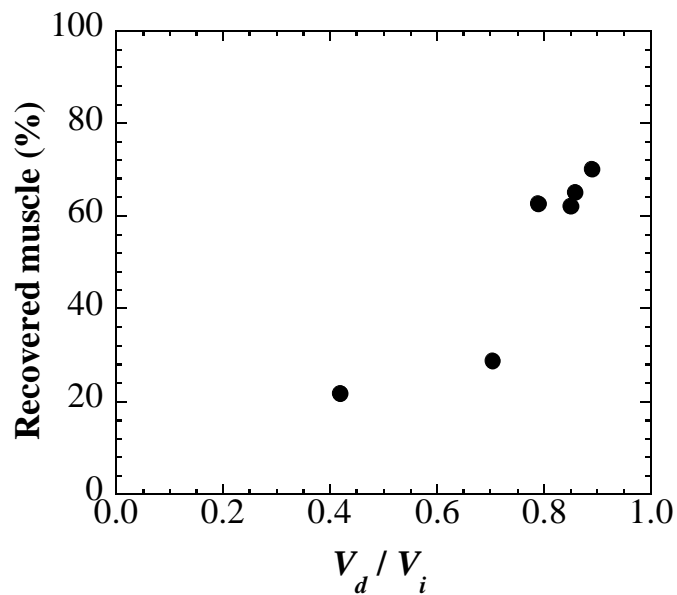


Fig. 2.3 Percentage of recovered muscle after thawing as a function of V_d / V_i , volume of deformed muscle fiber after freezing (V_d) normalized by initial volume of muscle before freezing (V_i).

2.2 実験装置および実験方法

2.2.1 マイクロ波減圧乾燥

マイクロ波減圧乾燥装置の概略図を Fig. 2.4 に示す。真空チャンバーは、内径 600 mm、高さ 400 mm の円柱形で、内容積は約 100 L、材質は SUS304 である。また、容器の底には直径 500 mm のターンテーブルを設けている。真空チャンバー正面には観察窓を備え、実験中の試料状態を観察することができる。チャンバー内は真空ポンプによって減圧され、圧力調節はポンプのバルブ操作で行われる。この真空チャンバー内に窒素ガス (~3.5 L/min) が流入し、蒸気と共に真空ポンプによって排出される。この気流導入によって乾燥の高速化が可能となる。温度測定には、マイクロ波の影響を受けない蛍光式光ファイバー温度計 (安立計器, FL-2000SP) を用いている。圧力センサについてもマイクロ波の影響を考慮して容器外に配し、おおよその内圧を測定している。実験中の温度および圧力は計測器 (HIOKI, 8421-50) を経由して PC に記録される。減圧乾燥の条件は、チャンバー内圧力を 5 kPa 以下に保ち、試料温度が 27 °C を超えないように 100 W の照射モードにおいて照射制御を行った。

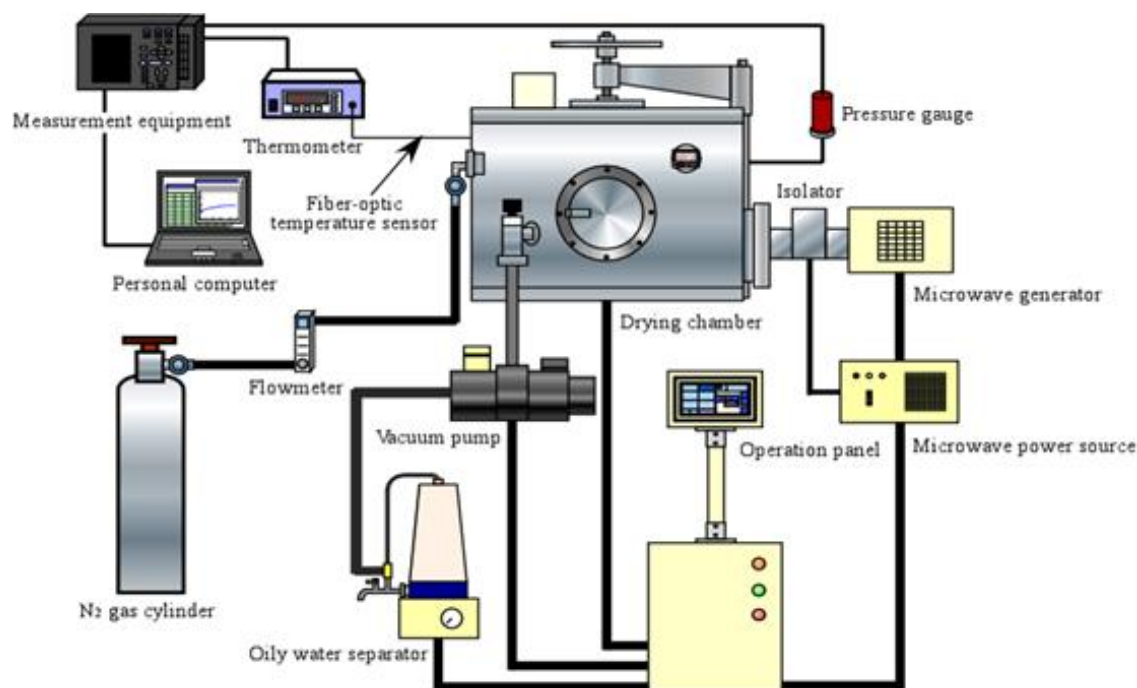


Fig. 2.4 Microwave vacuum drying system.

2.2.2 試料の予備脱水および冷凍

本実験では、玄界灘で早朝釣り上げられたサバ、および愛媛県産養殖のタイを使用した。朝シメ処理を施した後に、サバは頭と尾ひれを落として内臓を取り除き、胴部を厚さ 20 mm にスライスしたもの（含水率 約 60 %，質量 約 45 g），タイは厚み 20 mm の切り身にしたもの（含水率 約 70 %，質量 約 30 g）を用意した（Fig. 2.5 参照）。サバには初期質量ベースで 3, 5 %，タイには 3, 5, 10, 20 % の脱水量までマイクロ波減圧乾燥を行ない、 -80°C の冷凍庫内（三洋電機，MDF-U383）で凍結した。冷凍過程における温度履歴は、T 型熱電対（素線径 0.25 mm）を用いて Fig. 2.6 のように表面から 10 mm における温度を測定した。

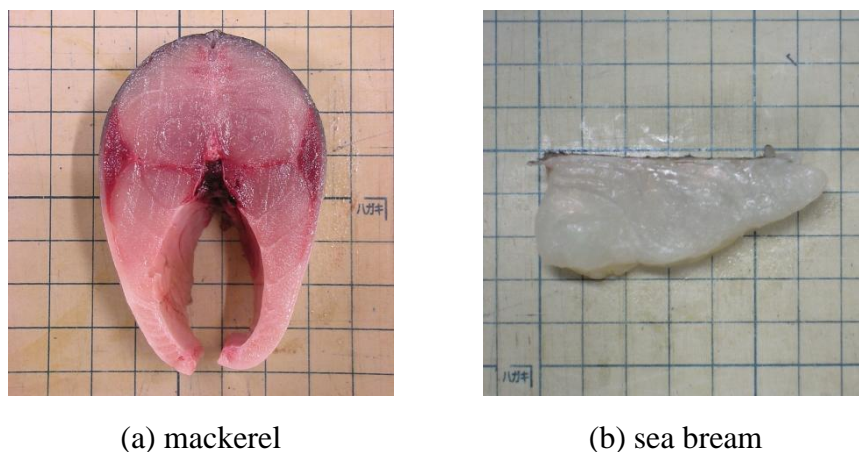


Fig. 2.5 Experimental tissues.

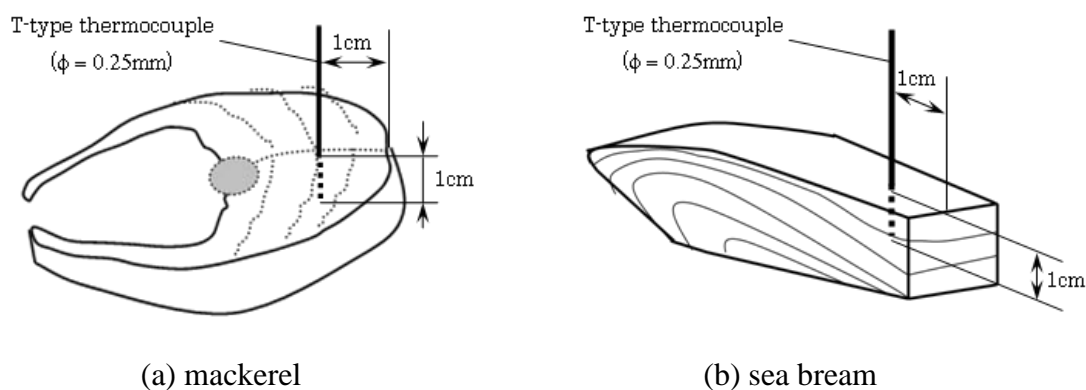


Fig. 2.6 Temperature measurement points in tissues.

2.2.3 解凍方法およびドリップロスの測定

試料の解凍は、室温解凍（25 °C）および冷蔵庫内（三洋電機，SRR-G1261CS）での緩慢解凍（8 °C）の2つのパターンを検証した。解凍過程における温度履歴は、冷凍過程と同様の方法で測定される。また、解凍時に発生するドリップについては、解凍前後における試料の質量変化を解凍前の質量で除したものをドリップロスと定義し、解凍開始から24時間後までの時間変化を測定した。なお、ドリップロス測定には各条件で試料を3サンプルずつ使用した。また、霜による解凍試料の質量への影響を防ぐために、保存用バッグ内で試料を密封した状態で解凍し、その都度バッグから取り出して質量測定を行った。

2.2.4 凍結・解凍後の組織観察

凍結時に生成する氷晶の様子とその相当直径を知るため、凍結試料の顕微鏡観察を行った。凍結試料の観察方法を Fig. 2.7 に示す。まず、凍結試料からブロックを切り出し、凍結包埋剤にブロックを浸した後に液体窒素中で凍結凝固させ、薄切片作成用のブロックを作成した。そして、ブロックからマイクローム（LEICA, CM1510S）により-30 °C の雰囲気中で 10~20 μm に切り出された薄切片を、温調可能な顕微鏡用加熱冷却ステージ（Linkam, 10008）に設置する。このとき、移動中の切片の融解を防ぐため、マイクローム内で銅板を冷却し、その上にカバーガラスで挟んだ観察切片を置いて構成する。Fig. 2.8 に示す加熱冷却ステージ上に設置後、デジタル顕微鏡で観察し、氷晶の相当直径を求めた。相当直径 d_e は以下の式により算出される。

$$d_e = \frac{1.55A^{0.625}}{P^{0.2}}$$

$$A = \frac{\pi b^2}{4} + b(a-b)$$

$$P = \pi b + 2(a-b)$$
(2.1)

ここで、 a は氷晶の長径、 b は短径である。相当直径の測定には各条件で試料を2サンプルずつ使用し、抽出した氷晶数はあわせて100個以上であった。

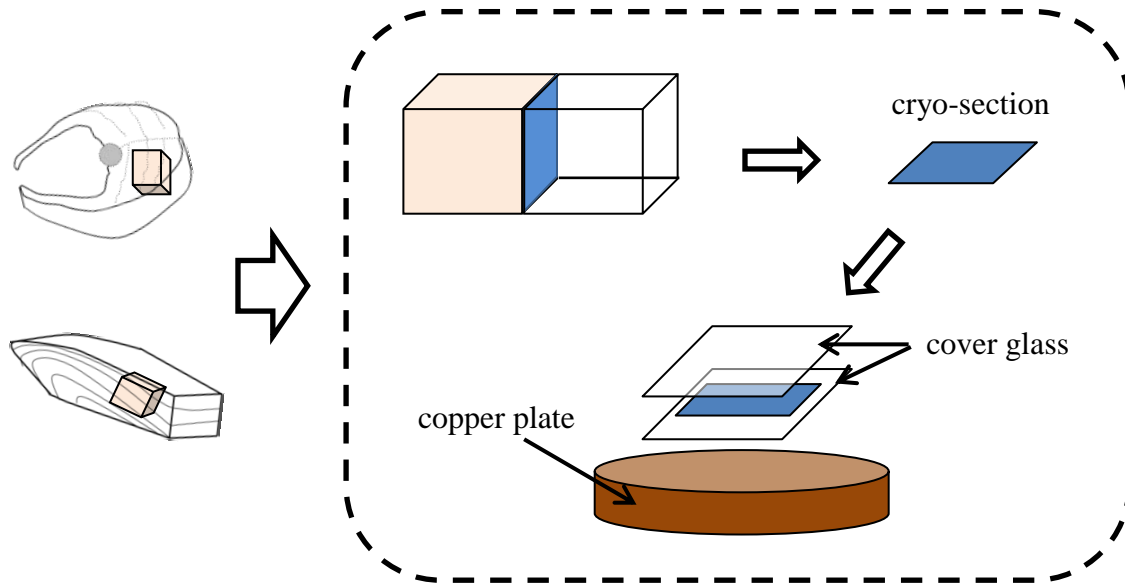


Fig. 2.7 Preparation for cryo-section.

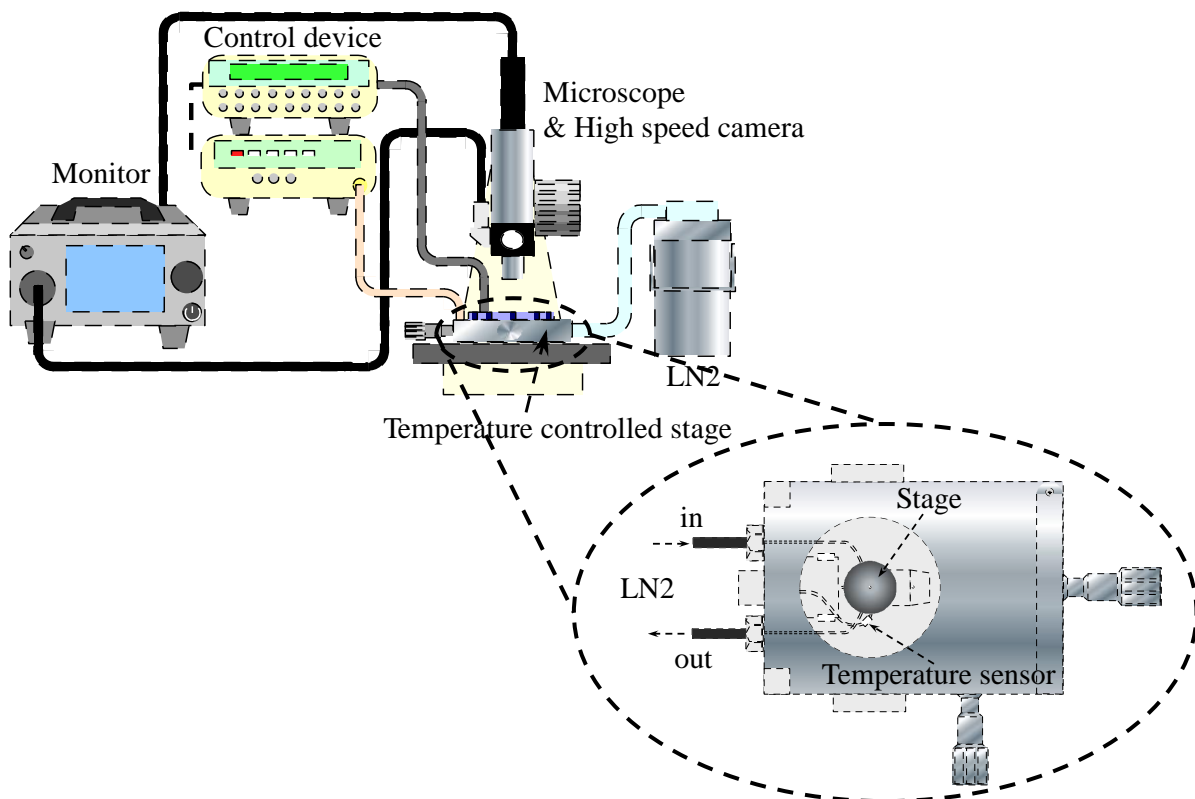


Fig. 2.8 Experimental apparatus for ice crystal observation.

また、解凍損傷の程度を観察するために、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。試料を 10 %ホルマリン溶液に 2 週間浸漬して細胞組織を固定する。固定後、余分な固定液を流水洗浄した後に試料をスクロース溶液に浸漬し、試料中水分を 1~2 日間かけて置換する。その後、凍結組織観察と同様の方法を用いて 10~20 μm に切り出し、切片をヘマトキシリンで 5 分間染色する。染色後、15 分間の流水洗浄を施し、エオジンで 2 分間染色を行い、エタノールに 5 分間浸漬して観察切片を作成した。解凍組織の観察は条件毎に 3 サンプルの試料に対して行われた。

2.2.5 解凍状態の顕微鏡観察

解凍過程における組織復元の様子を観察するため、顕微鏡用加熱冷却ステージを利用した。氷晶観察と同様に観察切片を 10~20 μm に切り出し、Fig. 2.9 に示すように、 $-10\sim 0^\circ\text{C}$ の融解温度帯における 2 パターンの昇温速度条件下で観察し、組織の水分再吸収への解凍速度の影響を検討した。観察は、条件毎に試料 2 個の筋組織の長手方向に対して行い、凍結後および解凍後の状態を比較した。

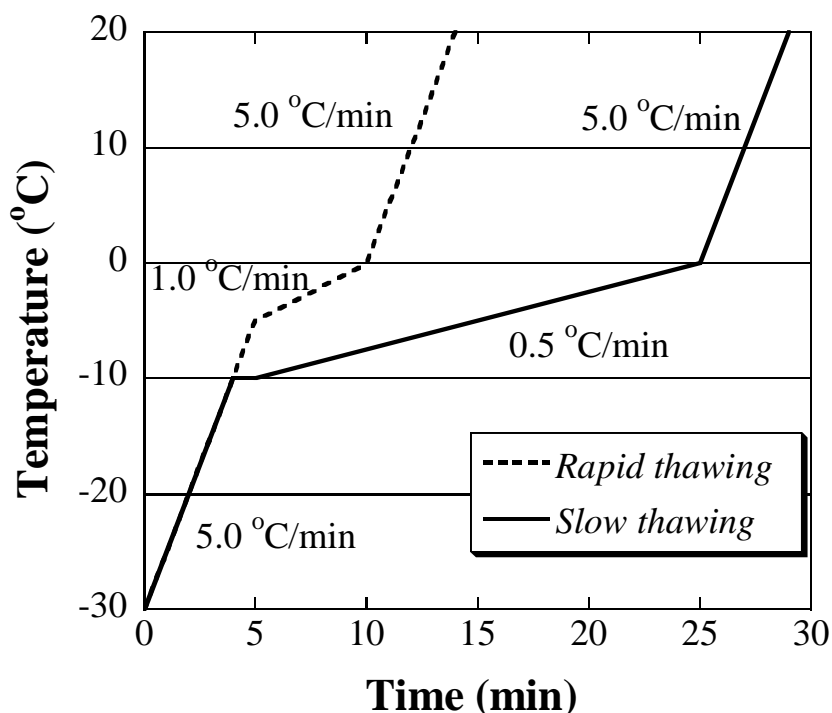
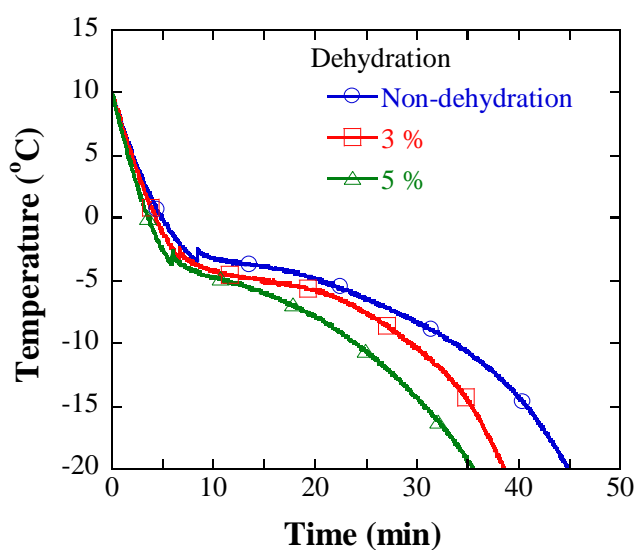


Fig. 2.9 Temperature control of microscope stage.

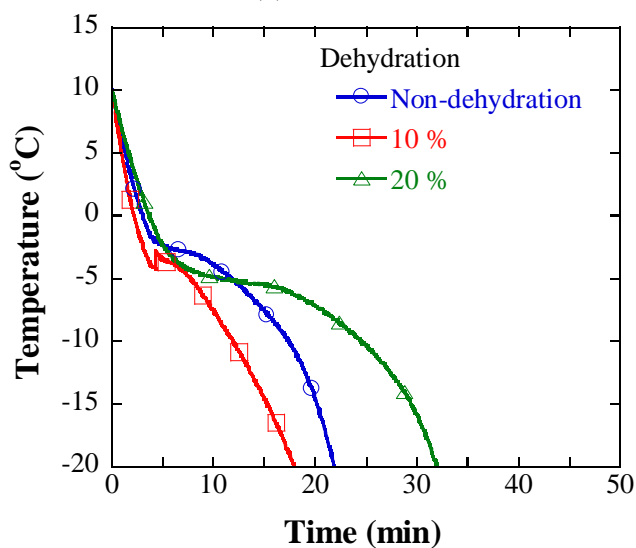
2.3 実験結果と考察

2.3.1 魚肉組織における氷晶の大きさ

Fig. 2.10 は -80°C で凍結したサバとタイの温度履歴であり、サバについては未脱水試料と 3, 5 % 予備脱水試料、タイについては未脱水試料と 10, 20 % 予備脱水試料の測定結果を示している。サバでは予備脱水による凍結時間短縮効果が見られるのに対し、タイの測定結果からはその効果を確認できない。しかし、試料内水分を減じたことにより、平衡凝固点が低下していることは確認できる。



(a) mackerel



(b) sea bream

Fig. 2.10 Temperature histories in freezing process.

Fig. 2.11 は、凍結したサバとタイの組織内に生成された氷晶の顕微鏡写真であり、図中のパーセンテージは脱水量を表している。サバとタイのどちらにおいても、筋組織外での氷晶形成が支配的であり、組織内部には形成されていない。これらの顕微鏡写真から評価した氷晶の相当直径と、予備脱水量との関係を Fig. 2.12 および Table 2.1 に示す。図中のプロットは平均相当直径であり、エラーバーは標準偏差に基づいている。サバについては、3, 5 %の予備脱水によって氷晶が小さくなる傾向を確認できるが、タイでは 10 %以上に脱水しなければ氷晶サイズに変化が表れないことがわかった。この原因を探るために、今回使用したサバとタイの初期含水率を測定したところ、

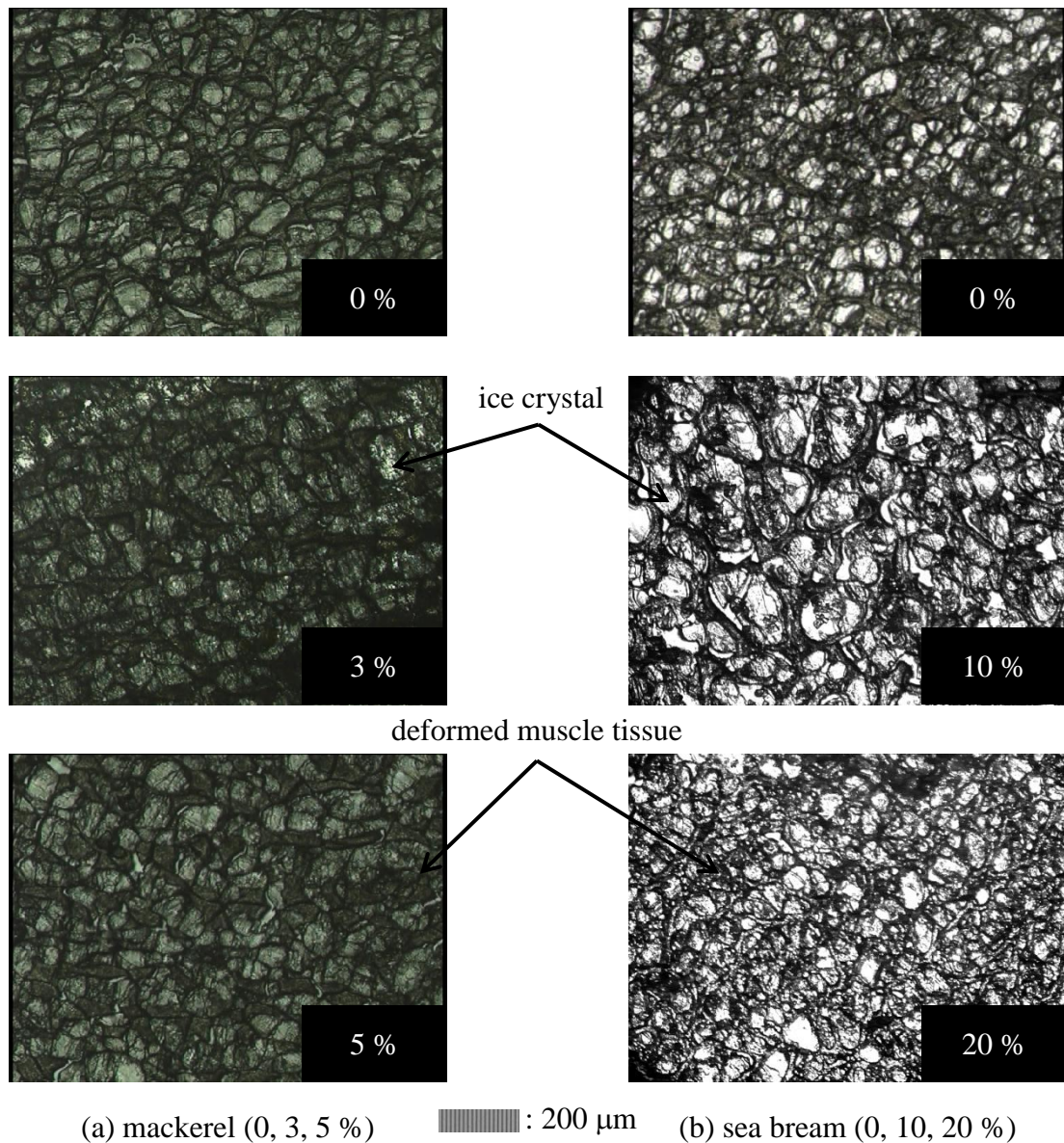


Fig. 2.11 Photomicrograph of tissues frozen at -80°C .

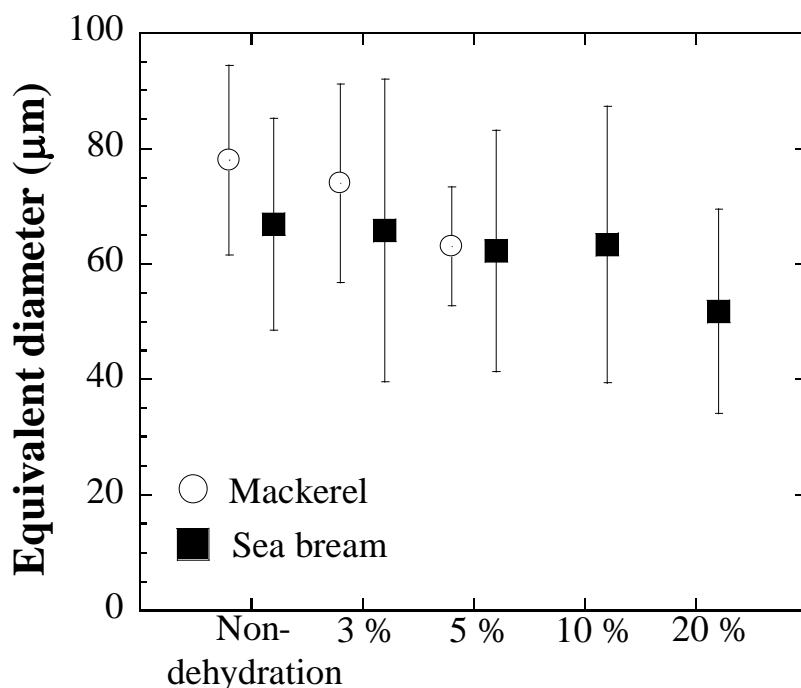


Fig. 2.12 Equivalent diameter of ice crystals in mackerels and sea breams.

Table 2.1 Equivalent diameter of ice crystals in frozen tissues.

	Non-dehydration	3 %	5 %	10 %	20 %
Mackerel	77.96 (16.45)	73.98 (17.71)	62.99 (10.26)	-	-
Sea bream	66.92 (18.35)	65.81 (26.21)	62.19 (20.92)	63.31 (23.97)	51.78 (17.66)

(Data are presented as a mean and a standard deviation in brackets.)

60 %のサバに対して、タイは70 %であった。水分の多いことが、脱水による氷晶成長の抑制効果に差が生じた理由と思われる。

2.3.2 サバの解凍挙動

まず、サバについて解凍速度の影響を見ることにする。Fig. 2.13には室温解凍 (25 °C) と冷蔵庫内解凍 (8 °C) の二つの解凍条件での温度履歴を示している。脱水量による差はあまり見られないが、当然のことながら冷蔵庫内の緩慢解凍では固液共存状態が長く続いている。

Fig. 2.14 は、解凍速度の違いによるドリップ流出の差を示したもので、横軸に時間、縦軸に試料のドリップロスをとっている。ドリップロスは時間とともに増加しているが、緩慢解凍の方が急速解凍よりもドリップロスを低減している。しかし解凍終温度が高くなると、魚肉タンパク質の変性により保水性が低下するため、解凍速度以外の要因もドリップ流出に影響している可能性がある（御木・西元, 1987; 阿部ら, 2009）。ただ、予備脱水を施すことにより、両解凍条件ともドリップロスが減少することを確認できる。

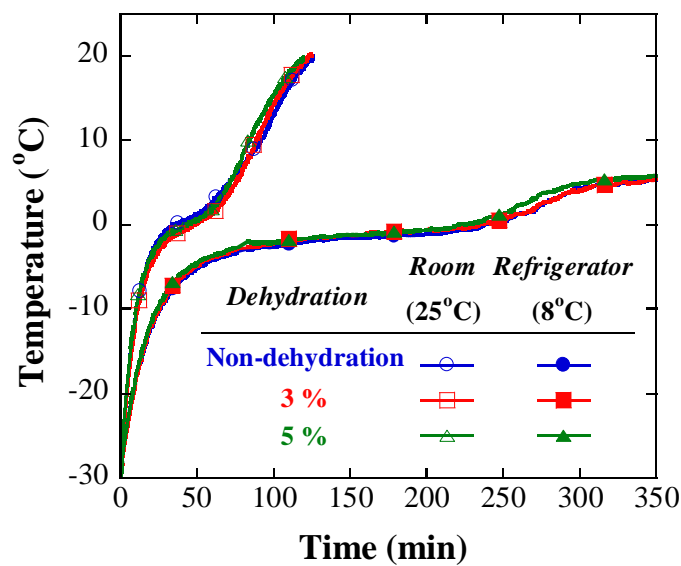


Fig. 2.13 Temperature histories of mackerels in thawing process.

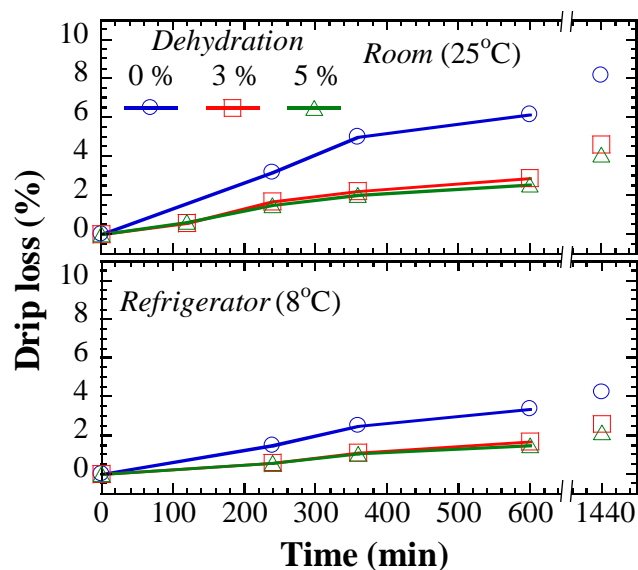


Fig. 2.14 Drip loss of mackerels in thawing process.

解凍後のサバの顕微鏡写真を Fig. 2.15 に示す. 凍結前と比較すると, 矢印で示すように筋組織間の境界部に損傷がいくつか確認されるが, 予備脱水を施すことによって損傷の程度が抑えられ, 急速解凍よりも緩慢解凍の組織損傷が少なくなることが伺える. ここで, 解凍過程における水分再吸収挙動の観察には, 筋組織長手方向がわかり

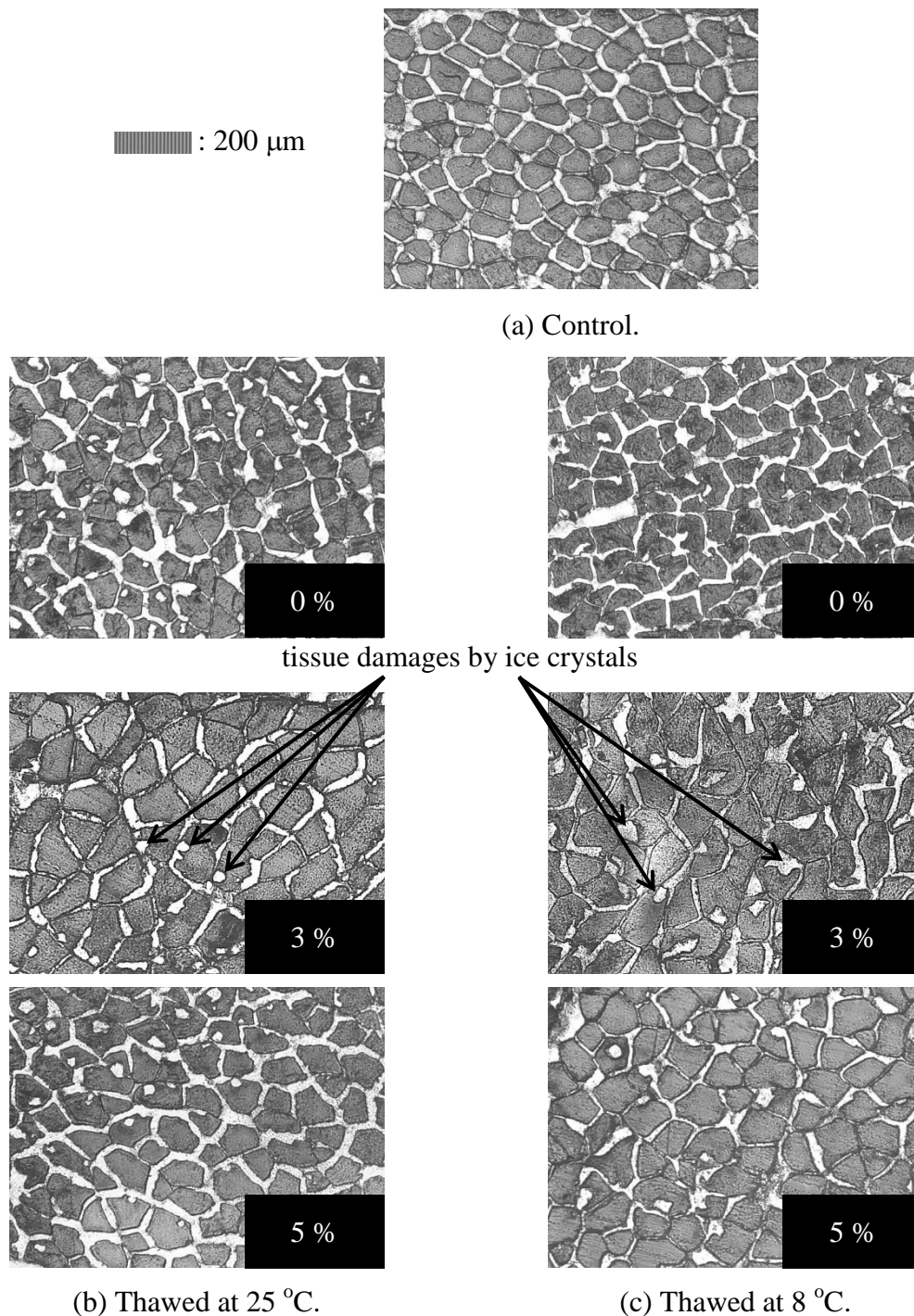


Fig. 2.15 Photomicrograph of micro-structure of mackerels after thawing.

やすい。一例として、Fig. 2.16 に、未脱水のサバを急速解凍した結果をステージ温度とともに示している。解凍過程では、まず筋組織が融解を始め、次に筋組織周辺の氷晶が融解し、その水分を筋組織が徐々に取り込むことにより膨潤する。さらに昇温すると組織外氷晶が完全に融解して水へと変わる。筋組織から融解が始まる理由は、凍結時に細胞外凍結が支配的であることから、筋組織中の水分が脱水されて凝固点降下を起こしているためである。

次に Fig. 2.9 に示した急速・緩慢の2種類の解凍速度に対する長手方向の組織観察から、水分再吸収に及ぼす予備脱水量の影響を調べた結果を Fig. 2.17 に示す。縦軸に水分再吸収率をとり、横軸を予備脱水量で整理している。再吸収率は、凍結前の状態が確認できなかったことから、凍結筋組織と水分再吸収後の筋組織との面積比で表現した。Fig. 2.17 から、両解凍条件とも予備脱水を施すことで再吸収率が高くなることがわかる。また、急速解凍に比べて、緩慢解凍による再吸収量の増加が進んでいる。

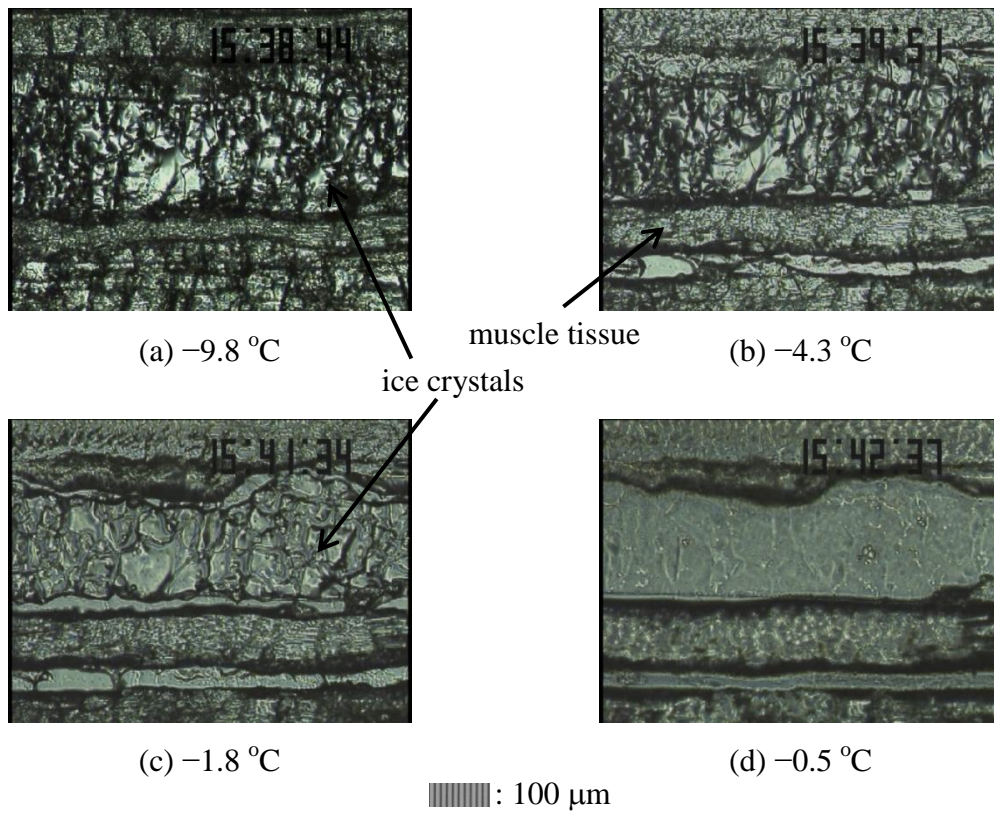


Fig. 2.16 Photomicrograph of longitudinal section of mackerels (non-dehydration) during rapid thawing.

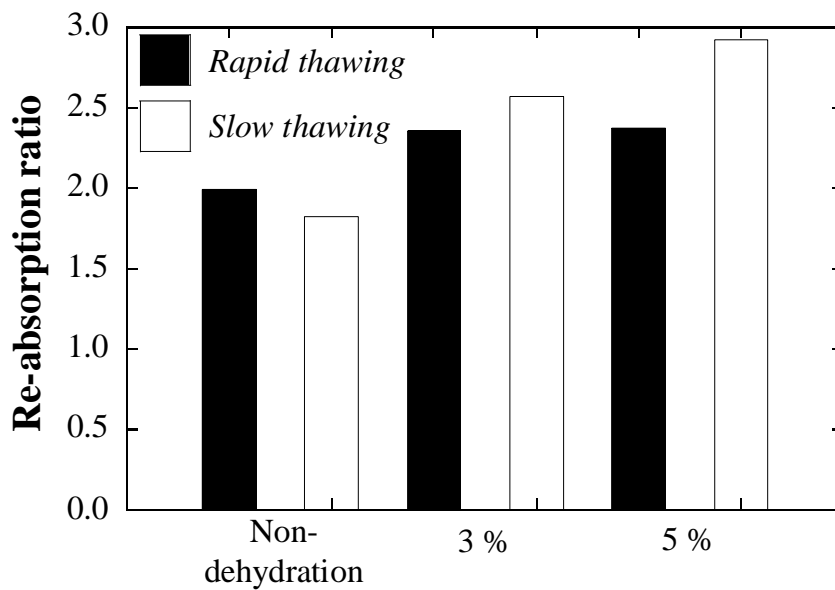


Fig. 2.17 Re-absorption ratio of mackerels after thawing.

2.3.3 タイの解凍過程における再結晶化

試料をタイに変えて、同様の実験を行った。まず、予備脱水量 0, 10, 20 %のタイについて、各解凍条件での温度履歴を Fig. 2.18 に示す。サバでの測定結果と同様に、緩慢解凍の方が急速解凍に比べておよそ 3 倍程度長く固液共存状態が続いている。

次に、解凍時のドリップ流出量を Fig. 2.19 に示す。解凍速度の違いに着目すると、緩慢解凍によってドリップ流出が抑制されており、未脱水試料においては急速解凍に比べておよそ半分のドリップロスを防ぐことができている。また、サバでは 3 %の予

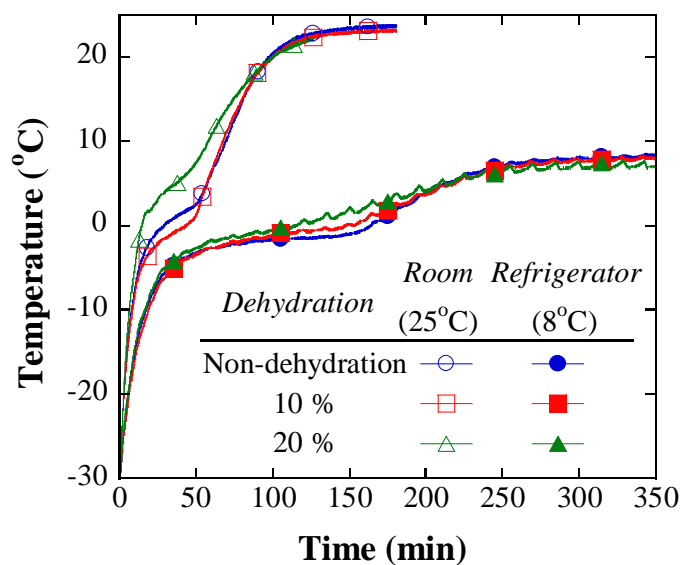


Fig. 2.18 Temperature histories of sea breams in thawing process.

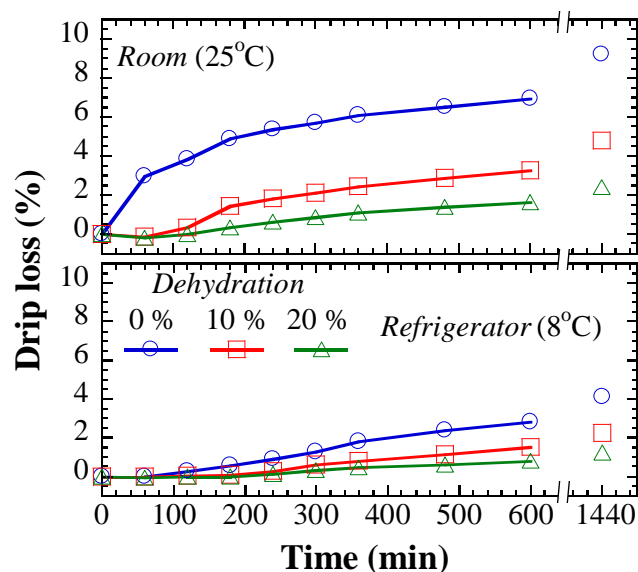


Fig. 2.19 Drip loss of sea breams in thawing process.

備乾燥でドリップロスが4%程度にまで低減できたが、タイでは10%の予備乾燥が必要となっている。これは、タイの初期水分率が高いことに影響を受けていると考えられる。

解凍後の筋組織の顕微鏡写真を凍結前と比較して Fig. 2.20 に示す。予備脱水を行わない場合は、サバの場合に見られた組織間の損傷と異なり、組織内部での損傷が緩慢解凍に多く発生している。冷凍法は同じであり、先に述べたように組織内には氷晶が形成されていなかったことから、解凍時の再結晶化による氷晶成長が原因と判断される。すなわち、緩慢解凍は水分再吸収の時間を長くするため、組織内への水分流入による凝固点上昇が生じ、昇温過程における組織内での再結晶化の可能性が高まるものと推察する。ここで想定した再結晶化は、*melt/refreeze* と呼ばれる発生形態と同様であると考えられ、温度の上下変動によって引き起こされるものである。温度が上昇した際に氷の一部が融解すると、比較的小さな氷晶は消失して水となる。次に温度が低下した際、相平衡に従って、凍結濃縮相の水が残存していた氷晶上で再び結晶化する過程が *melt/refreeze* である (Sun, 2006)。想定される再結晶化プロセスにおいて、予備脱水によって内外の水分を減ずれば、解凍過程における水分再吸収による濃度変化は相対的に小さくなり、組織内の凝固点上昇も小さく、再結晶化が生じずに解凍が進行すると考えられる。実際、Fig. 2.20 の緩慢解凍の組織では、予備脱水量とともに組織内に生じる損傷が減少していることを確認できる。これらの損傷状態については、同じ脱水条件の試料間で定性的に傾向が一致していた。したがって、魚種によってはその水分量の違いから、解凍過程での水分再吸収が組織内での再結晶化をもたらすことに注意が必要であり、水分再吸収による組織復元と再結晶化の問題の両面からの最適化が必要と思われる。加えて、再結晶化速度の大きい温度帯を通過する時間も冷凍過程と同様に重要と考えられ、残存していた氷晶が成長することで組織内部での損傷が引き起こされた可能性もあるため、定量的評価においてより詳細な速度論的検討が必要と思われる。

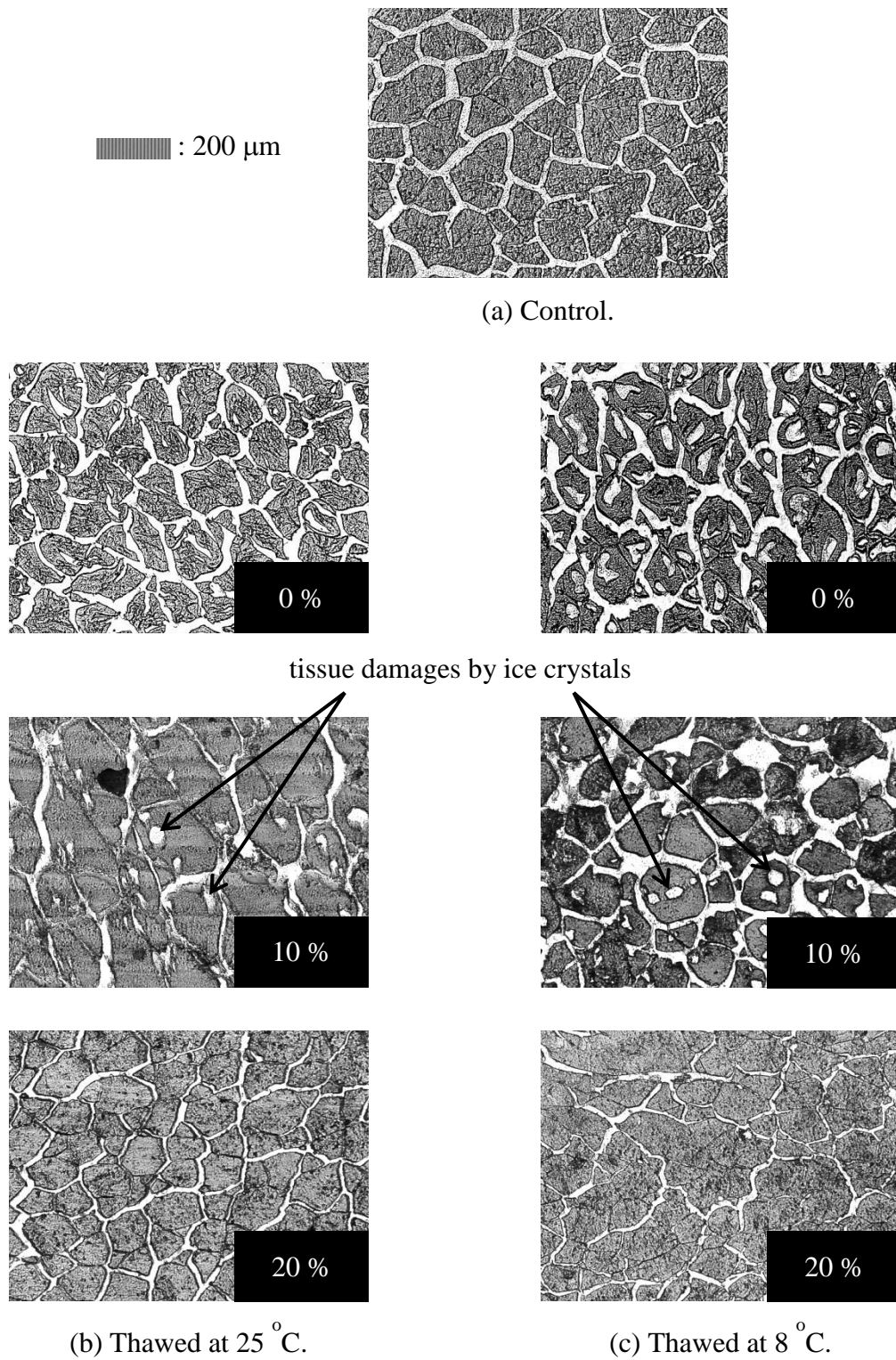


Fig. 2.20 Photomicrograph of micro-structure of sea breams after thawing.

最後に、解凍時の組織内水分挙動を Fig. 2.21 と Fig. 2.22 に示す。Fig. 2.21 は 5 % の予備脱水に Fig. 2.9 に示した緩慢解凍を施した試料の顕微鏡写真である。サバと同様に、筋組織が融解した後に周囲の氷晶が融解する解凍プロセスが確認された。この解凍時の観察写真から、水分再吸収率を求めて予備脱水量で整理した結果が Fig. 2.22 である。サバでは緩慢解凍による再吸収量の増加が顕著に表れたが、タイに関しては脱水量の多い場合に水分再吸収をわずかながら改善する結果となった。先にも述べたように、解凍時の再結晶化が原因と考えられ、魚種間での初期水分率や筋組織の膜透過性などの差異が影響すると考えられ、組織内水分挙動に着目した検討が必要であると考えられる。

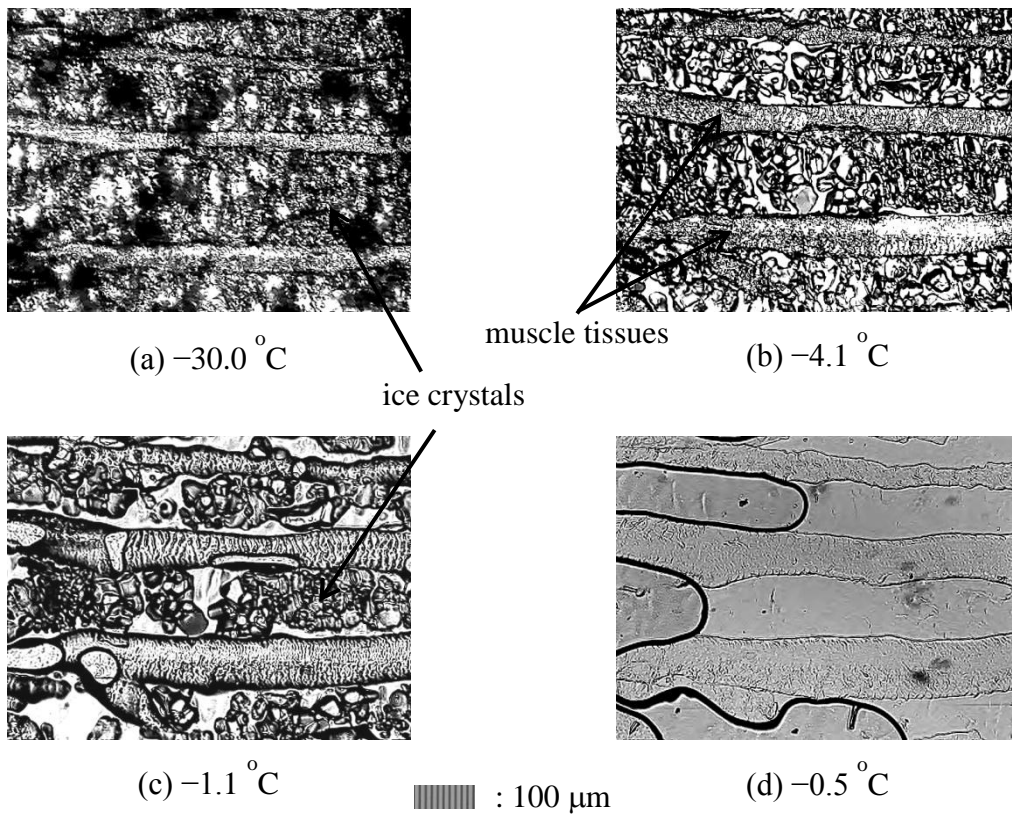


Fig. 2.21 Photomicrograph of longitudinal section of sea breams (5 % dehydration) during slow thawing.

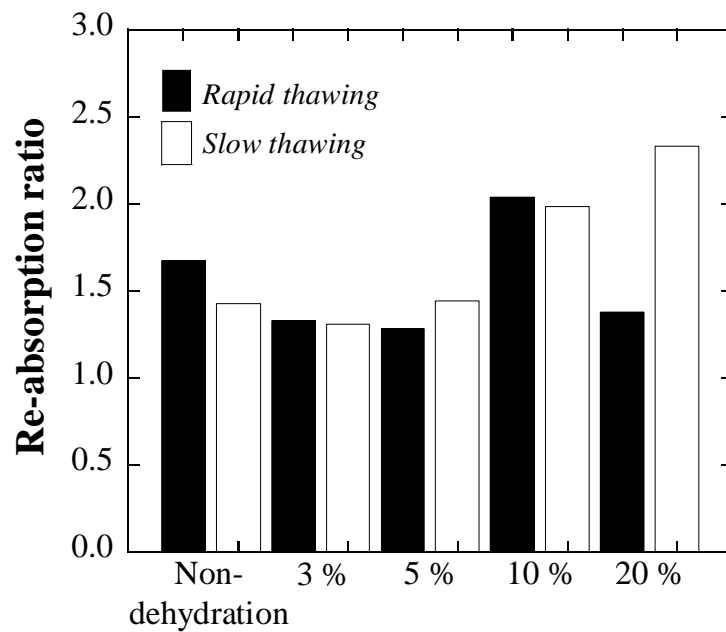


Fig. 2.22 Re-absorption ratio of sea breams after thawing.

2.4 結論

マイクロ波デハイドロフリージングを施した魚肉組織について、凍結時の氷晶サイズと解凍後の復元状態との関係に着目し、解凍速度の影響を検討した結果、以下の結論を得た。

- (1) 本脱水手法による氷晶微細化が、筋組織の変形を抑制し、解凍時の水分再吸収による組織復元に寄与することが確認された。
- (2) サバにおいては、緩慢解凍が組織内への水分再吸収に効果的であり、解凍時のドリップを低減すること、および予備脱水によってその効果が高まることがわかった。
- (3) タイにおいては、緩慢解凍は組織内に再結晶化による損傷が発生しやすいものの、脱水量を多くすれば再結晶化による損傷を抑制できることがわかった。
- (4) (1)~(3)から、魚種による水分量の差異が重要になると考えられ、最適な脱水冷凍を考えるには、解凍過程における水分挙動の把握が重要と思われる。

第3章

魚肉組織の冷凍過程における数値解析と実験との比較

3.1 緒言

本論文第2章では、冷凍時の細胞損傷の抑制法であるマイクロ波デハイドロフリーズングについて、魚肉組織の冷凍・解凍実験による効果の検証を行った。上記手法は食品中水分の脱水操作を含んでおり、最適な脱水冷凍を行うためには組織内における熱・物質輸送過渡特性の理解が重要となる。しかし、その温度場や濃度場を実験から把握することは容易ではないため、数値解析を利用したアプローチが有効となる。現在、生体組織の冷凍保存に関する数値解析が広く行われており、冷凍過程における細胞状態の把握を目的とした熱・生物物理学的モデルがいくつか作成されている。例として、血管部と細胞部を区別して表現するために Krogh シリンダーをベースとしたモデル (Bischof and Rubinsky, 1993; Devireddy et al., 2002) が提案されている一方で、Hayashi ら (1994) は簡易化された物理化学モデルを用いて、単一細胞あるいは生体組織を対象とした冷凍過程の細胞挙動解析を行っている。白樫と棚澤 (1995) は、細胞同士が離れていると見なすことができる組織を対象として、細胞内外液間での水分輸送のみならず、細胞外基質における物質輸送機構を組み込んでモデリングしている。しかし、予備脱水組織の冷凍に関して、前述したようなモデルを用いた数値解析は行われておらず、冷凍時の組織状態についてこと細かく示した例はない。そこで本章では、マイクロ波デハイドロフリーズングが凍結時の魚肉組織内熱・物質移動へ与える影響を明らかにすることを目的とし、マイクロ波減圧乾燥時に形成される特徴的な水分分布を考慮した2次元数値解析を行う。

3.2 解析モデルおよび数値解析方法

3.2.1 二重セルモデル

魚肉組織（サケ）の顕微鏡写真と解析モデル図を Fig. 3.1 に示す．赤い部分は筋組織と呼ばれ，動物の体を作る組織の一つであり，筋線維の集合体である．また，筋組織間の白い部分が細胞外マトリックスとなっていて，動的かつ機能的な働きをする．細胞外マトリックスに存在する水分は自由水とみなせるため，予備脱水を行った際にはまず細胞外マトリックスから脱水される．このような組織を細胞 V_C ，細胞外部分 V_X で構成されるコントロールボリュームの集合体としてモデル化する（白樫・棚澤, 1995; Cui et al., 2002）．解析モデルでは，各コントロールボリュームに細胞（筋組織）が一つずつ含まれるように離散化を行う．これらのコントロールボリュームは，それぞれ電解質水溶液の体積分率 W_C , W_X とタンパク質などの固相の体積分率 O_C , O_X で構

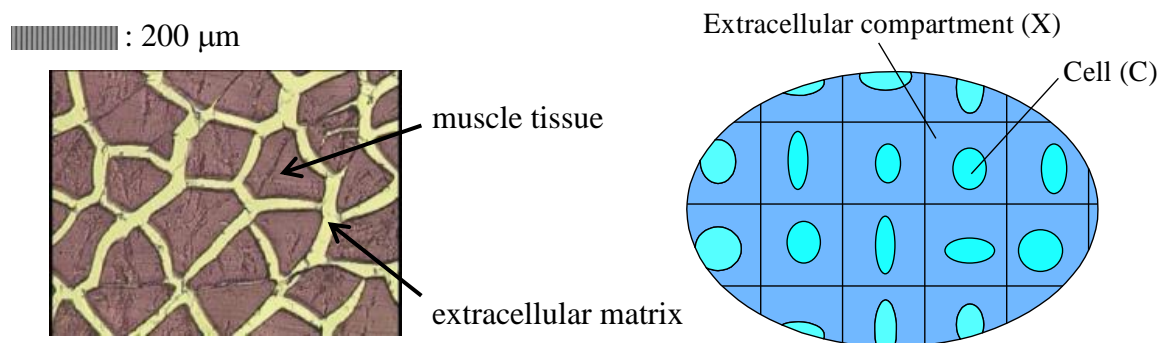


Fig. 3.1 Photomicrograph of salmon and simulation model for fish tissues.

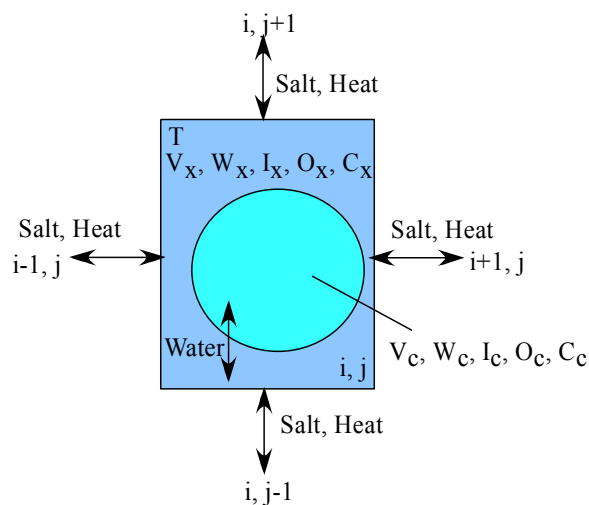


Fig. 3.2 Heat and mass transfer model.

成される。初期状態において筋組織が多く分布していると考えられるので、細胞内外の割合を7対3とした。Fig. 3.2に示すように移動現象については、隣り合うコントロールボリュームとの間で熱伝導および細胞外液間で物質移動が生じるものとし、コントロールボリューム内の温度は細胞内外に関わらず一様とする。また、細胞内外では浸透圧差に起因する水分輸送を考慮する。

3.2.2 冷凍過程の数値解析

20 × 20 mm²の計算領域を100 × 100のコントロールボリュームに離散化し、時間ステップ10 msecの下で陽解法を用いて解析を行う。計算領域の初期温度は10 °Cで一様とし、冷凍庫内（雰囲気温度-60 °C）で熱伝達によって急速冷却される場合を考える。組織表面での熱伝達率は、自然対流における熱伝達率のオーダーに合わせて20 W/(m²·K)とした。

また、マイクロ波減圧乾燥による特徴的な水分分布の効果を検証することも、本研究で数値解析を行う目的の一つである。PVA スポンジ（空隙率90%）に対して200 W

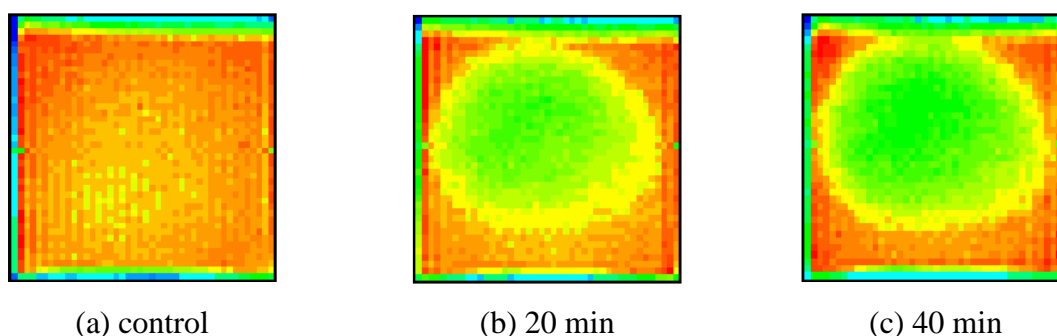


Fig. 3.3 Moisture distributions in PVA sponge after microwave vacuum drying (200 W).

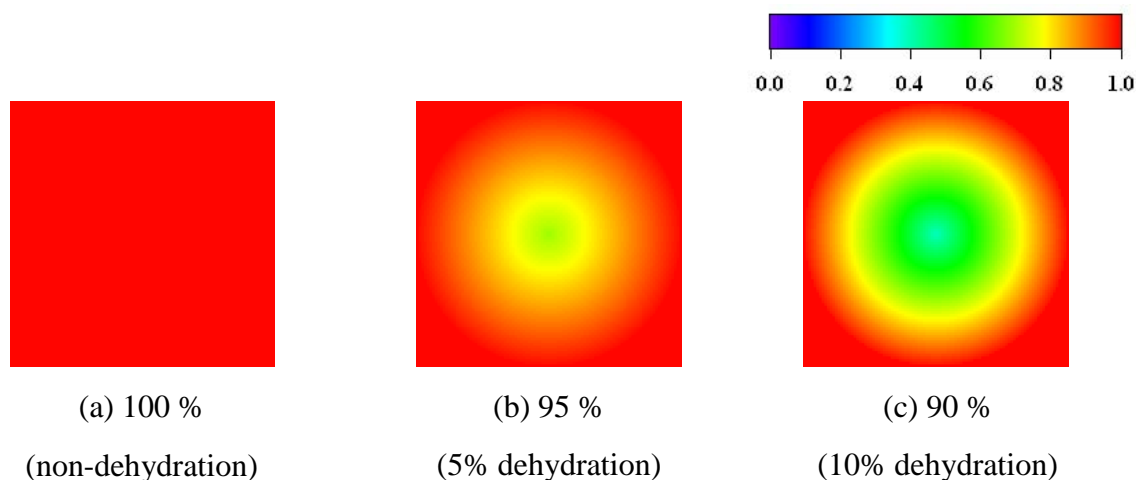


Fig. 3.4 Initial moisture distributions used in this simulation.

連続照射の条件下でマイクロ波減圧乾燥を行った場合の水分分布を Fig. 3.3 に示す。本論文第 1 章の Fig. 1.19 に示したように、スポンジ内では同心円状の分布が存在しており、角部に多くの水分が集中する傾向を確認できる。また、表面層には常に水分が多く存在していることもわかる。脱水量 5, 10 % の組織について、組織中心部から表面にかけての水分分布を仮定したものが Fig. 3.4 である。仮定した水分分布では、中心部から表面にかけての水分分布が線形近似されており、各コントロールボリュームの水分量の総和が標記の水分率と一致するように分布を決定している。このとき、細胞外水分が優先的に脱水されると考え、脱水組織については初期状態における細胞内外の浸透圧差を考慮して解析を行っている。

3.2.3 凍結因子の決定

食品や生体の凍結シミュレーションを行う上で重要となるのが、含有水分が凝固する条件を考えることにある。凍結開始にともなって液相から固相へと相変化するため、残液部でさらに凝固点降下が起こる。さらに、水の熱拡散率 ($1.466 \times 10^{-7} \text{ m}^2/\text{s}$) が氷の値の 1/8 程度であることから、液相と固相の割合は熱伝導性にも影響を与えると考えられるため、本項では凍結因子について述べることにする。

細胞内液は細胞外液と比べて結合水の割合が高く、自由水が減少すると細胞内液濃度は細胞外よりも高まりやすいと考えられる。したがって、凝固点は細胞内外で分けて取り扱う必要がある。このことから、細胞内・外液の凝固点 T_{fC} , T_{fX} を次式で定義する。

$$\begin{aligned} T_{fX} &= -0.676C_X - 7.64 \times 10^{-3} C_X^2 \\ T_{fC} &= -aC_C \end{aligned} \quad (3.1)$$

細胞外凝固点に関しては、水に NaCl を添加し、濃度と融解特性の関係を調査した研究例を参考にした (Woods et al., 1999)。細胞内凝固点については適切な計算式が見つからなかったため、濃度 C_C の一次関数として仮定した。細胞内液における凝固点降下度が細胞外よりも大きいことを考慮し、係数 $a(>0)$ を $1.5 \text{ }^\circ\text{C}/\text{wt.}\%$ と仮定した。塩分濃度に対して T_{fC} , T_{fX} をプロットしたものが Fig. 3.5 である。なお、ここで示した計算方法では、細胞内液の凝固に対する取り扱いが不十分であるため、細胞内核生成理論によって凝固条件を判定するような計算方法が必要とされる。

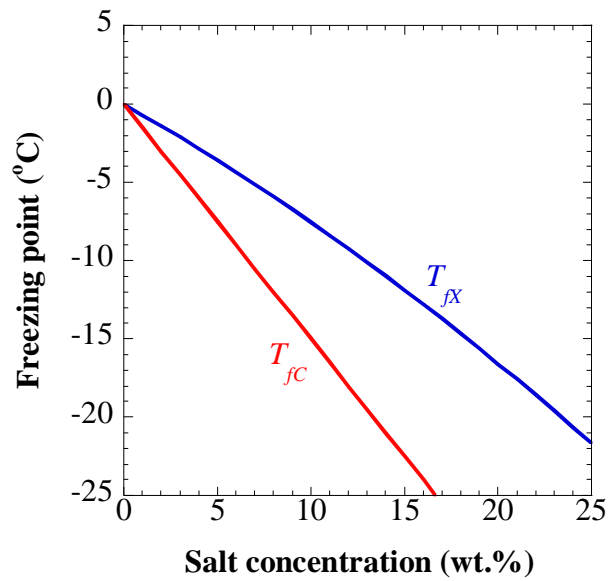


Fig. 3.5 Intracellular and extracellular freezing point vs. salt concentration.

細胞組織の凍結が進むと、局所で水の液相率と固相率の大小関係が逆転し始める。固相率が高くなると、氷の熱伝導率や比熱などの熱物性が水の熱物性よりも支配的になるので、固相率の算出方法によって組織内の伝熱特性が大きく変化する。本研究では、固相率 F_s の算出に数値解法に適した算出法である温度回復法（大中, 1985）を用い、過冷却を考慮しないものとする。ある領域 V （質量 ρV ）で固相率が ΔF_s だけ増加したとすると、その潜熱放出量 Q_s は次式から求まる。

$$Q_s = (\rho V \Delta F_s) \cdot L_h \quad (3.2)$$

ここで、 L_h は融解潜熱である。温度回復法では、まず潜熱の放出を考えずに温度場解析を行い、過冷却度 $\Delta T (= T_f - T)$ を求める。 $\Delta T > 0$ ならば凝固が生じて潜熱の放出により温度が T_f に回復するはずである。以上のことから、 Q_s は次式のようにも記述できる。

$$Q_s = \rho C_p V \Delta T \quad (3.3)$$

両式を等置すると、

$$\Delta F_s = \frac{C_p \Delta T}{L_h} \quad (3.4)$$

が得られる。したがって、単位時間あたりの固相率変化は

$$\frac{\partial F_s}{\partial t} \approx \frac{C_p \Delta T}{L_h \Delta t} \quad (3.5)$$

のように近似される．固相率が1ということは，その領域 V で凝固が完了している状態を意味する．なお，細胞内外での温度の区別はないが，凝固点を区別していることから固相率に関しても内外の区別を行うものとする．

3.2.4 熱伝導

魚肉組織の凍結過程における熱伝導について考える．熱物性値に関しては，水と氷と不活性体の体積分率の加重平均値を計算中で用いることにする．まず，単位体積あたりの内部発熱量をもつコントロールボリューム ($dx dy$) に着目する．単位体積あたりの発熱量は凝固過程における潜熱放出分に相当するので，水と氷の密度差が小さいことを考慮すれば

$$\rho_{ice} V_C \frac{\partial F_{sC}}{\partial t} L_h + \rho_{ice} V_X \frac{\partial F_{sX}}{\partial t} L_h \quad (3.6)$$

となる．上式において氷の密度を使用しているが，水の値を代わりに用いても結果への影響は少ないと考えられる．コントロールボリューム内での熱収支を示すと，潜熱放出項を含む熱伝導方程式が得られる．

$$\rho C_p \frac{\partial T}{\partial t} - \rho_{ice} L_h \left(V_C \frac{\partial F_{sC}}{\partial t} + V_X \frac{\partial F_{sX}}{\partial t} \right) = \frac{\partial}{\partial x} \left(\lambda \frac{\partial T}{\partial x} \right) + \frac{\partial}{\partial y} \left(\lambda \frac{\partial T}{\partial y} \right) \quad (3.7)$$

計算は陽解法を用いて行われ，上式の時間微分項を前進差分で離散化している．空間微分項については，熱伝導率 λ が相の違いによる変数であることに注意すると以下のように離散化できる．

$$\begin{aligned}
 \frac{\partial}{\partial x} \left(\lambda \frac{\partial T}{\partial x} \right) + \frac{\partial}{\partial y} \left(\lambda \frac{\partial T}{\partial y} \right) &\approx \frac{1}{\Delta x} \left[\left(\lambda \frac{\partial T}{\partial x} \right)_{i+1/2,j} - \left(\lambda \frac{\partial T}{\partial x} \right)_{i-1/2,j} \right] \\
 &\quad + \frac{1}{\Delta y} \left[\left(\lambda \frac{\partial T}{\partial y} \right)_{i,j+1/2} - \left(\lambda \frac{\partial T}{\partial y} \right)_{i,j-1/2} \right] \\
 &= \frac{1}{\Delta x} \left[\bar{\lambda}_{i+1/2,j} \frac{T_{i+1,j}^n - T_{i,j}^n}{\Delta x} - \bar{\lambda}_{i-1/2,j} \frac{T_{i,j}^n - T_{i-1,j}^n}{\Delta x} \right] \\
 &\quad + \frac{1}{\Delta y} \left[\bar{\lambda}_{i,j+1/2} \frac{T_{i,j+1}^n - T_{i,j}^n}{\Delta y} - \bar{\lambda}_{i,j-1/2} \frac{T_{i,j}^n - T_{i,j-1}^n}{\Delta y} \right]
 \end{aligned}
 \tag{3.8}$$

この式で用いられている熱伝導率は、注目しているコントロールボリューム間の平均値である。この熱伝導率を求めるために、Fig. 3.6 のような固液界面を考える。凍結部分の状態は固相率によって表現され、各スカラーポイントでの値として定義される。したがって、コントロールボリューム i と $i-1$ の境界が固液界面と見なされる。図から、界面 W での熱流束 q_w は

$$q_w = \frac{T_w - T_{i-1}}{\frac{\Delta x}{2}} = \frac{T_i - T_w}{\frac{\Delta x}{2}} \tag{3.9}$$

T_w を消去すると

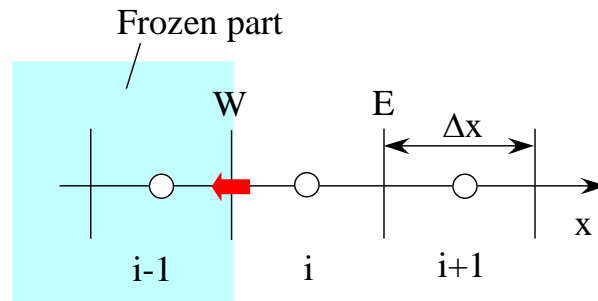


Fig. 3.6 Harmonic average of thermal conductivity.

$$q_w = \frac{2}{\frac{1}{\lambda_{i-1}} + \frac{1}{\lambda_i}} \frac{T_i - T_{i-1}}{\Delta x} = \lambda_w \frac{T_i - T_{i-1}}{\Delta x} \quad (3.10)$$

したがって、

$$\lambda_w = \frac{2}{\frac{1}{\lambda_{i-1}} + \frac{1}{\lambda_i}} \quad (3.11)$$

のように、界面での熱伝導率が調和平均の形で得られることがわかる。このことから、熱伝導方程式を解く際の熱伝導率には調和平均値を採用する。

3.2.5 物質移動

隣り合うコントロールボリュームの細胞外液間で濃度差がある場合、細胞外液に含まれる溶質が物質拡散する。微小体積 ($dx dy$) の物質収支を考えるために、 C_X と水溶液の体積分率 W_X に関して次式のように定義する。

$$\begin{aligned} C_X &= \frac{\text{(細胞外液相の NaCl の質量)}}{\text{(細胞外における水溶液の質量)}} \\ W_X &= \frac{\text{(細胞外における水溶液の容積)}}{\text{(コントロールボリュームの体積)}} \\ &\approx \frac{\text{(細胞外における水溶液の質量)}}{\rho_w \cdot \text{(コントロールボリュームの体積)}} \end{aligned} \quad (3.12)$$

細胞外液相の質量濃度を ρ_{SX} とすると

$$(\rho_w W_X) C_X = \frac{\text{(細胞外液相の NaCl の質量)}}{\text{(コントロールボリュームの体積)}} = \rho_{SX} \quad (3.13)$$

固相率 F_{SX} を用いて

$$\rho_{SX} = (\rho_w W_X) C_X = \rho_w (V_X - O_X) (1 - F_{SX}) C_X \quad (3.14)$$

と表すことができる。コントロールボリューム内での物質収支は、

$$\frac{\partial \rho_{SX}}{\partial t} = D \left(\frac{\partial^2 \rho_{SX}}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 \rho_{SX}}{\partial y^2} \right) \quad (3.15)$$

ここでは、拡散係数 D の温度依存性を無視している。上式の時間微分項に前進差分、空間微分項に 2 次の中心差分を適用した次式を計算で使用する。

$$\frac{\rho_{SX_{i,j}}^{n+1} - \rho_{SX_{i,j}}^n}{\Delta t} = D \left(\frac{\rho_{SX_{i-1,j}}^n - 2\rho_{SX_{i,j}}^n + \rho_{SX_{i+1,j}}^n}{\Delta x^2} + \frac{\rho_{SX_{i,j-1}}^n - 2\rho_{SX_{i,j}}^n + \rho_{SX_{i,j+1}}^n}{\Delta y^2} \right) \quad (3.16)$$

3.2.6 膜輸送

細胞内・外液は半透膜である細胞膜で隔たれている。半透膜とは、一定の大きさ以下の分子あるいはイオンのみを透過する膜である。本研究では、細胞内と細胞外部分との間で浸透圧差に起因する交換流が生じるものとし、理想半透膜を想定して水分子のみの透過を考える。生体膜輸送における水分輸送において 1 種類の溶質が存在する場合、体積流 J_V が次式から得られる (Schultz, 1980)。

$$J_V = K_p \Delta P \quad (3.17)$$

上式中の K_p は細胞膜透過率と呼ばれ、温度の関数として Arrhenius の式

$$K_p = K_{pg} \exp \left[-\frac{E_{Kp}}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_R} \right) \right] \quad (3.18)$$

から算出される。ここで、 K_{pg} は参照温度 T_R における膜透過率、 E_{Kp} は活性化エネルギーである。また、 ΔP は溶液間の浸透圧差であり、van't Hoff の浸透圧の式から

$$\Delta P = \Delta \Pi = -RT(C_X - C_C) \quad (3.19)$$

となり、次式が得られる。

$$J_V = J_w = K_p \Delta \Pi = -K_p RT(C_X - C_C) \quad (3.20)$$

Fig. 3.7 に示すように、浸透圧の作用する方向は細胞外から細胞内へ水分が移動する

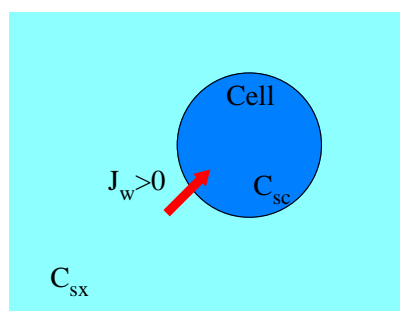


Fig. 3.7 Flux of membrane transport.

方向を正としており，細胞内水分が流出する場合にはフラックス J_w が負となる．細胞表面積を A_{cell} とすると，単位時間あたりの細胞内・外間の水分交換量は

$$\frac{\partial V_w}{\partial t} = J_w A_{\text{cell}} = -K_p RT (C_X - C_C) A_{\text{cell}} \quad (3.21)$$

で表され，上式によって凍結過程における細胞収縮を考慮することができる．

3.2.7 数値解析パラメータと熱物性値

食品は不均質な混合系であるため，その熱物性の解析は難しく，その信頼性にも疑問が残る．比熱については，構成する成分との間に加成性が成立する一方で，熱伝導率は系内の伝熱構成に左右されるので加成性が成立しない．そのため，食品の熱伝導率については体系化が進んでいない状況にある．そして食品の熱物性としては，物理的性質，無次元パラメータ，次元の持つ特性（形，大きさ，体積）などの因子が重要

Table 3.1 Food compositions of chum salmon (per 100 g).

Moisture content (g)	Protein (g)	Adipo (g)	Carbohydrate (g)	etc. (g)
72.3	22.3	4.1	0.1	1.2

Table 3.2 Thermo-physical properties of major food compositions.

Properties	Water	Ice	Protein	Carbohydrate	Adipo
ρ (kg/m ³)	997	917	~1300	~1600	~900
C_p (kJ/(kg·K))	4.176	2.062	~2	~1.5	~2
λ (W/(m·K))	0.583	2.220	0.2~0.3	0.2~0.4	~0.2

Table 3.3 Numerical parameters.

Initial water fraction	M_0	55.0	[wt.%]
Cell diameter	d_{cell}	150	[μm]
Cell membrane permeability	K_{pg}	1.0×10^{-13}	[$\text{m}^3/(\text{N}\cdot\text{s})$]
Activation energy	E_{Kp}	10.0	[kJ/mol]
Universal gas constant	R	8.314	[J/(mol·K)]
Diffusion coefficient in NaCl solution	D	6.78×10^{-10}	[m^2/s]

Table 3.4 Thermo-physical properties.

Properties	Water	Ice	Other contents
λ (W/(m·K))	0.583	$7.549 - 2.894 \times 10^{-2} T + 3.454 \times 10^{-5} T^2$	0.242
C_p (kJ/(kg·K))	4.176	$0.185 + 0.689 \times 10^{-2} T$	1.998
ρ (kg/m ³)	997.0	$917(1.032 - 1.17 \times 10^{-4} T)$	1239.2

となる。ここで、Table 3.1 にシロザケ 100 g あたりの食品成分を示す。表中の灰分とは、一定条件下で灰化して得られる残分であり、食品中の無機質の総量を表していると考えられている。また、主要な食品成分の熱物性は Table 3.2 に示されるような値をとる。本研究ではタンパク質、炭水化物および脂肪を一つの不活性体と定義し、凍結シミュレーションで使用する物性値を、上記のデータの質量による加重平均値とする。

本研究で用いた数値解析パラメータと熱物性値を Table 3.3, 3.4 にそれぞれ示す。初期水分率 M_0 と細胞直径 d_{cell} は次項に示すサケでの実験結果から得られる。 K_{pg} と E_{Kp} の値については先行研究で用いられている値を参照する（白樫・棚澤, 1995; 百生ら, 1996; Devireddy et al., 2002）。

3.3 魚肉組織の冷凍過程における温度測定

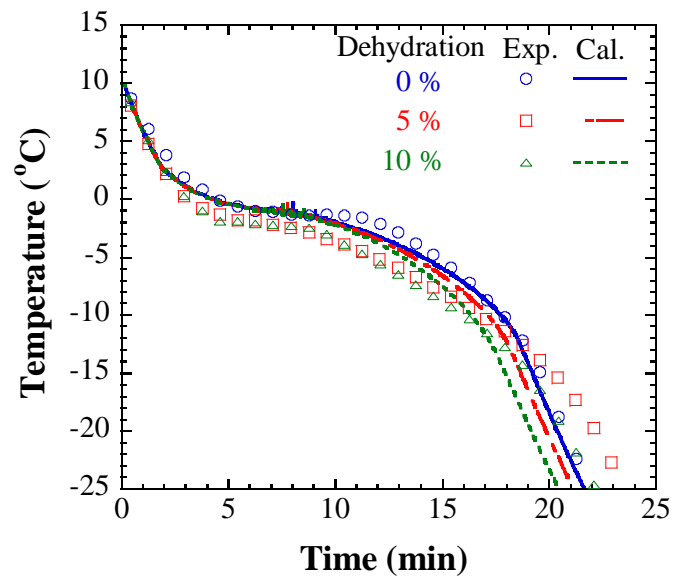
解析結果と実験結果との比較を行うために、未脱水の魚肉組織（サケ, $70 \times 20 \times 20 \text{ mm}^3$ ）と、マイクロ波減圧乾燥法によって 5, 10 %（初期質量ベース）脱水されたサンプルの冷凍時温度履歴を測定する。サンプルはデジタル温度調節された冷凍庫内に静

置され, 雰囲気温度 -60°C の下で凍結される. 温度測定にはK型熱電対(線径 0.5 mm)を用い, サンプル中心部と表面層(表面から 2 mm)の位置の温度を測定する.

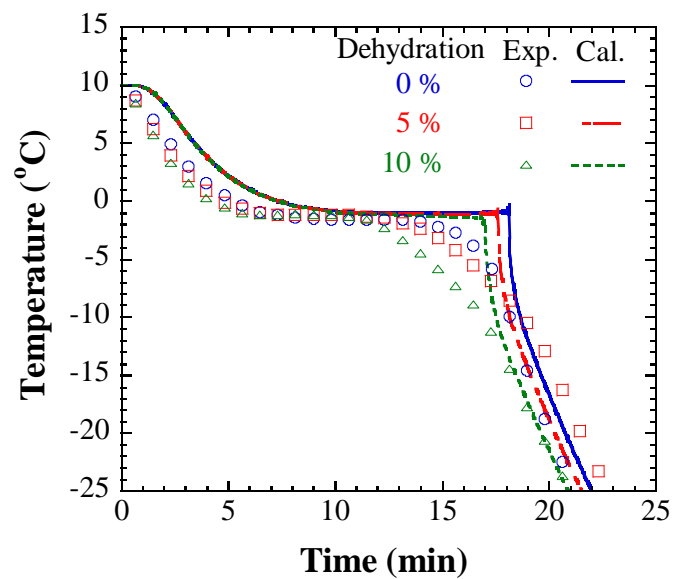
3.4 結果と考察

3.4.1 表面層および中心部の温度履歴(実験結果との比較)

魚肉組織(脱水量 $0, 5, 10\%$)の冷凍過程における温度履歴を Fig. 3.8 に示す. 図中



(a) surface layer



(b) center

Fig. 3.8 Thermal histories in freezing process.

では、組織表面層と中心部での温度履歴について解析結果と実験結果との比較を行っている。温度履歴の比較から、解析結果が冷却特性を定性的に表現できていることがわかる。冷却開始とともに組織の温度が凝固点まで減少しており、熱抵抗が小さい表面層では凝固点を速く通過している。一方、中心部では凍結時間が長くなっていることがわかる。組織からの潜熱放出は熱抵抗によって限定されており、水から氷への相変化時間は水分量に依存する。それ故に、含水率の違いが相変化に必要な冷却エネルギーに影響する。これについては Fig. 3.8 が示しているように、脱水量が多くなるほど凍結時間が短縮されている。

3.4.2 細胞外固相率分布

細胞外固相率分布の時系列を Fig. 3.9 に示す。Fig. 3.9a, b, c は未脱水と 5, 10 % の脱水を施された組織の分布をそれぞれ示している。冷却時間が経過するにつれて、凍結界面が内部へと進行している様子が確認される。また、表面層が凍結している時点で

cooling time

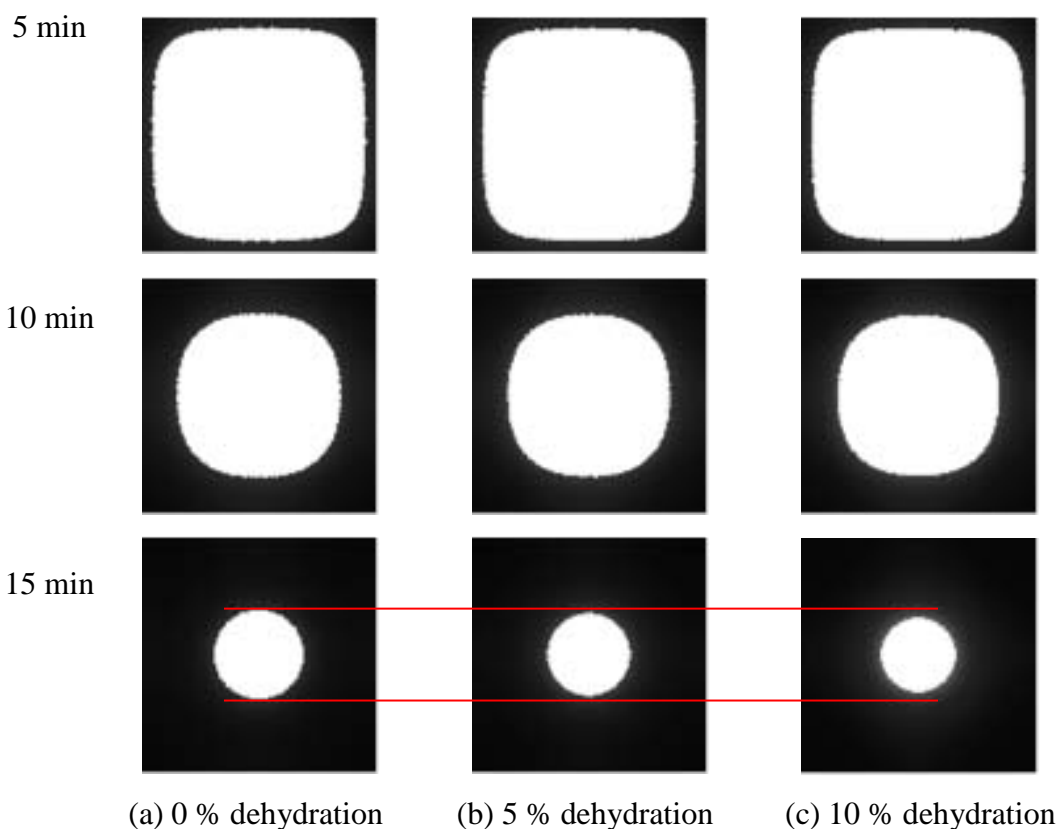


Fig. 3.9 Comparison of extracellular solid fraction profiles.

は脱水量による差異が見られないが、15 min における分布を比較すると、予備脱水により組織内部への凍結が促進されていることがわかる。

3.4.3 細胞収縮率

予備脱水による初期水分分布の有無が与える影響を確認するため、初期水分分布を考慮した結果と考慮しない結果（一様分布）での凍結過程の数値解析を行った。Fig. 3.10 は組織表面からの各位置における凍結完了時の細胞収縮率について脱水量をパラメータにとって整理したものである。図から、初期水分分布の有無に関わらず組織中心に近づくほど収縮が進行しているが、一様分布の結果に関しては予備脱水なしのものとはほとんど差異がない。一方、初期水分分布を考慮した結果については冷却開始時から細胞内外で比較的大きな浸透圧差が生じており、その結果中心に近づくほど細胞収縮が進行していると考えられる。

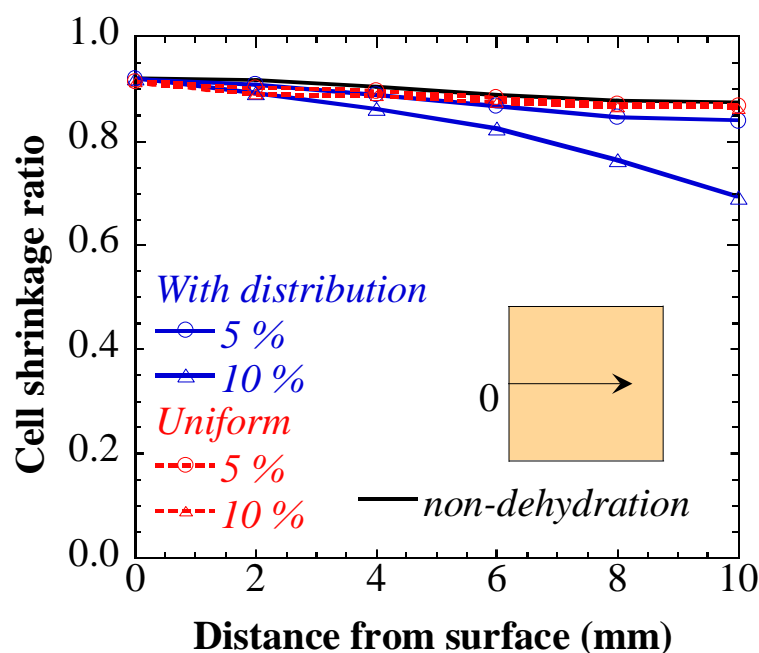


Fig. 3.10 Profiles of cell shrinkage ratio.

各脱水量に対する凍結完了時の細胞収縮率を Fig. 3.11 に示す. 脱水量の増加にともない, 初期水分分布を含む結果では中心部で細胞収縮が進行している傾向を確認できる. しかし, 表面層ではどちらの水分分布の結果もほぼ一定となっており, 一様な水分分布の中心部についても同様である. 表面層については局所での冷却速度の違いにより中心部ほど細胞収縮が進まなかったと考えられ, 一様分布における中心部に関しては, 初期水分分布ありの結果と比べて浸透圧差が小さいために水分輸送量が少量となり, 細胞の大きさがほとんど変化しなかったと考えられる.

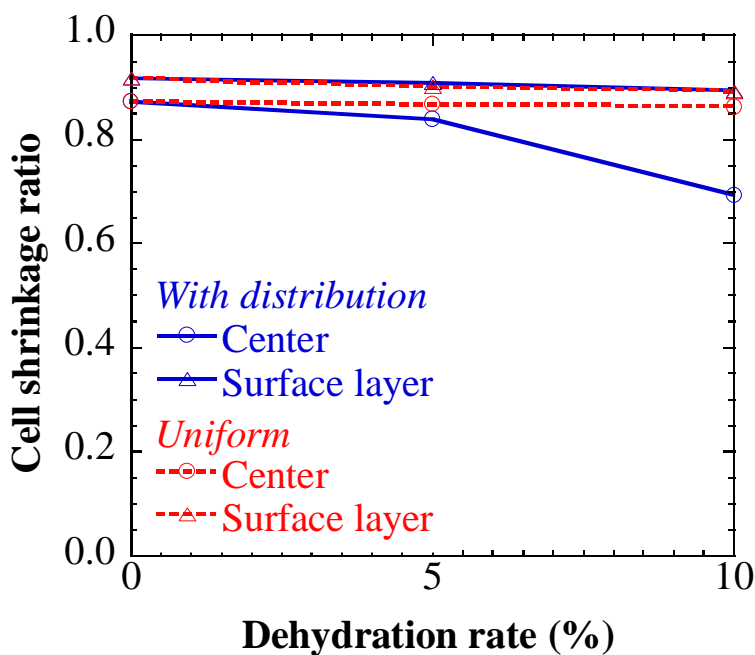


Fig. 3.11 Effects of dehydration rate on cell shrinkage.

3.5 結論

予備脱水を施した魚肉組織の凍結過程における組織内移動現象の数値解析を行い、以下の結論を得た。

- (1) 解析結果は実験結果に見られる冷却特性を定性的に表現できている。
- (2) 予備脱水が組織の凍結時間短縮に有効であることを数値解析の面からも確認した。
- (3) 初期水分分布が存在することで、組織中心部に近づくほど細胞内外の浸透圧差が大きくなり細胞収縮が進行する。
- (4) 脱水量の増加にともない細胞収縮が進行しやすくなるが、局所での冷却速度の違いにより、表面層では収縮の程度が小さく、中心部では大きくなる。

第4章

魚肉組織由来溶液の溶質分配係数の測定

4.1 緒言

食品などには様々な物質で構成される溶液が含まれており、溶液の凝固は純水の凍結と異なった凝固過程を示す。溶液が凝固する際には、溶質が液相に排出されて濃い未凍結部ができるため、溶液の凝固は固液界面における溶質掃出し、拡散をともなう相変化熱・物質移動の問題である。本論文第3章における物質移動計算は、固相率変化のみで固液相変化による濃度上昇を記述しているため、厳密に溶質掃出しを考慮したものになっておらず、解析方法を改める必要があると考える。溶質掃出しの考え方を数値解析に導入するためには、使用する分配係数の値が重要となる。しかし、サバやタイなどの魚肉に含まれる溶液の分配係数について調査した例はなく、生理食塩水 (0.9 wt.% NaCl) の値を代替するにしてもはっきりとした値が示されていない。そこで本章では、NaCl 水溶液および魚肉組織由来溶液 (サバおよびタイ) の分配係数測定を目的とし、方向性凝固観察法を用いて溶液の凝固特性を調べることにする。

4.2 溶液の方向性凝固観察実験

4.2.1 供試試料

供試試料として、NaCl 水溶液 (1~5 wt.%) ならびに魚肉組織 (サバとタイ) 由来の溶液を注入したキャピラリーチューブ (VitroCom, 5005-050, 矩形断面 $0.5 \times 0.05 \text{ mm}^2$, 長さ 50 mm, Fig. 4.1 参照) を用いる。魚肉組織由来溶液の抽出方法に関しては、サバとタイで異なる方法をとった。まず、サバの切り身 (2 cm 角) をガーゼにくるんだ状態で身を絞ることによって水分を抽出した。さらに、抽出液の分離を待ち、残った繊維などが含まれていない部分をシリンジで再度抽出して使用する (Fig. 4.2 a)。他方、タイの場合は身崩れしやすい状態にあるため、サバと同様の方法では繊維が多く含ま

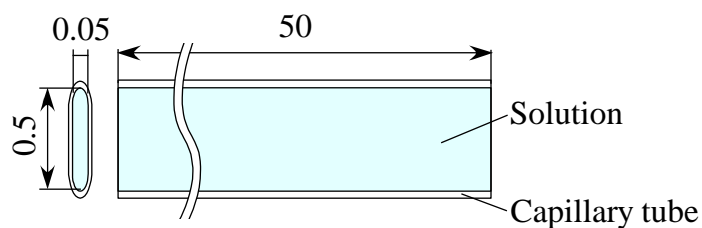
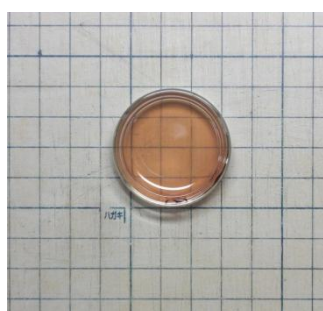


Fig. 4.1 Capillary tube used in this experiment.



(a) mackerel



(b) sea bream

Fig. 4.2 Tissue fluid extracted from fish tissues.

れてしまい水分抽出できない．そこでタイに関しては，Fig. 4.2 b のような冷凍・解凍後の身から排出されたドリップを用いることにした．冷凍・解凍方法については，真空パックした試料を -15°C の冷凍庫内で凍結させて常温解凍を施した．

4.2.2 方向性凝固観察実験装置および実験方法

実験は，鶴田ら（1996）による方向性凝固観察法を用い，供試試料の凍結現象を直接顕微鏡観察することによって行った．方向性凝固観察に使用したテストセクションの概要を Fig. 4.3 に示す．スライドガラスを Fig. 4.3 のように各銅ブロック上に設置し，低温側銅ブロックを液体窒素とヒーター加熱により -20°C に調節する．もう一方の銅ブロックはヒーター加熱によって 20°C に調節され，スライドガラス上に温度勾配一定の分布が形成される．観察時に高温側から低温側へガラスを移動させるが，直線温度勾配を維持するために移動速度を 0.01 mm/s とした．なお，実験は外気温度 15°C ，湿度 20% の環境で行われるため，外気の影響を考慮し，熱画像装置を用いてスライドガラス上の温度分布を評価した．Fig. 4.4 はテストセクションの真上から撮影され

た熱画像であり，これをスライドガラス中心部について数値化したものが Fig. 4.5 である．温度分布から，静止状態でのスライドガラス上温度勾配が $-4.85\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{mm}$ であることを確認できる．ガラス上には供試試料とともに，凝固点のリファレンスとして蒸留水（平衡凝固点 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ ）を注入した試料を設置する．また，顕微鏡を介した CCD カメラを用いて凍結の様相を観察・記録する．この観察画像を基に水と溶液の凍結界面の距離を測定し，凝固点降下度の計測を行った (Liu et al., 2003)．なお，ガラス移動中に固液界面の動きが不安定化することから，チューブを 10 等分した位置で移動を停止させ，固液界面が静止した時点で界面間の距離を測定した．

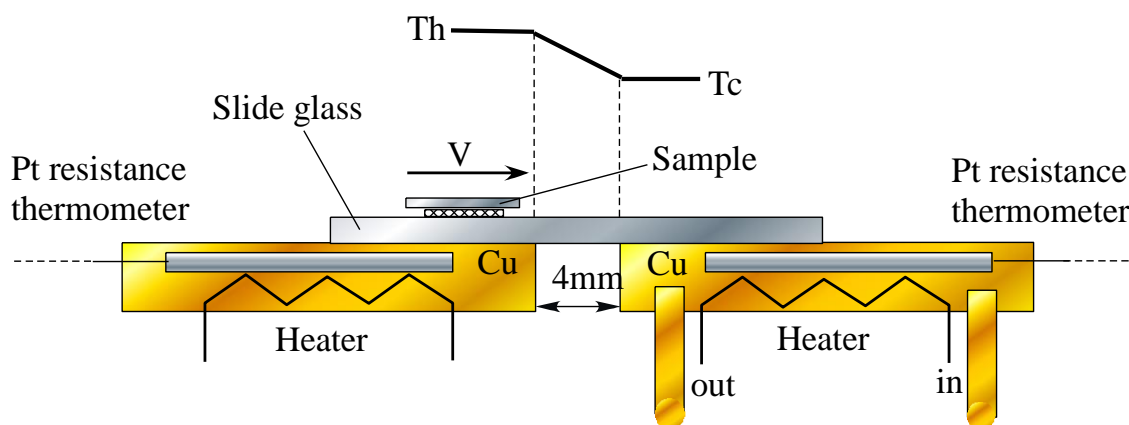


Fig. 4.3 Test section of directional solidification system.

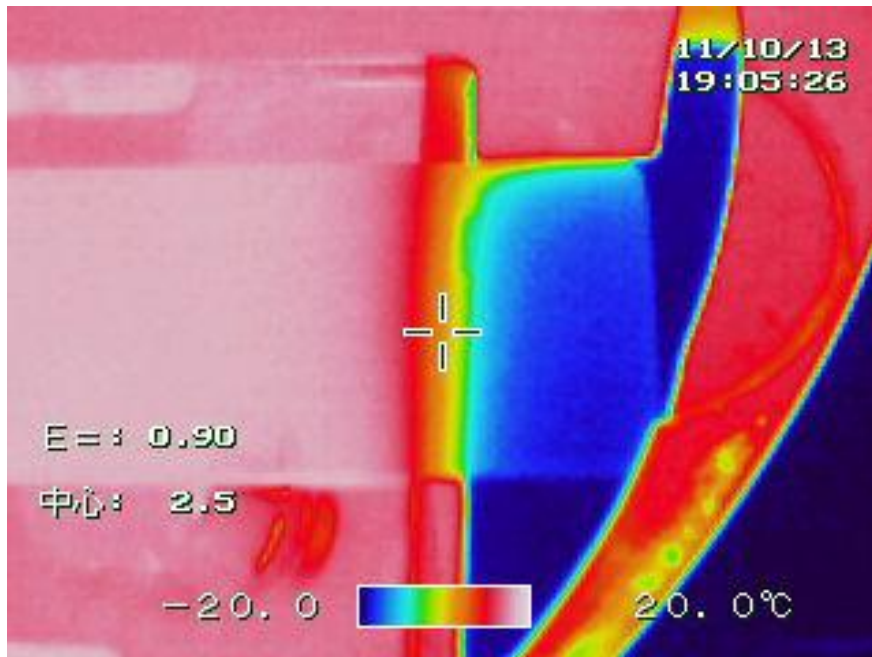


Fig. 4.4 Thermal image of test section. Left Cu block is heated at 20 °C, and right Cu block is cooled at -20 °C.

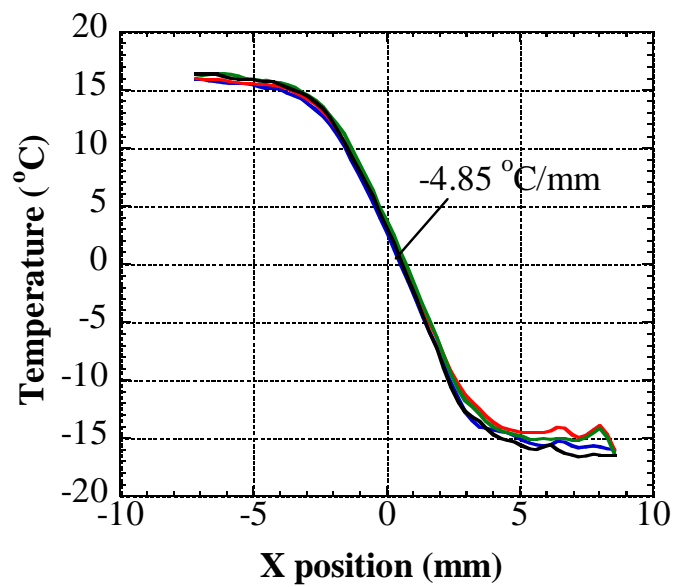


Fig. 4.5 Temperature profiles of slide glass placed on test section.

4.3 固液界面近傍における液相濃度の評価

測定した凝固点降下度と相図，あるいは化学ポテンシャルのつりあいから導出される式を用いて固液界面近傍の液相濃度を評価する．理論式の導出過程を以下に示す．

溶質が水に溶解すると，その溶液の凝固点（あるいは融点）は相図を用いて記述される．水と氷との混合物が凝固点 273.15 K で平衡状態にあるとき，各々の化学ポテンシャル μ は等しいので

$$\mu^{\text{ice}} = \mu^{\text{liquid}} \quad (4.1)$$

R を一般気体定数， T を溶液に接触している氷の凝固点，水の実率を x_w とすれば，溶質が存在する場合には水の化学ポテンシャルが $RT \ln(x_w)$ だけ減少する．したがって，

$$\mu^{\text{ice}} = \mu^{\text{solution}} = \mu^{\text{liquid}} + RT \ln(x_w) \quad (4.2)$$

$$RT \ln(x_w) = \mu^{\text{ice}} - \mu^{\text{liquid}} = -\Delta G_{\text{fus}} \quad (4.3)$$

ここで， G は自由エネルギーである．このとき，氷の化学ポテンシャルは溶質の影響を受けないと考えられ，一般的に溶質は完全に氷結晶から排除される．凝固する際のエンタルピー変化を $\Delta H_{\text{fus}} (= H^{\text{liquid}} - H^{\text{solid}})$ とすると，定圧状態では

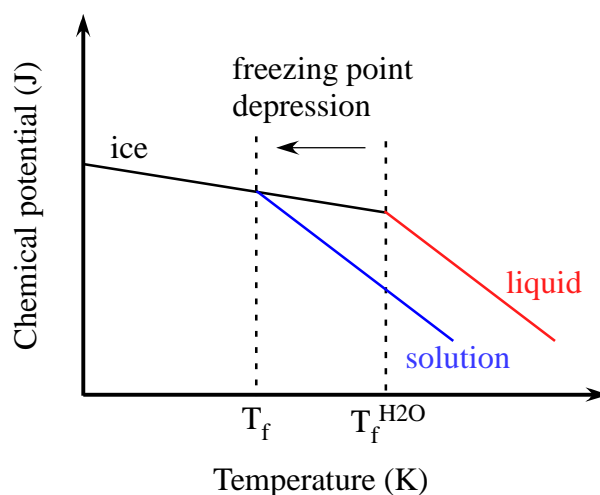


Fig. 4.6 Freezing point depression due to chemical potential difference.

$$\frac{\partial(\Delta G_{\text{fus}})}{\partial T} = -\Delta S_{\text{fus}} \quad (4.4)$$

となる. ここで, S はエントロピーを表す. 他方,

$$\frac{\partial(\Delta G_{\text{fus}}/T)}{\partial T} = \frac{1}{T} \frac{\partial(\Delta G_{\text{fus}})}{\partial T} - \frac{1}{T^2} \Delta G_{\text{fus}} = -\frac{T\Delta S_{\text{fus}} + \Delta G_{\text{fus}}}{T^2} = -\frac{\Delta H_{\text{fus}}}{T^2} \quad (4.5)$$

であることから, Eq. (4.3)は変形されて次式となる.

$$\frac{\partial \text{Ln}(x_w)}{\partial x_w} = -\frac{1}{R} \frac{\partial(\Delta G_{\text{fus}}/T)}{\partial T} \frac{\partial T}{\partial x_w} = \frac{\Delta H_{\text{fus}}}{RT^2} \frac{\partial T}{\partial x_w} \quad (4.6)$$

水の凝固点を $T_f^{\text{H}_2\text{O}}$ とすれば

$$\int_1^{x_w} \frac{dx_w}{x_w} = \int_{T_f^{\text{H}_2\text{O}}}^{T_f} \frac{\Delta H_{\text{fus}}}{RT^2} dT \quad (4.7)$$

$$\text{Ln}(x_w) = \text{Ln}(1-x_s) = \frac{\Delta H_{\text{fus}}}{R} \left(\frac{1}{T_f^{\text{H}_2\text{O}}} - \frac{1}{T_f} \right) \quad (4.8)$$

が得られる. ここで, x_s は溶質のモル分率であり, ΔH_{fus} の温度依存性については無視している. 希薄溶液 ($x_s \ll 1$) ならば

$$\text{Ln}(1-x_s) \approx -x_s \quad (4.9)$$

であるため, 次式が導かれる.

$$\Delta T = T_f^{\text{H}_2\text{O}} - T_f = \frac{x_s R T_f T_f^{\text{H}_2\text{O}}}{\Delta H_{\text{fus}}} \approx \frac{x_s R (T_f^{\text{H}_2\text{O}})^2}{\Delta H_{\text{fus}}} \quad (4.10)$$

方向性凝固観察実験によって凝固点降下度を測定し, 上式から固液界面近傍の液相濃度を評価した. 評価の際には $R = 8.314 \text{ J}/(\text{mol}\cdot\text{K})$, $T_f^{\text{H}_2\text{O}} = 273.15 \text{ K}$, $\Delta H_{\text{fus}} = 6009.5 \text{ J}/\text{mol}$ を用いた.

4.4 溶質分配係数の評価

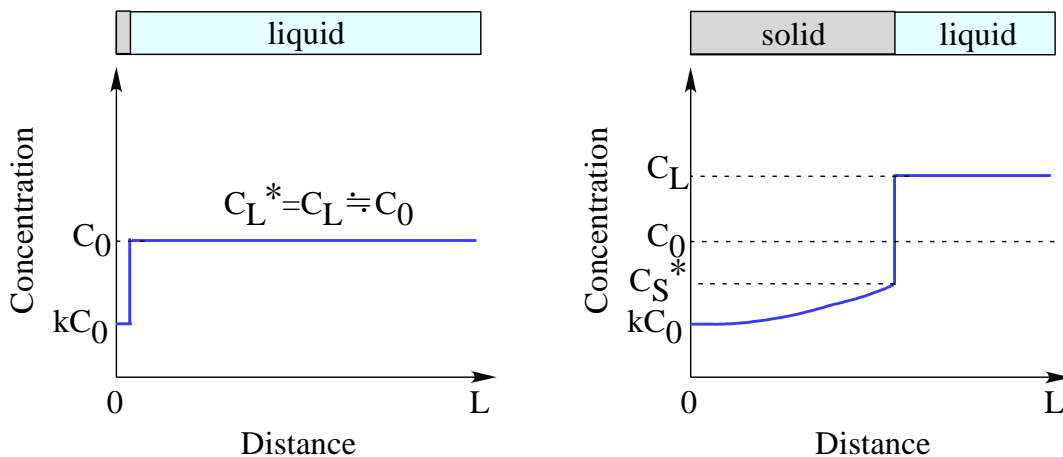
計測した界面進行方向の濃度変化から、溶質の再配分を表す分配係数 k を求めることにする。今、長さ L 、濃度 C_0 の水溶液の方向性凝固を考える。平衡凝固ならば、Fig. 4.7 a のように初期の微小固相部は凝固点 T_0 で kC_0 の濃度をもつ。ここで、液相の濃度が一様で、固相内拡散が無い場合を仮定する。界面温度 T^* において、界面濃度（固相側） C_S^* の氷層が界面濃度（液相側） C_L^* の溶液から凝固すると、形成された固相の長さ方向に溶質が分布する (Fig. 4.7 b)。溶液全体の固相率を F_S として、固相から掃き出されていく溶質量と液相の溶質増加量との物質収支は

$$(C_L - C_S^*)LdF_S = L(1 - F_S)dC_L \quad (4.11)$$

$F_S=0$ で $C_L=C_0$ なので、

$$\int_{C_0}^{C_L} \frac{dC_L}{(C_L - C_S^*)} = \int_0^{F_S} \frac{dF_S}{(1 - F_S)} \quad (4.12)$$

分配係数の定義式 $C_S^* = kC_L$ より、残液濃度の固相率依存性は次式で表される。



(a) Initial state of freezing.

(b) After solid/liquid interface proceeds.

Fig. 4.7 Concentration profiles of directional-solidified solution with rapid diffusion in liquid part and no diffusion in solid part.

$$C_L = C_0(1 - F_S)^{k-1} \quad (4.13)$$

この式は Scheil の式と呼ばれ、合金の凝固問題などで多用されている (Flemings, 1974). Scheil の式による実験結果の非線形回帰分析を行うことで、その溶液系の分配係数 k を得ることができる.

4.5 実験結果と考察

4.5.1 方向性凝固過程における固液界面の様相

NaCl 水溶液、サバの組織液およびタイの組織液の方向性凝固過程における、固液界面の様相を Fig. 4.8 a, b, c に示す. Fig. 4.8 a の最上段からリファレンスである水、初期 NaCl 溶液濃度 1, 2, 3 wt.% の供試試料をそれぞれ設置している. 水や 1, 2 wt.% の試料については平滑な界面の形成が観察される一方で、3 wt.% の試料ではデンドライト形成を確認できる. デンドライトは、固液界面前方において組成的過冷却が生じ、界面が不安定化することで発生・成長する. NaCl 水溶液濃度 4, 5 wt.% の試料においても同様のデンドライトが観察され、高濃度の試料で発生しやすい傾向にあった. これは、高濃度の試料ほど固液界面での溶質掃出し量が多くなり、組成的過冷却が大きくなることに起因している. 次に、リファレンス、魚肉組織液と初期 NaCl 溶液濃度 1, 2 wt.% の供試試料を最上段から順に設置した画像が Fig. 4.8 b, c である. サバとタイの組織液に関しては、残存する繊維などが含まれていて観察画像が鮮明ではないが、固液界面が存在することを確認できる. NaCl 溶液試料と比較すると、各組織液の界面は 1 wt.% と 2 wt.% の間に位置していることから、組織液を NaCl 溶液と見なせば約 1 wt.% の濃度を有すると考えられる. また、Fig. 4.8 a の初期濃度 1, 2 wt.% 試料では観察されなかったデンドライトが Fig. 4.8 b, c で現れたことについては、キャピラリーチューブ内における異質粒子の存在、あるいは低温側の温度制御が不安定であることに影響を受けているものと推察する.

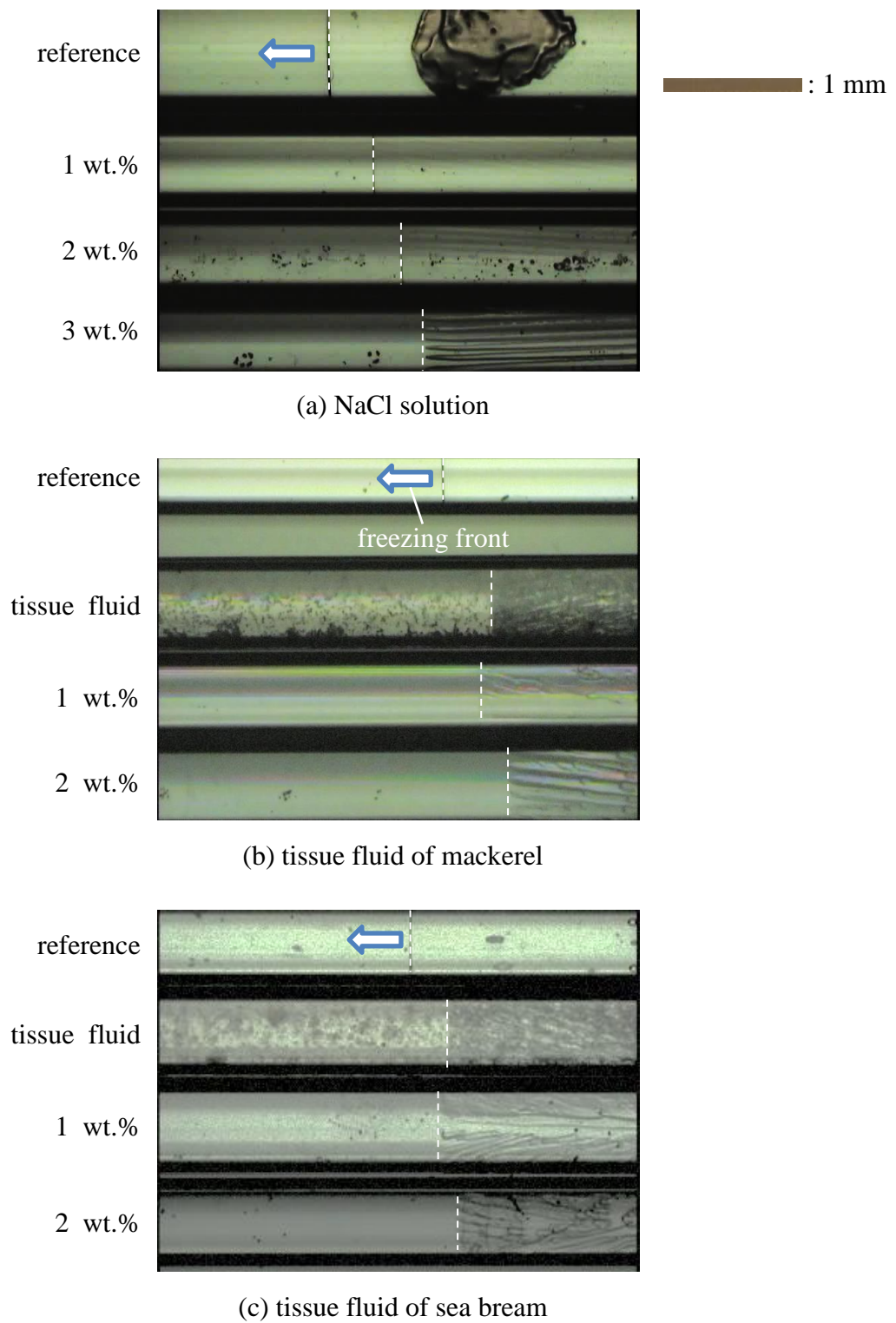


Fig. 4.8 Photomicrograph of solid/liquid interfaces during directional solidification.

4.5.2 NaCl 水溶液の凝固点降下度と相図および理論式との比較

観察画像から計測した凝固点降下度と NaCl 溶液試料の初期濃度との関係を Fig. 4.9 に示す. 図中には, H₂O-NaCl 系相図の液相線と Eq. (4.10)を示しており, 実験値との比較も行っている. 図に示している実験値は, チューブを 10 等分した位置で得られた凝固点の平均値となっていて, エラーバーは最大・最小を意味している. NaCl 水溶液の計測値は相図および Eq. (4.10)とよく一致しており, 今回の実験方法によって凝固点降下度を評価できていると考えられる.

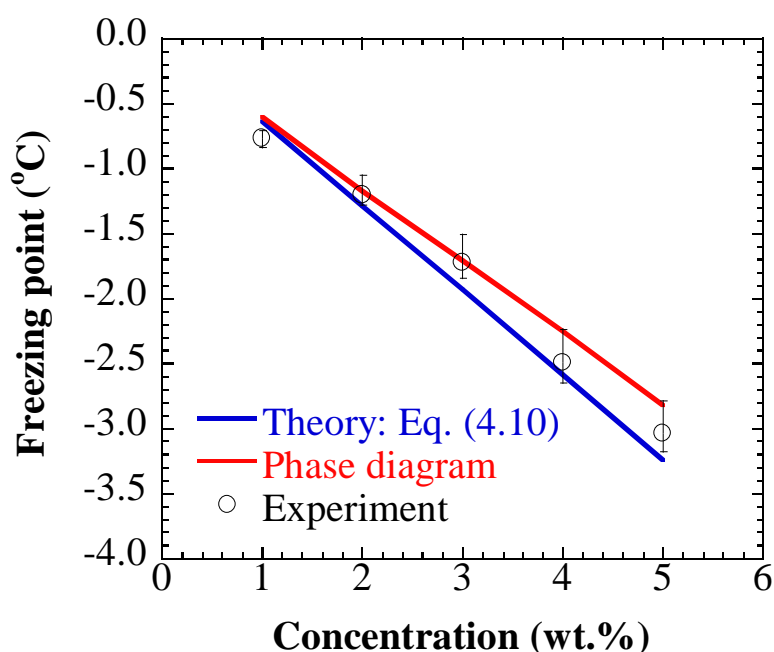


Fig. 4.9 Freezing point vs. initial solute concentration.

4.5.3 固液界面における液相濃度の変化

計測した NaCl 水溶液の凝固点降下度に対する濃度を H₂O-NaCl 系相図から求め, 各位置での固液界面近傍の液相濃度を評価した結果を Fig. 4.10 に示す. 図は縦軸に液相濃度, 横軸に冷却側チューブ端面からの距離をとっている. プロット横の数字は初期溶液濃度を表しており, 計測値に対して Scheil の式による近似を行っている. いずれの試料でも始端から終端にかけての濃度増加を確認できる. これは, 固液界面における溶質掃出しによって, 液相に掃き出された溶質が蓄積したことに起因している. サバとタイの組織液に対して同様の評価を行った結果が Fig. 4.11, 4.12 である. 各組

織液を NaCl 溶液と等価とみなして同じ相図から濃度評価を行った．図中には NaCl 水溶液の初期濃度 1, 2 wt.% の結果も併せて示している．Scheil の式による非線形回帰分析の結果，NaCl 溶液換算でサバは約 1.08 wt.%，タイは約 0.95 wt.% の濃度を有することがわかった．また，液相濃度の変化は NaCl 水溶液の場合と同じで，始端から終端にかけての濃度増加を確認できる．

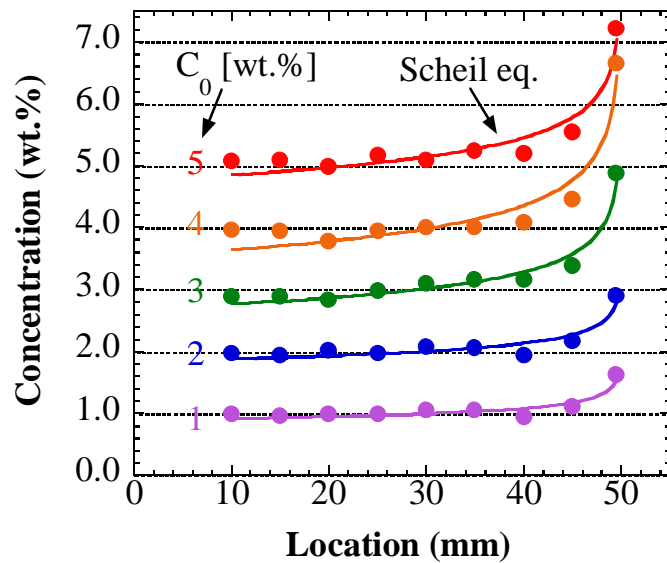


Fig. 4.10 Concentration change at solid/liquid interface in NaCl solution (1~5 wt.%).

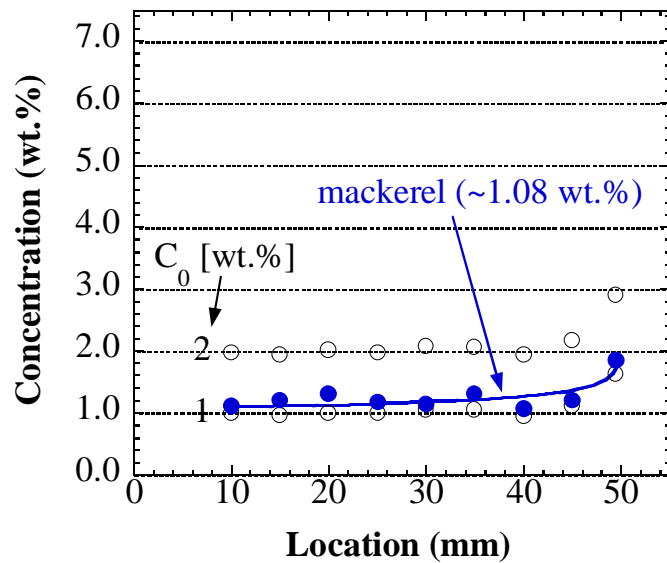


Fig. 4.11 Concentration change at solid/liquid interface in tissue fluid of mackerel.

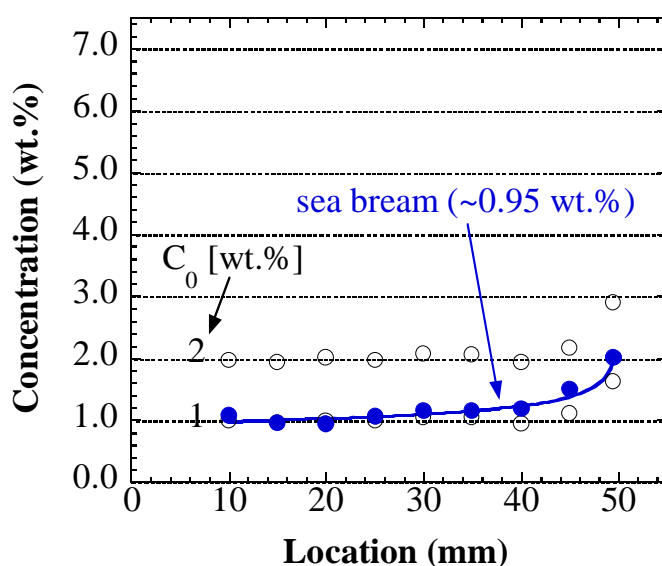


Fig. 4.12 Concentration change at solid/liquid interface in tissue fluid of sea bream.

4.5.4 NaCl 水溶液および魚肉組織由来溶液の分配係数

Fig. 4.10~4.12 における非線形回帰分析から分配係数を求め、各溶液の初期濃度と分配係数との関係を Fig. 4.13 と Table 4.1 に整理した。NaCl 溶液に関しては、初期濃度の増加に伴って分配係数が緩やかに上昇しているため、初期濃度が高くなると固相内に溶質が多く残存する傾向にある。しかし、1~5 wt.%では約 0.90 の値をとっており、希薄溶液であれば分配係数にほとんど変化がないと考えられる。NaCl の分配係数は、Matsuda and Kawasaki (1997) の報告の中で~0.95 (5000 mg/L) が示されていることから、本章で提案した測定手法による溶質分配係数の評価は有効と考えられる。一方、サバとタイの組織液では分配係数に 0.89 と 0.84 の違いが見られ、この違いが魚肉組織の冷凍特性に与える影響についても今後検討する必要がある。

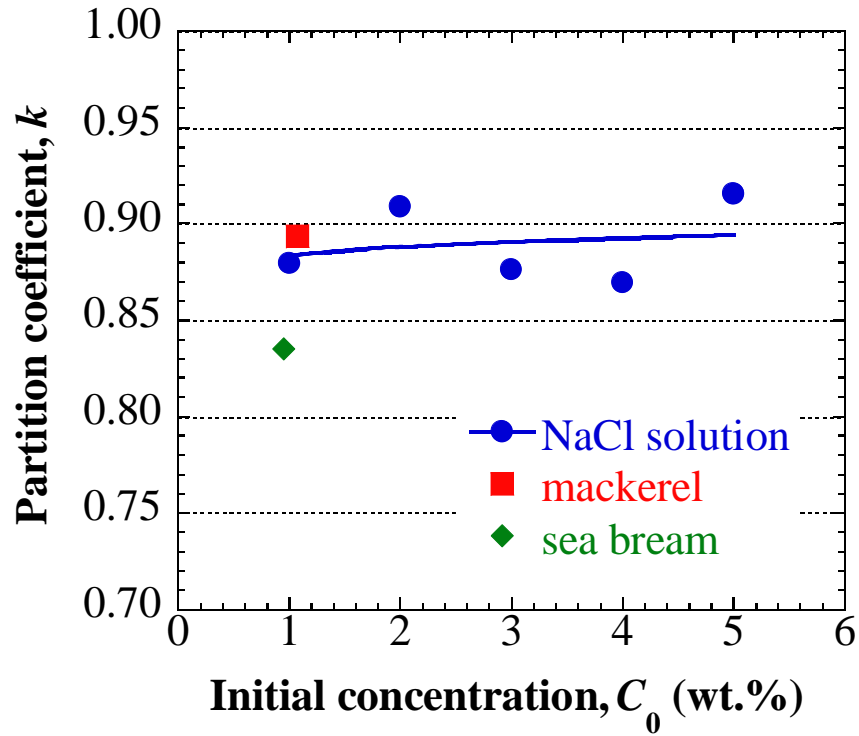


Fig. 4.13 Effects of initial solute concentrations on partition coefficients.

Table 4.1 Initial concentrations C_0 and partition coefficients k .

	NaCl					Mackerel	Sea bream
C_0 [wt.%]	1	2	3	4	5	~1.08	~0.95
k	0.88	0.91	0.88	0.87	0.92	0.89	0.84

(Tissue fluids of mackerel and sea bream are regarded as NaCl solution.)

4.6 結論

NaCl 水溶液および魚肉組織由来溶液（サバとタイ）の分配係数測定を目的とし、方向性凝固観察法を用いて溶液の凝固特性を調べた結果、以下の結論を得た。

- (1) 方向性凝固観察法を用いた実験観察により、簡易的に溶液中の溶質分配係数を計測する方法を提案した。
- (2) 溶液の初期濃度と分配係数の関係を示し、溶質濃度が高くなると分配係数が大きくなる傾向を確認した。また、各分配係数は NaCl 水溶液（初期濃度 1 ~5 wt.%）で約 0.90、サバとタイの組織液で 0.89 と 0.84 の値を示した。魚種間での分配係数の違いが組織の冷凍特性に与える影響について検討する必要がある。

第 5 章

魚肉組織の冷凍過程における細胞収縮と細胞ダメージとの関係

5.1 緒言

本論文第 3 章では，魚肉組織の冷凍過程における熱・物質移動数値解析を行うために二重セルモデルを提案した．実験結果との比較から，定量的な冷却特性を表現できることを確認したとはいえ，前述のモデルには修正すべき点がいくつかある．まず，細胞外では固液界面が連続的に伝播するのに対し，細胞膜で隔たれた細胞内では新たな氷核を必要とする．それ故に，細胞内外で凍結メカニズムを区別してモデル化すべきであった．また，浸透圧差に起因する細胞膜を介した水分輸送を考慮して解析を行ったが，その細胞収縮量は実験結果などに比べて小さく（ハミディ・鶴田, 2009），別の輸送駆動力を考慮する必要がある．そこで本章では，細胞内核生成理論を適用し，細胞外氷晶と細胞内過冷却水との間での蒸気圧差に基づく水分輸送機構を導入する．そして，改めて魚肉組織の冷凍特性について一次元数値解析を行い，細胞収縮と細胞ダメージとの関連について調査する．

5.2 解析モデルおよび数値解析方法

5.2.1 二重セルモデルの簡略化

本論文第 3 章で示した二重セルモデルでは，組織を細胞 V_C ，細胞外部分 V_X で構成されるコントロールボリュームの集合体としてモデル化した．構成成分としてタンパク質などの不活性体を考慮していたが，水が構成成分のほとんどを占めていることを踏まえて，細胞内外に細胞質はなく，NaCl 水溶液（0.9 wt.%）だけが含まれるものとする．解析モデル図を改めて Fig. 5.1 に示しており，各コントロールボリュームに細

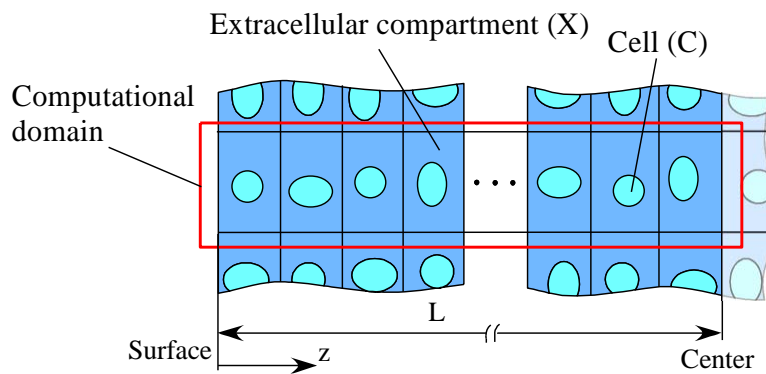


Fig. 5.1 Simulation model for fish tissues.

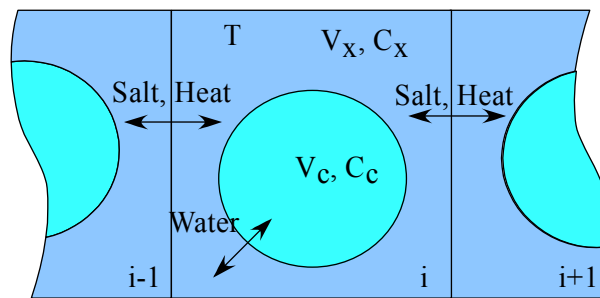


Fig. 5.2 Heat and mass transfer model.

胞（筋組織）が一つずつ含まれるように離散化を行う．サケ以外にサバやタイの筋組織を観察した結果，空間メッシュサイズ $\Delta z=0.2\text{ mm}$ とした．Fig. 5.2に示すように移動現象については，隣り合うコントロールボリュームとの間で熱伝導および細胞外液間で物質移動が生じるものとし，コントロールボリューム内の温度は細胞内外に関わらず一様とする．また，細胞内外では膜を介した水分輸送を考慮する．

5.2.2 温度回復法を利用した熱伝導計算

組織内温度場は熱伝導方程式

$$\rho C_p \frac{\partial T}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial z} \left(\lambda \frac{\partial T}{\partial z} \right) \quad (5.1)$$

を解いて求められる．ここで， ρ , C_p はコントロールボリュームの密度と比熱， T は温度， t は時間， λ は熱伝導率である．なお，相変化時の温度は凝固点で一定とする．すなわち，先に熱伝導方程式から過冷却度を求め，過冷却度に相当する固相率変化を温

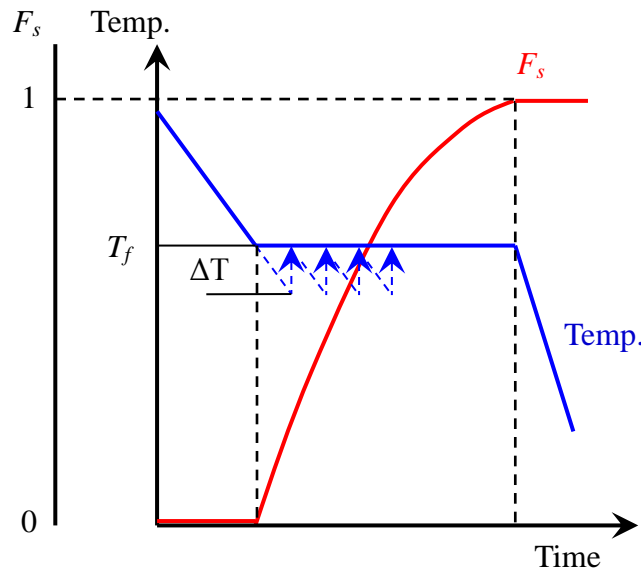


Fig. 5.3 Temperature recovery method.

度回復法により算出する。このとき，Fig. 5.3 に示すように固相率 F_s が 1 となるまでは凝固点 T_f を維持する。また，細胞外液の固液界面位置は熱伝導方程式と温度回復法を併用することで決定される。

5.2.3 物質移動と固液界面における溶質掃出し

細胞外液間での物質移動計算では，NaCl の水中での拡散係数を D とすると，拡散方程式

$$\frac{\partial C_X}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C_X}{\partial z^2} \quad (5.2)$$

を解くことによって濃度場を求める。しかし，固液相変化を考慮するモデルにおいては，凍結濃縮現象を表現する必要がある。ここで，Fig. 5.4 は固液界面における溶質掃出しの概略図であり，固液界面を境に起こる溶質掃出しに着目する。図中の s は界面位置， k は分配係数であり，界面が移動すると $(1-k)$ の割合だけ溶質が掃き出される。液相側のみに物質拡散を考慮すると，界面要素における溶質量の収支は

$$\rho \Delta z \frac{\partial C_X}{\partial t} = - \left(-\rho D \frac{\partial C_X}{\partial z} \right) + \rho C_X^s (1-k) \frac{\partial s}{\partial t} \quad (5.3)$$

と表される。界面要素には接続条件である上式を離散化して適用し，他の液相部では

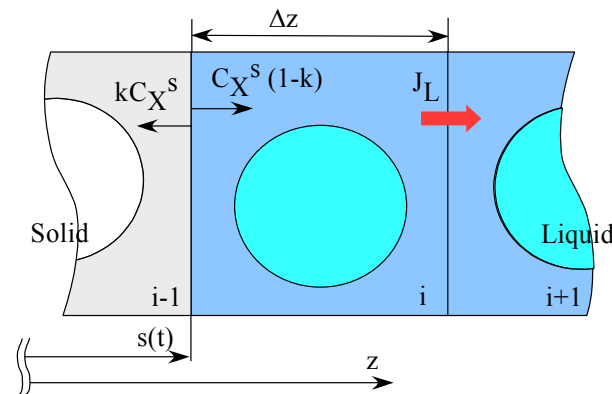


Fig. 5.4 Solute redistribution at a solid/liquid interface.

拡散方程式を解くことにより濃度場を求める。

5.2.4 凝固点の算出

組織内物質移動にもなって濃度変化が生じた場合には、Gibbs-Helmholtz の式と希薄溶液近似から導出される式（本論文第 4 章 4.3 節参照）

$$\Delta T = T_f^{\text{H}_2\text{O}} - T_f = \frac{x_s R (T_f^{\text{H}_2\text{O}})^2}{\Delta H_{\text{fus}}}$$

から凝固点を求めることにする。ここで、 $T_f^{\text{H}_2\text{O}}$ は水の凝固点 (273.15 K)、 x_s は溶質のモル分率、 R は一般気体定数、 ΔH_{fus} は融解潜熱である。

5.2.5 細胞内核生成理論 (Toner モデル)

組織内には細胞と細胞外基質に含まれる溶液が存在し、その凍結形態は内外で異なる。細胞外液は多孔質と見なせる組織の表面から中心部までつながっていると考えられ、一カ所でも核生成が起きると凍結が伝播していく。一方、細胞内液は細胞膜で外部から隔離されているため、細胞外での核生成とは別のクラスターが必要となる。

Toner ら (1990) によって、細胞膜表面での核生成 (surface-catalyzed nucleation, SCN) と細胞内の粒子を核とする核生成 (volume-catalyzed nucleation, VCN) が提案されて以来、凍結手術による腫瘍除去の数値解析などにおいて頻繁に適用されている (Wolkers et al., 2007; Balasubramanian et al., 2008)。実験などの知見から、魚肉組織中の水分は $-8 \sim 0$ °C 程度で凍結する傾向がある。したがって本研究では、細胞内液の凍結に関して比較的高い温度で核生成が生じる SCN モデルを採用することにする。

SCN と VCN の概念図を Fig. 5.5 に示す. 細胞内での氷晶形成は, 冷却条件に応じて細胞膜あるいは内部粒子のどちらかによって引き起こされる. $-15\sim-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ の間で細胞外氷晶が存在していると, 細胞膜が活発な核生成サイトとなる. 細胞膜が核生成サイトになる理由としては, 化学的, 電氣的, 機械的, イオンなどの様々な作用が挙げられる. 他方, 均質核生成温度に近い環境 ($\sim-35\text{ }^{\circ}\text{C}$) に細胞があると, 細胞内の粒子がクラスターとなり, 細胞内核生成が起こる. Toner らによれば, 不均質核生成頻度 I_{het} は次式で表現される.

$$I_{\text{het}} = \Omega \exp\left(-\frac{\kappa}{\Delta T^2 T^3}\right) \quad (5.4)$$

ここで, Ω と κ は氷核生成における動力学的・熱力学的パラメータであり, SCN では

$$\Omega = \Omega_0 \left(\frac{T}{T_{f0}}\right)^{1/2} \left(\frac{\eta_{l0}}{\eta_l}\right) \left(\frac{A_{\text{cell}}}{A_{\text{cell}0}}\right) \left(\frac{f(\theta)}{f(\theta_0)}\right)^{1/6} \quad (5.5)$$

$$\kappa = \kappa_0 \left(\frac{T_f}{T_{f0}}\right)^4 \left(\frac{f(\theta)}{f(\theta_0)}\right)$$

となる. 式中の η_l は水の粘性係数, A_{cell} は細胞表面積, サフィックスの 0 は等張状態

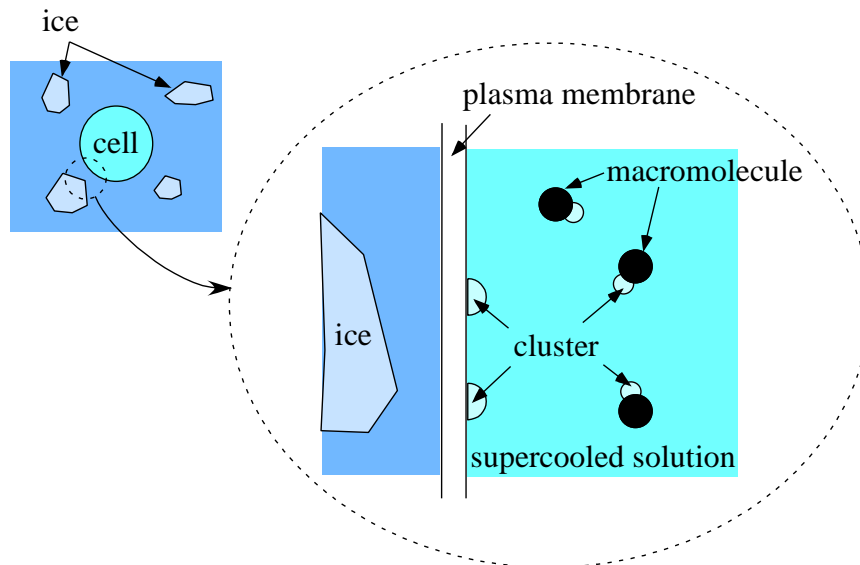


Fig. 5.5 Intracellular ice formation catalyzed either by a plasma membrane (SCN) or by intracellular particles (VCN).

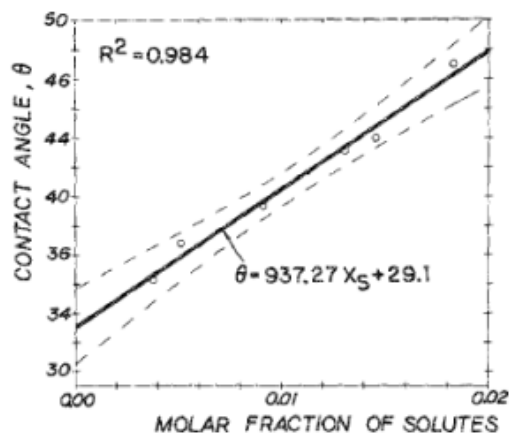


Fig. 5.6 Contact angle vs. molar fraction of solutes inside mouse oocytes (Toner et al., 1990).

を表している。 $f(\theta)$ はクラスターと細胞膜表面との接触角 θ の関数

$$f(\theta) = \frac{(1 - \cos \theta)^2 (2 + \cos \theta)}{4}, \quad 0 \leq f(\theta) \leq 1 \quad (5.6)$$

であり、 $\theta = 180^\circ$ で均質核生成と同じ状態になる。また、ネズミ卵母細胞における θ と内部の溶質モル分率との間には、Fig. 5.6 のような関係が示されている (Toner et al., 1990)。

SCN に起因する細胞内核生成の確率 PIF (probability of intracellular ice formation) を求める。理想的な生体細胞で構成される系の氷核生成頻度は次式で記述される。

$$I_{\text{het}} = \frac{1}{N_c'' A_{\text{cell}}} \frac{\partial i^*}{\partial t} \quad (5.7)$$

ここで i^* は臨界半径をもつクラスターの数、 N_c'' は時刻 t における未凍結細胞の総数である。臨界半径をもつクラスターの形成から瞬時に核生成を観察できるため

$$\frac{\partial i^*}{\partial t} = - \frac{\partial N_c''}{\partial t} \quad (5.8)$$

となり、氷核生成頻度の式から

$$A_{\text{cell}} I_{\text{het}} = -\frac{1}{N_c^u} \frac{\partial N_c^u}{\partial t} \quad (5.9)$$

$$\int_{N_c^{u'}}^{N_c^u} \frac{dN_c^u}{N_c^u} = -\int_{t'}^t A_{\text{cell}} I_{\text{het}} dt \quad (5.10)$$

$$\text{Ln} \left(\frac{N_c^u}{N_c^{u'}} \right) = -\int_{t'}^t A_{\text{cell}} I_{\text{het}} dt \quad (5.11)$$

t' は過冷却状態となった瞬間の時刻を意味しており、 $N_c^{u'}$ は細胞の総数に等しい。したがって、左辺の分数は時刻 t における未凍結細胞の割合を示しており、PIF を用いて改めると

$$\text{Ln}(1 - \text{PIF}) = -\int_{t'}^t A_{\text{cell}} I_{\text{het}} dt \quad (5.12)$$

$$\therefore \text{PIF} = 1 - \exp \left[-\int_{t'}^t A_{\text{cell}} \Omega \exp \left(-\frac{\kappa}{\Delta T^2 T^3} \right) dt \right] \quad (5.13)$$

が得られる。PIF は細胞膜表面で核生成が起きる確率を示す累積分布関数である。ネズミ卵母細胞の SCN 観察実験結果（等張液中で冷却速度 120 °C/min）と理論式とのフ

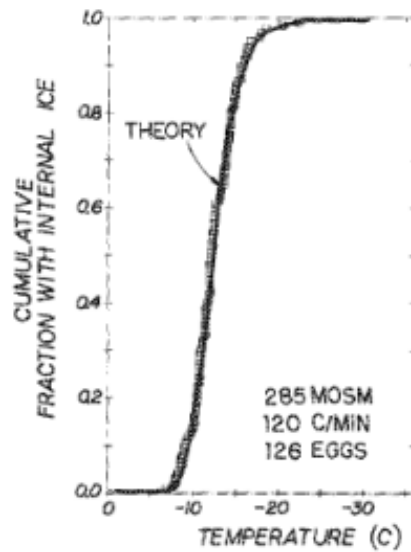


Fig. 5.7 Temperature dependence of cumulative fraction of oocytes with intracellular ice (Toner et al., 1990).

イッティングにより, $\Omega_0=3.56 \times 10^8 \text{ (m}^2\cdot\text{s)}^{-1}$, $\kappa_0=4.60 \times 10^9 \text{ K}^5$ と予測されている (Toner et al., 1990, Fig. 5.7 参照). 本研究では細胞内液が過冷却状態となった時点から PIF を算出する. そして PIF=1 の時に細胞内核生成が生じ, 細胞内液量に応じた潜熱放出が起こるものとする.

5.2.6 浸透圧差と蒸気圧差に起因する細胞膜を介した水分輸送

一般的に細胞膜は半透膜と見なされ, 溶媒である水がよく透過する一方で, 溶質であるイオンや有機分子は透過しにくいという性質がある. 第3章では, 膜を介した水分輸送の駆動力として浸透圧差を解析モデルに組み込んだが, その際の細胞収縮量は実験結果と比べて小さかった. そこで, 浸透圧差に加えて蒸気圧差に基づく水分輸送を考慮する. 細胞内核生成を解析モデルに適用したことによって, 細胞外液が凍結しているのに対し, 細胞内液は過冷却という状況が想定できる. 本論文第1章で述べたように, 低温において過冷却水と氷の間には蒸気圧差が存在する. Fig. 5.8 に示すように, 細胞外液が先に凍結していると, 過冷却状態にある細胞内液が蒸発して細胞膜を通過する. 通過した水蒸気は細胞外氷晶近傍で昇華して氷晶の一部となる. このとき, 水分子だけが膜を通過できるものとする. 細胞膜を介した細胞内への水分輸送量は, Kedem-Katchalsky の式 (Schultz, 1980) を拡張した次式で表現される.

$$\frac{dV_C}{dt} = (K_p^{\text{liquid}} \Delta\Pi - K_p^{\text{vapor}} \Delta P) A_{\text{cell}} \quad (5.14)$$

細胞内には水溶液だけが含まれているので, 単位時間あたりの輸送量は細胞占有率 V_C の時間変化と等価であると考えられる. また, 膜透過率 K_p については水と水蒸気の状

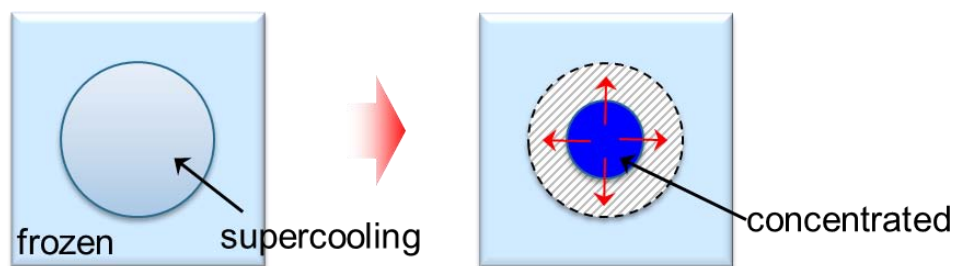


Fig. 5.8 Moisture transport through a cell membrane is caused by vapor pressure differences.

態で区別して考えており、水の膜透過率を温度の関数として次式で定義する。

$$K_p^{\text{liquid}} = K_{pg} \exp[b(T - T_g)] \quad (5.15)$$

ここで、 K_{pg} は参照温度 T_g での膜透過率、 b は温度係数である。膜輸送の駆動力として Eq. (5.14) の右辺第 1 項は浸透圧差 $\Delta\Pi (= \Pi_C - \Pi_X)$ 、第 2 項は過冷却水と氷の蒸気圧差 $\Delta P (= P_{\text{sup}} - P_{\text{ice}})$ を示している。蒸気圧差の項については、膜透過率を水と水蒸気の粘性係数 η_l, η_v で近似すれば

$$\frac{dV_c}{dt} \approx \left(K_p^{\text{liquid}} \Delta\Pi - \frac{\eta_l}{\eta_v} K_p^{\text{liquid}} \Delta P \right) A_{\text{cell}} \quad (5.16)$$

が得られる。数値解析中では細胞内液が過冷却、細胞外液が凍結状態にそれぞれある場合で、蒸気圧項が考慮される。蒸気圧差で輸送された水分は、細胞外氷晶の表面で昇華し、濃度 0 wt.% の氷層が細胞周りに形成されるものとする。

5.3 計算条件

Fig. 5.9 に冷凍過程の計算系を示す。組織の表面から中心部までを解析対象 (厚さ L 、初期温度 T_0 、初期濃度 C_0) とし、雰囲気温度 T_{air} での熱伝達により片側から冷却、他方を対称境界条件 (断熱) とした一次元の系で解析を行う。Table 5.1, 5.2 に各初期値

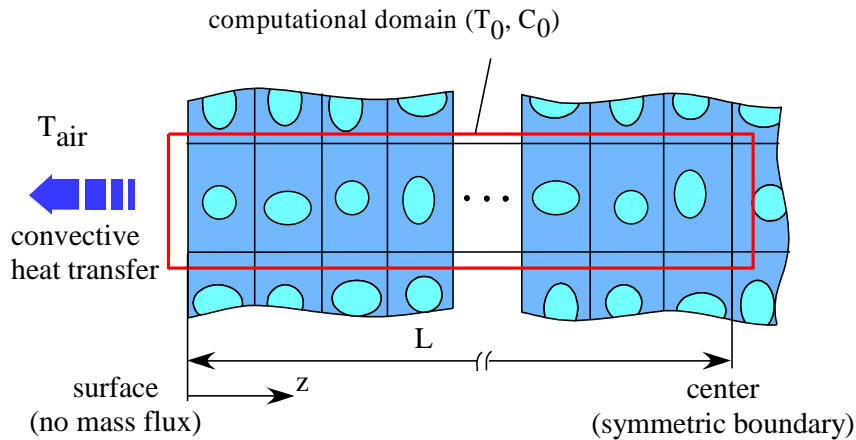


Fig. 5.9 Simulation system for heat and mass transfer in freezing processes.

および数値解析パラメータをそれぞれ示すとともに、熱物性値を Table 5.3 にまとめている。分配係数 k に関しては本論文第 4 章での計測結果を参照し、拡散係数 D については NaCl や KCl などの電解質水溶液における拡散係数のオーダーを基準にしている (白樫・棚澤, 1997)。魚種の違いを見るために、細胞の初期占有率 V_{C0} と膜透過率 K_{pg} を変化させて解析を行う。細胞内核生成に強く影響する等張時の動力学パラメータ Ω_0 および熱力学パラメータ κ_0 は、Toner らのフィッティング値を参照している。また、マイクロ波デハイドロフリージングの効果を評価するために、組織表面から中心部にかけての水分分布を考慮し、脱水量ごとの解析結果を比較する。Fig. 5.10 は、予備脱水 0% および 20% を想定した初期水分分布であり、中心部から表面にかけての水分分布を線形近似している。

Table 5.1 Calculation conditions.

Thickness	L	20.0	[mm]
Initial temperature	T_0	5.0	[°C]
Initial concentration	C_0	0.9	[wt.%]
Heat transfer coefficient	h	20.0	[W/(m ² ·K)]
Universal gas constant	R	8.314	[J/(mol·K)]
Latent heat of fusion	ΔH_{fus}	6009.5	[J/mol]
Kinetic parameter (isotonic) ^(a)	Ω_0	3.56×10^8	[1/(m ² ·s)]
Thermodynamic parameter (isotonic) ^(a)	κ_0	4.60×10^9	[K ⁵]
Temperature coefficient ^(b)	b	0.0325	[1/K]
Reference temperature ^(b)	T_g	293	[K]
Viscosity of liquid	η_l	1791	[μPa·s]
Viscosity of vapor	η_v	9.22	[μPa·s]

(a): Toner et al., 1990; (b): Mazur, 1963

Table 5.2 Numerical parameters.

Ambient temperature	T_{air}	-100, -90, -80, -70	[°C]
Diffusion coefficient	D	1.0, 5.0, 10.0	$[\times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}]$
Partition coefficient	k	0.85, 0.9	
Membrane permeability at T_g	K_{pg}	0.1, 0.5, 1.0	$[\times 10^{-11} \text{ m}^3/(\text{N}\cdot\text{s})]$
Initial cell volume fraction	V_{C0}	0.5, 0.7	

Table 5.3 Thermo-physical properties.

Properties	Unfrozen ($F_s = 0$)	Frozen ($F_s = 1$)	Mushy ($0 < F_s < 1$)
λ [W/(m·K)]	0.583	2.220	$\lambda_i F_s + \lambda_f (1 - F_s)$
C_p [kJ/(kg·K)]	4.176	2.062	$C_{pi} F_s + C_{pl} (1 - F_s)$

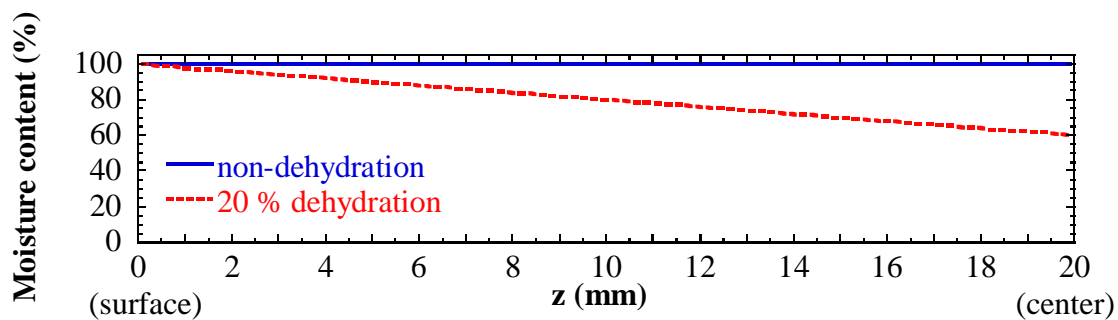


Fig. 5.10 Initial moisture distributions.

5.4 解析結果と考察

5.4.1 組織内の状態（固相率・濃度・温度）

まず、 $T_{\text{air}} = -80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $D = 1.0 \times 10^{-9}\text{ m}^2/\text{s}$ 、 $K_{pg} = 1.0 \times 10^{-11}\text{ m}^3/(\text{N}\cdot\text{s})$ 、 $k = 0.9$ 、 $V_{c0} = 0.7$ とした場合の解析結果を例に挙げ、冷凍過程における組織内の状態について説明する。

Fig. 5.11 は、冷却面から 2 mm と 10 mm の位置における細胞外固相率と PIF の時間変化である。実線が細胞外固相率、破線が PIF を示しており、どちらの値も 1 となった時点で溶液が液相から固相へと遷移することを表している。核生成が生じるまでは細胞内液が過冷却状態にあるため、細胞外液が先に凍結している。また、細胞外凍結と細胞内核生成との時間間隔は冷却面から離れた位置ほど長くなり、これは冷却速度の低下によるものと考えられる。

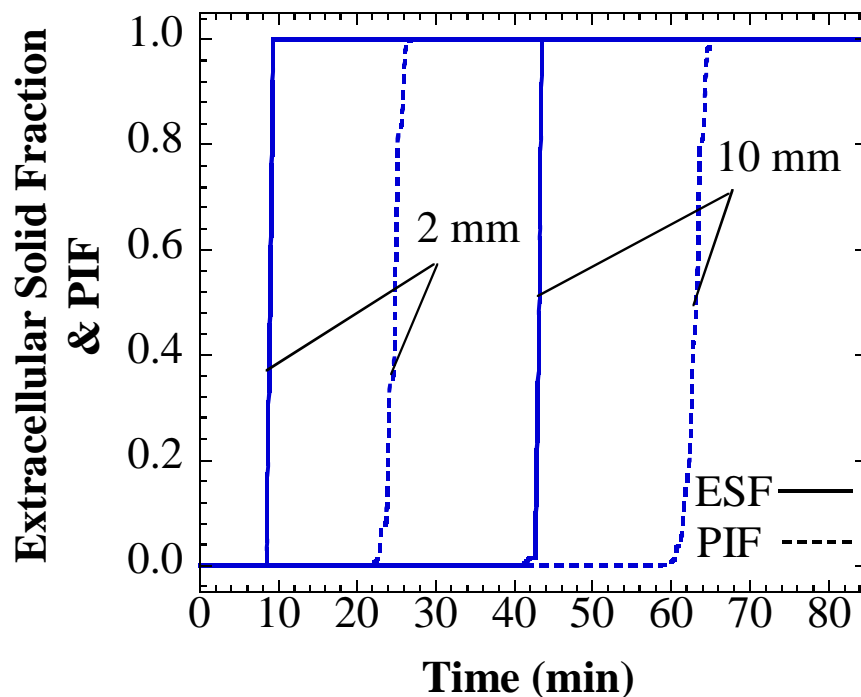


Fig. 5.11 Extracellular solid fraction and PIF at two locations vs. time in freezing process.

次に、細胞内外の固相率、濃度および温度分布を Fig. 5.12~5.14 に示す。それぞれ、初期段階(10 min)、冷却面から約 10 mm の位置で細胞内核生成が起きた時(67.7 min)、組織内の細胞外液が全て凍結した時(88.8 min)の3つの時点における分布となっている。白黒のカラーマップが固相率分布であり、白が未凍結、黒が凍結部分を表している。固相率分布の下のグラフが細胞内外の濃度分布であり、濃度分布は初期濃度によって無次元化した値を縦軸にとっている。冷凍開始 10 分後に表面から 2 mm の位置まで細胞外の固液界面が進展し、界面において溶質が掃き出されることによる濃度上昇が見られる。この濃度上昇によって細胞が脱水され、細胞内濃度も上昇している。細胞外液の濃度上昇は細胞内核生成時の分布にも見られ、細胞外が全て凍結した時点では組織中心部における溶質の蓄積を確認できる。Fig. 5.13 に示した細胞内核生成時の温度分布では、核生成に伴う潜熱放出によって温度が上昇していることがわかる。また、細胞内外の固相率分布を比較すると、過冷却状態にある細胞が多く存在していることが確認される。この領域では細胞外氷晶と過冷却水との蒸気圧差によって細胞脱水が進行するため、細胞内液の濃度上昇が生じる。冷凍過程において、浸透圧差と蒸気圧差に基づく水分輸送が細胞内液の濃度上昇を引き起こしているが、蒸気圧差に起因する輸送量は浸透圧差による輸送量よりも多くなっている。また、蒸気圧差に基づく水分輸送によって、細胞内液は細胞外に比べて高張な状態で凍結している。

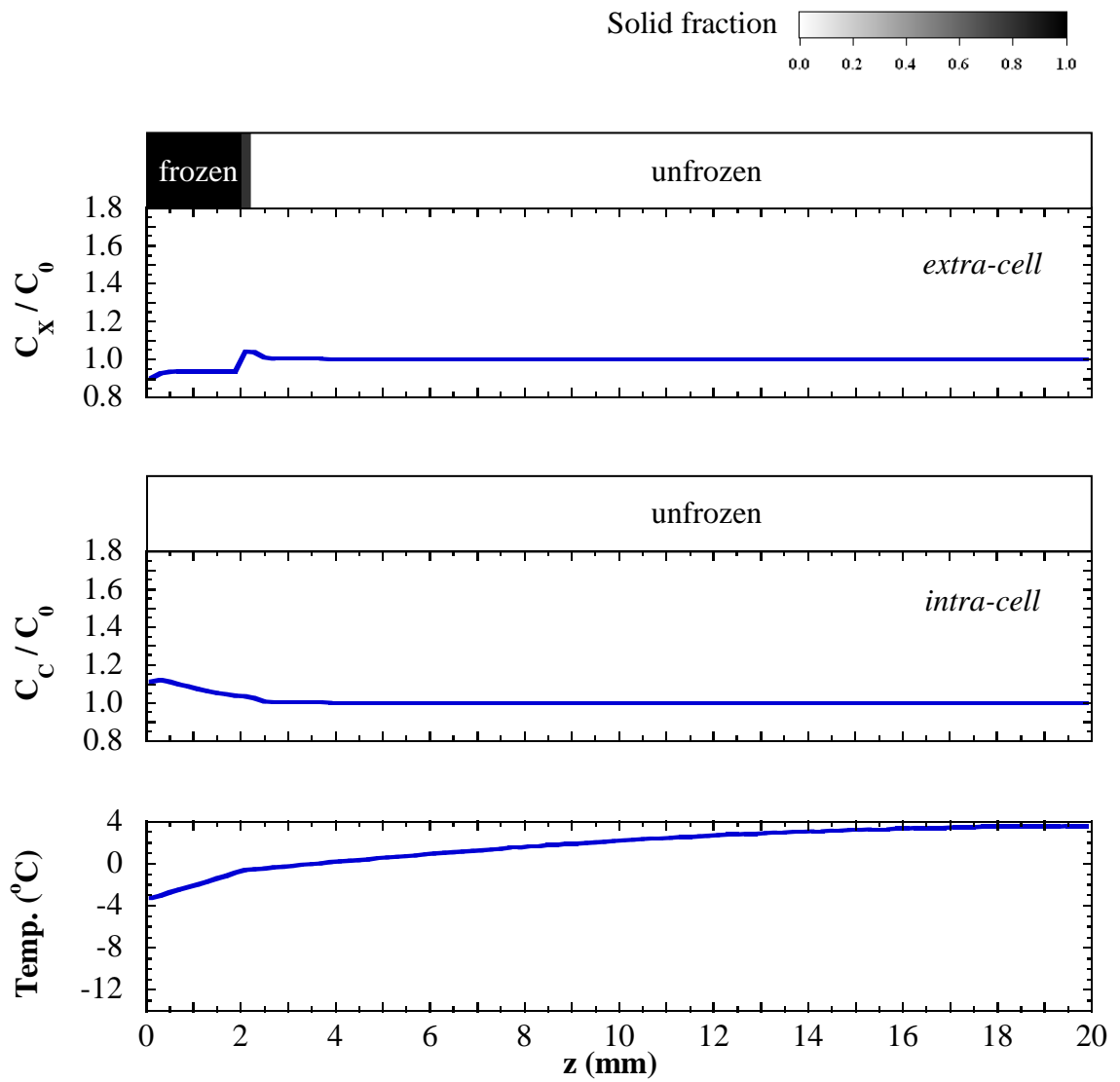


Fig. 5.12 Solid fraction, concentration and temperature profiles in freezing process (10 min later).

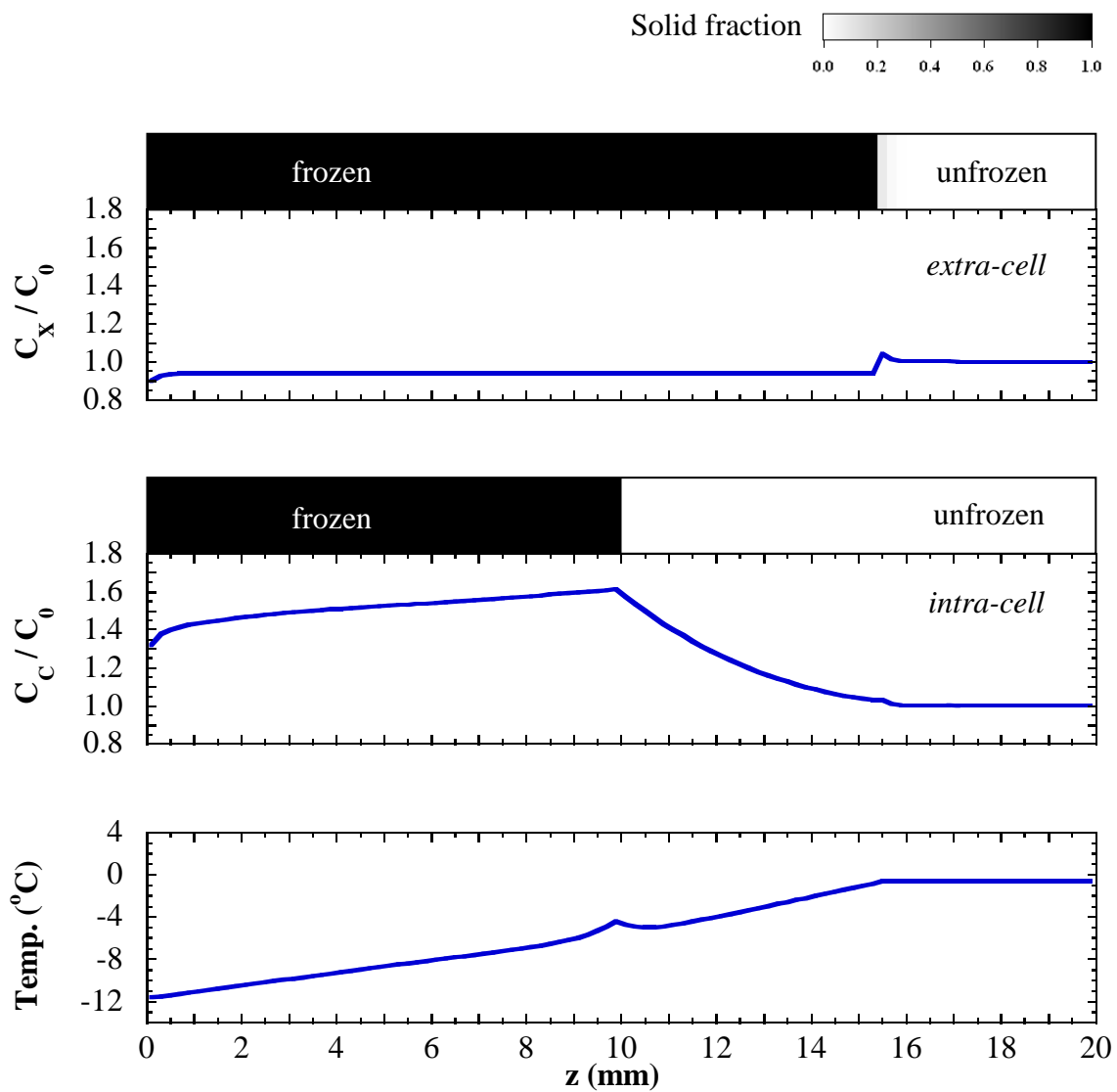


Fig. 5.13 Solid fraction, concentration and temperature profiles in freezing process with IIF (67.7 min later).

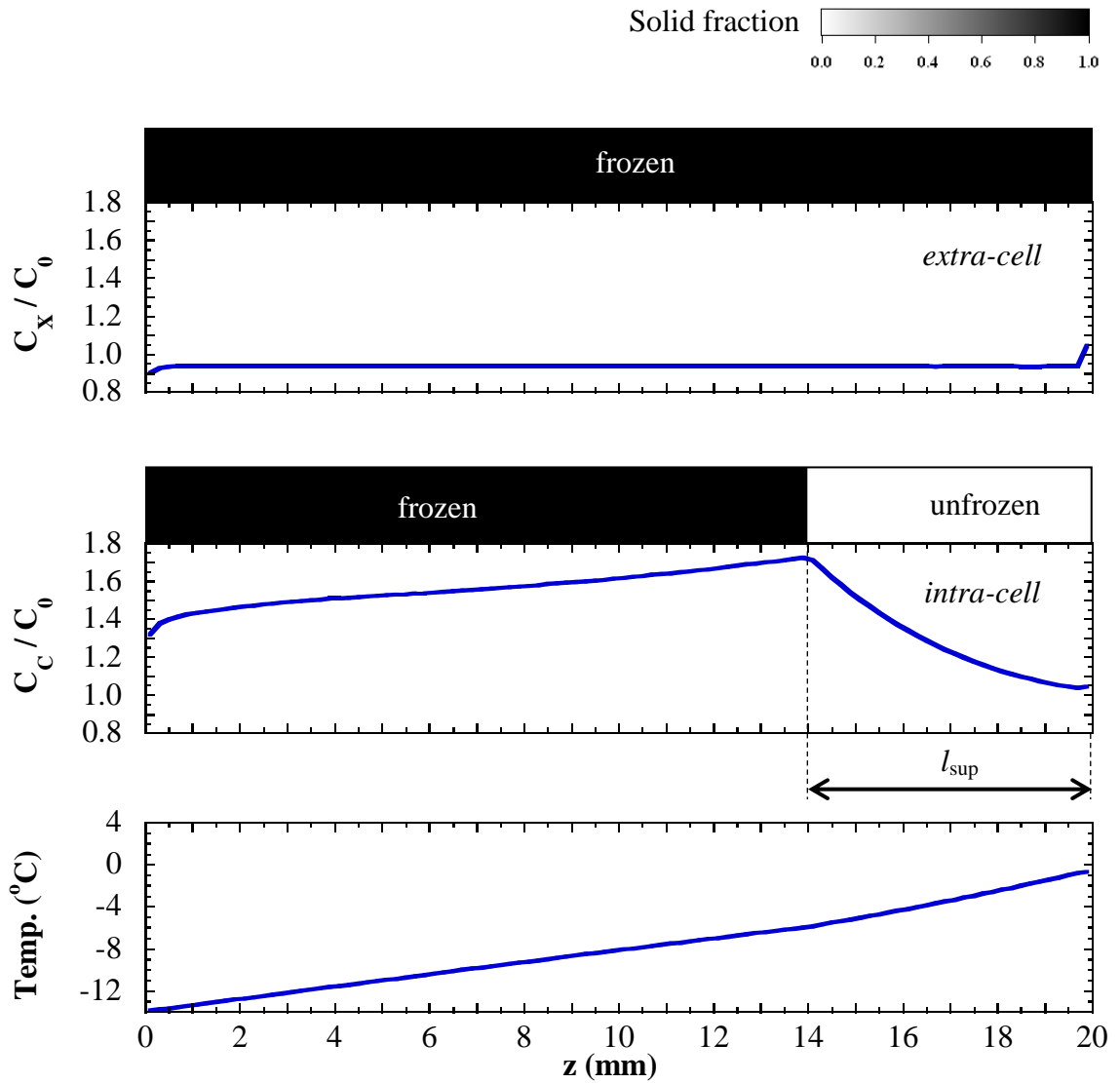


Fig. 5.14 Solid fraction, concentration and temperature profiles in freezing process after extracellular freezing (88.8 min later).

Fig. 5.15 は全ての組織液が凍結した時点での細胞内外濃度分布であり，細胞内濃度の傾向が 14 mm の位置から変化していることがわかる．この変化について考察するために，細胞内が過冷却状態にある領域の長さを l_{sup} (Fig. 5.14 参照)，最終的に最大細胞内濃度をとる細胞と中心部までの距離を l_{peak} (Fig. 5.15 参照) と定義する．雰囲気温度 $T_{\text{air}} = -100, -90, -70$ (°C) の各条件で解析を行い， l_{sup} を変化させて整理した結果が Fig. 5.16 である．横軸に雰囲気温度，縦軸に l_{sup} と l_{peak} をとっている．どの雰囲気温度でも l_{sup} と l_{peak} が一致しており，過冷却領域の長さが細胞内濃度分布に影響を及ぼしていると考えられる．細胞外液が全て凍結すると，相変化に費やされていた冷却エネルギーは細胞内核生成が生じる温度まで冷却するためだけに充当される．それ故

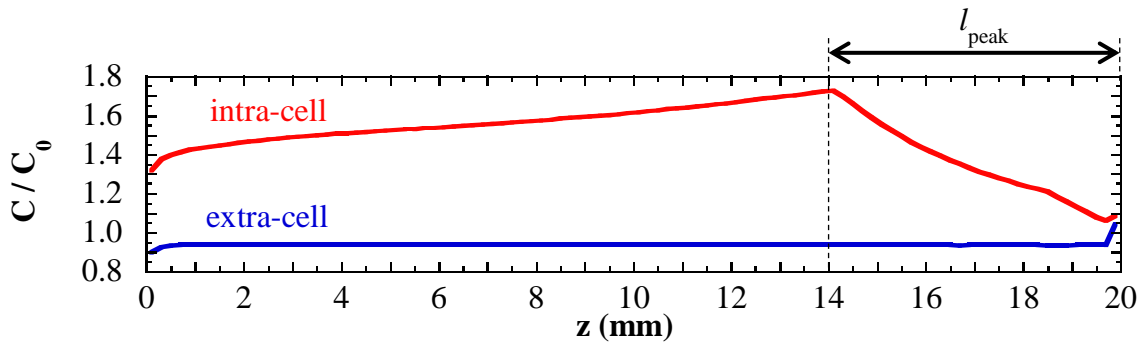


Fig. 5.15 Intracellular and extracellular concentration profiles after freezing.

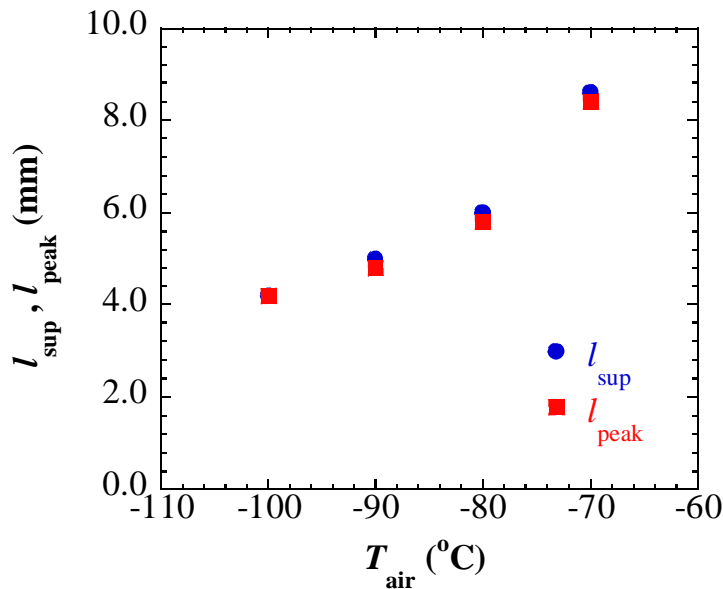


Fig. 5.16 l_{sup} and l_{peak} vs. ambient temperature.

に冷却速度が速くなり、膜を介した蒸気圧水分輸送の時間が制限されたものと考えられる。また、雰囲気温度が高くなると l_{sup} が増加することから、蒸気圧差に基づく水分輸送によって細胞脱水が進行する。この点に関しては N 曲線上の冷却速度の遅い領域に対する見解から、過度の細胞脱水による塩害に注意する必要がある。

5.4.2 細胞外液における物質移動の影響

細胞外での物質移動の影響を調べるために、拡散係数 $D = 1.0, 5.0, 10.0 (\times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s})$ とした場合の解析を行った。拡散係数以外のパラメータは $T_{\text{air}} = -80 \text{ }^\circ\text{C}$, $K_{\text{pg}} = 1.0 \times 10^{-11} \text{ m}^3/(\text{N}\cdot\text{s})$, $k = 0.9$, $V_{\text{c0}} = 0.7$ に設定している。Fig. 5.17 は、冷凍開始 40 分後における細胞外液の濃度分布を拡散係数の違いで比較した図である。40 分後に表面から約 10 mm の位置まで固液界面が進展し、界面において溶質が掃き出されることによる濃度上昇が見られる。拡散係数の違いに着目すると、濃度分布に大きな差異が生じており、拡散係数が大きくなると固液界面近傍の濃度境界層が厚くなることを確認できる。したがって拡散が速い状況では、広い範囲で未凍結部分での細胞内外液間の水分輸送

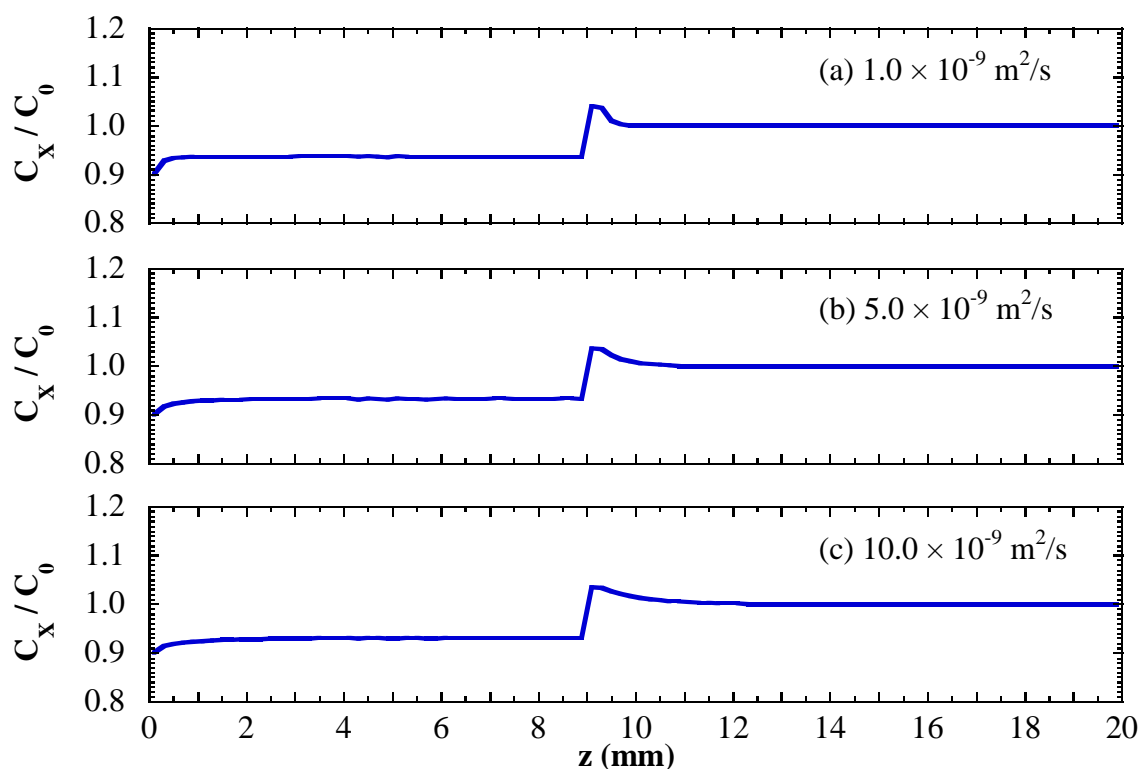
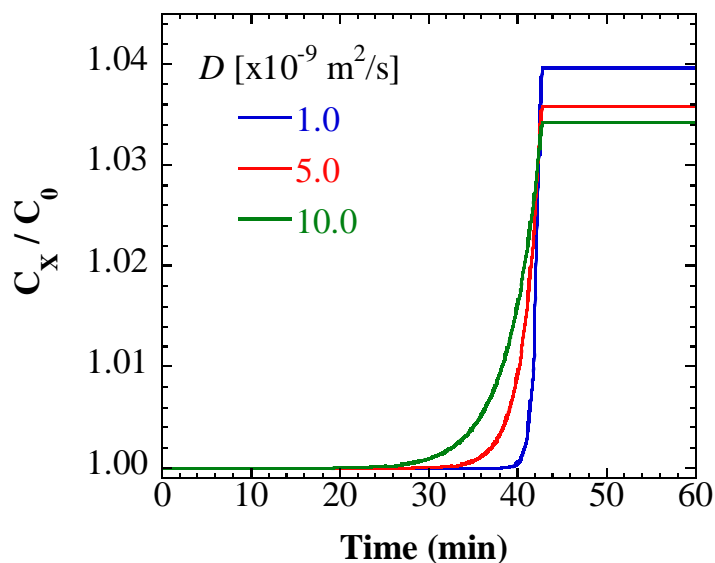


Fig. 5.17 Extracellular concentration profiles (40 min later).

Fig. 5.18 Concentration-time curves ($z = 10$ mm).

が起これると考えられる。

Fig. 5.18 は、冷却表面から 10 mm の位置における細胞外液濃度の時間変化を示しており、縦軸には初期濃度で無次元化した値をとっている。凍結が進行すると固液界面が 10 mm の位置まで進展するため、細胞外濃度が上昇する。拡散が速くなると、濃度が緩やかに上昇するのに加えて、その最大値が小さくなる傾向にある。

5.4.3 予備脱水の影響

マイクロ波減圧乾燥による予備脱水の影響を検証するために、未脱水組織と Fig. 5.10 に示した初期水分分布 (20% 予備脱水) を有する組織の冷凍特性を比較する。計算条件は、 $T_{\text{air}} = -80$ °C、 $D = 1.0 \times 10^{-9}$ m²/s、 $k = 0.9$ 、 $K_{pg} = 1.0 \times 10^{-11}$ m³/(N·s)、 $V_{c0} = 0.7$ に設定した。また、初期水分分布の存在によって細胞外液の濃度分布にも影響が及ぶため、細胞内外液の浸透圧平衡が成立した状態で解析を行うことを考え、20% 脱水条件については 60 分間の定温保持 (5 °C) の後に冷却を開始する。Fig. 5.19 は定温保持されている細胞内外液の濃度分布であり、経過時間毎にプロットしている。初期の細胞外液には濃度分布が存在しており、時間が経つにつれて一様な分布に近づいている。しかし、この濃度変化は細胞膜を介した水分輸送が生じた結果であり、細胞外液間での物質移動によるものではないと考えられる。それ故に、1 分後と 60 分後の分布にはほとんど差異が見られない。

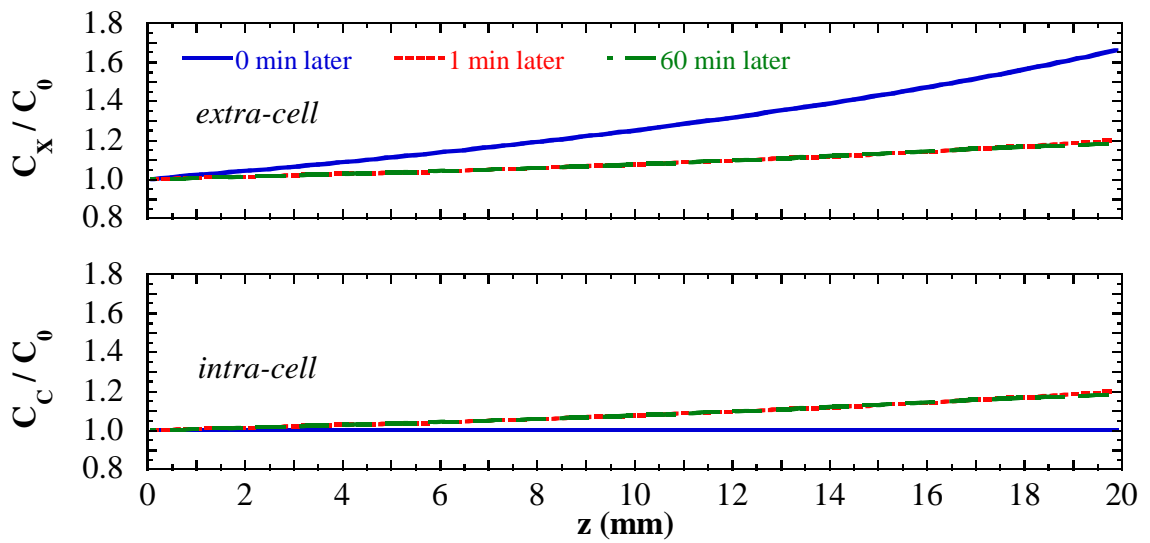


Fig. 5.19 Intracellular and extracellular concentration profiles at constant temperature (5 °C).

冷却開始 60 分後における細胞内外の固相率，濃度および温度分布を Fig. 5.20 に示す．まず，固相率分布においては固液界面の進展に違いが見られ，予備脱水による凍結時間短縮を確認できる．細胞外濃度に関しては初期水分分布の影響を受けた濃度分布となっているが，未脱水組織と同様に固液界面での溶質掃出しによる濃度上昇が存在する．細胞内濃度分布では，予備脱水の有無に関わらず蒸気圧差に起因する水分輸送によって濃度が上昇している．細胞内が過冷却状態にある領域を比較すると，20%脱水組織の方が長くなっている．これは細胞内外液の濃度に影響を受けていると考えられ，Fig. 1.8 a に示されているように，細胞外液の濃度が高くなると細胞の過冷却状態は長くなる傾向にある．

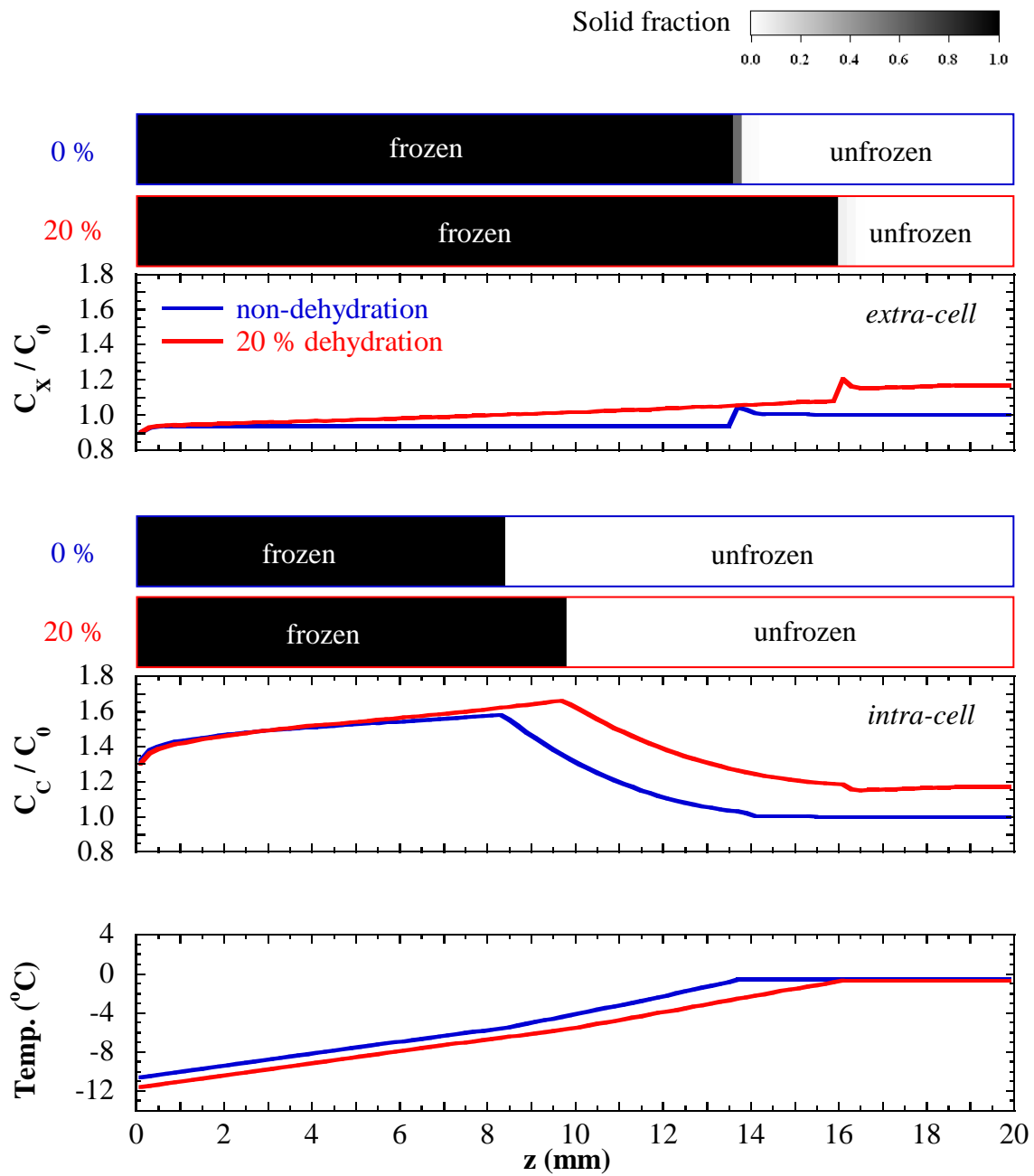


Fig. 5.20 Comparison of profiles between non-dehydrated tissue and 20 % dehydrated tissue. Profiles are solid fraction, concentration and temperature profiles after 60 min of cooling.

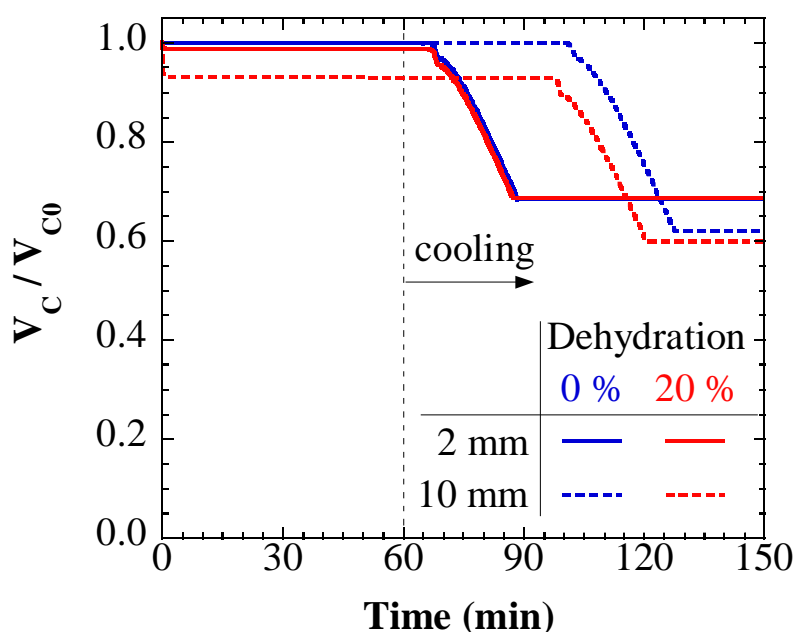


Fig. 5.21 V_c/V_{c0} at two locations vs. time in freezing process with/without dehydration.

Fig. 5.21 は、冷却表面から 2 mm と 10 mm の位置における細胞の大きさの時間変化を各脱水条件でプロットした図となっている。表面から 2 mm の位置は初期水分分布の影響を受けていないため、予備脱水による差異がほとんど見られない。他方、表面から 10 mm の細胞には冷却開始前の大きさに違いが見られるが、最終的にはほぼ同じ大きさの細胞となっている。このことから、凍結前には予備脱水の影響で細胞収縮が進行してしまうが、凍結後の細胞サイズにそれほどの差がないので、細胞損傷を防ぐために予備脱水を用いた凍結時間短縮による氷晶成長抑制を優先すべきであると考ええる。

5.4.4 魚種の影響

本論文第 2 章では、魚肉組織としてサバとタイを取り上げてその冷凍・解凍特性を実験的に評価した。その結果、解凍後の組織損傷や水分再吸収量などに魚種間での違いを確認した。そこで、魚種の違いによる冷凍特性への影響を調べるために、膜透過率 K_{pg} と初期細胞占有率 V_{c0} に着目する。膜透過率が大きいと細胞膜を介した水分輸送量が多くなり、初期占有率が大きいと細胞内に含まれる水分が多くなる。また、第 4 章で示した分配係数の違いについても検証する。各値を $K_{pg} = 0.1, 0.5, 1.0 (\times 10^{-11} \text{ m}^3/(\text{N}\cdot\text{s}))$, $k = 0.85, 0.9$, $V_{c0} = 0.5, 0.7$ に変化させ、その他のパラメータを $T_{\text{air}} = -80^\circ\text{C}$,

$D = 1.0 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ として数値解析を行った。

冷却表面から 2 mm と 10 mm における細胞サイズの時間変化を Fig. 5.22 に示す。図の縦軸には細胞の初期の大きさとの比をとっており、膜透過率をパラメータとしている。凝固の進行に伴い、膜輸送により細胞内水分が流出し、細胞の大きさは減少する。組織内部に位置する細胞の方が脱水される傾向にあるため、10 mm の位置にある細胞の方が収縮している。また、細胞膜の透過性を表す膜透過率が大きい場合、輸送量が増加することによって細胞収縮が進行する。冷凍過程における細胞収縮が過度に進行すると解凍後の組織復元率の低下を招くため、膜透過率の大きい細胞を有する組織に対しては、急速凍結を施して細胞脱水を最小限にする必要がある。

Fig. 5.23 は、細胞外凍結時の凝固点と細胞内核生成が生じた温度を膜透過率に対してそれぞれプロットした図である。図中のプロットは組織を 10 等分した位置における値の平均値であり、エラーバーは最大・最小を意味している。核生成温度に比べて細胞外凝固点が高くなっており、細胞内よりも細胞外の方が速く凍結する。また、膜透過率が変化しても細胞外凝固点がほぼ一定であるのに対し、膜透過率の増加に伴い核生成温度は減少する傾向にある。細胞内液が過冷却状態のまま最大氷晶生成帯を通過すれば、細胞内の氷晶成長を抑えた冷凍を実現できると考えられ、膜透過率の大き

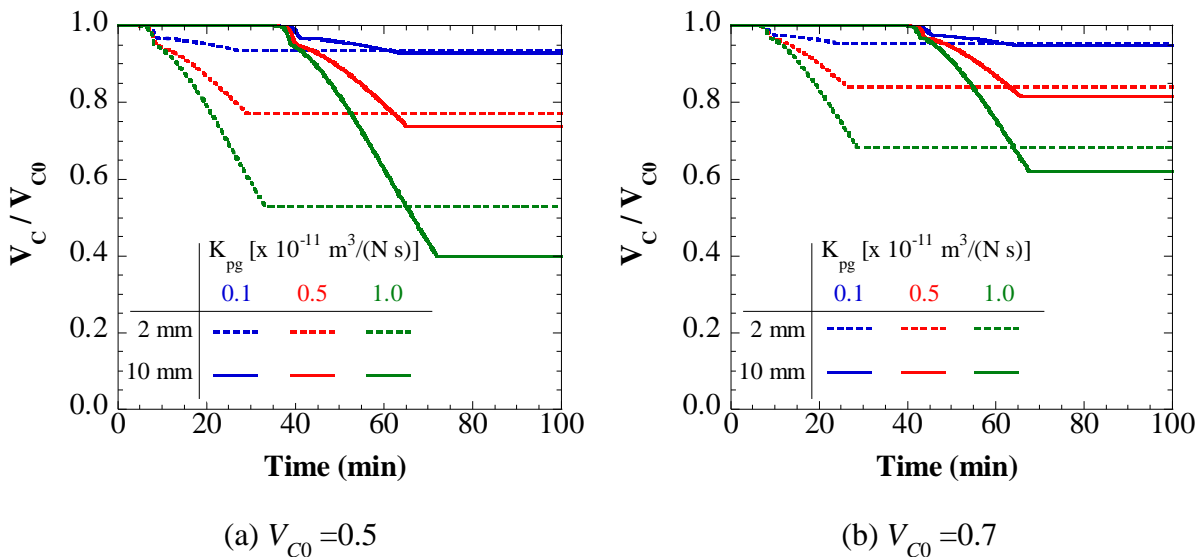


Fig. 5.22 Effects of membrane permeability and initial cell volume fraction on cell shrinkage ($K_{pg} = 0.1, 0.5, 1.0 [x10^{-11} \text{ m}^3 / (\text{N}\cdot\text{s})]$).

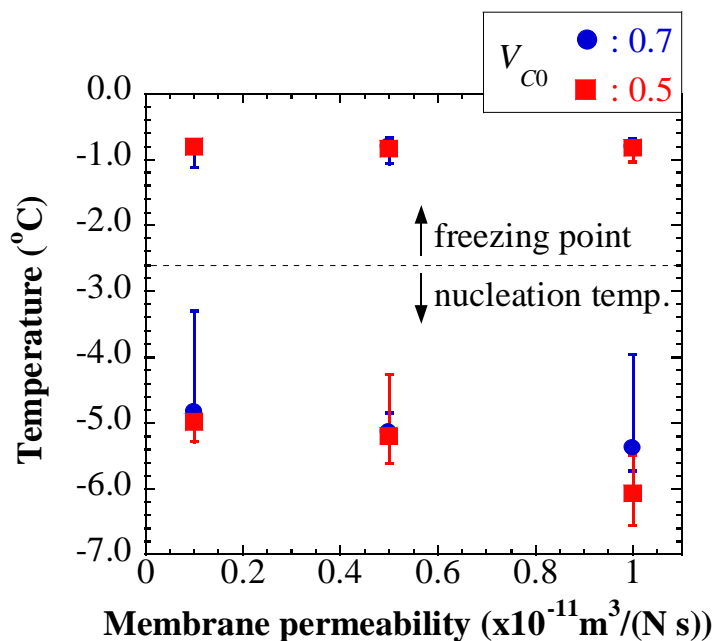


Fig. 5.23 Extracellular freezing point and intracellular nucleation temperature vs. membrane permeability.

い魚肉組織は冷凍による損傷が少なくなると推察される。

冷凍過程における細胞外液の濃度分布について、異なる分配係数で比較した結果を Fig. 5.24 に示す。図中には冷却開始 40 分後と凍結後の濃度分布をプロットしている。分配係数が小さい場合には、固液界面において掃き出される溶質量が多くなるとともに、固相内濃度が低下している。凍結後では、中心部における溶質の蓄積が大きくなっている。Fig. 5.25 は、冷却面から 2 mm と 10 mm に位置する細胞の大きさの時間変化を分配係数別に示した図である。分配係数が小さくなると固液界面における細胞外濃度が増加するため、浸透圧差に起因する膜輸送量が多くなり、細胞がより収縮する傾向にある。しかし、分配係数が 0.85 と 0.9 程度の差であれば、収縮量に違いはないと言える。

したがって冷凍時の細胞収縮においては、細胞膜の吸・排水能力を表す膜透過率の影響が大きく、第 4 章で確認したサバとタイとの溶質分配係数の違い (0.84 と 0.89) は収縮量へほとんど影響しないと考えられる。

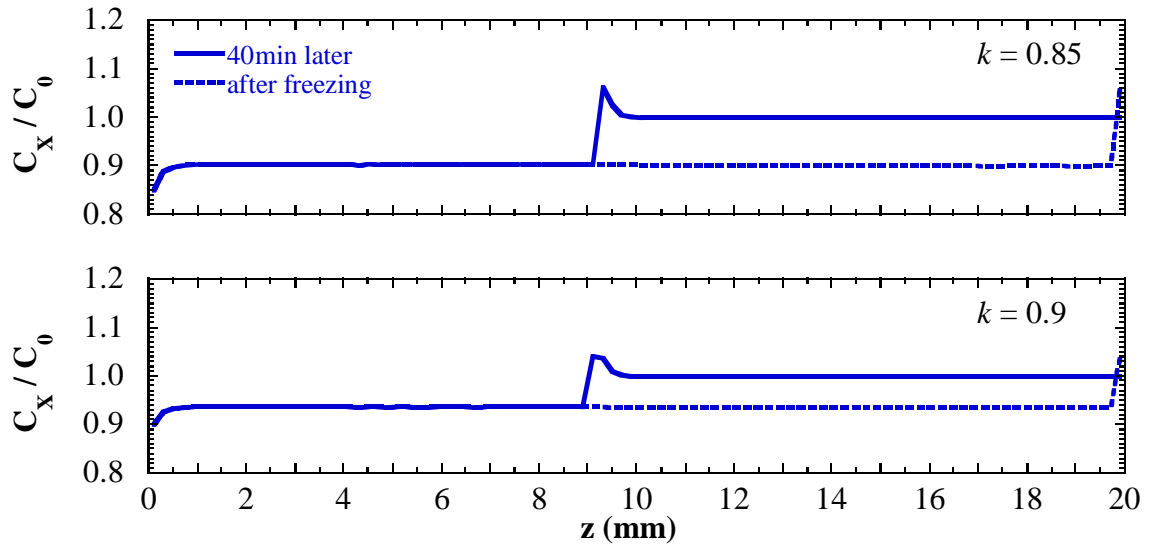


Fig. 5.24 Extracellular concentration profiles after 40 min of cooling and after freezing.

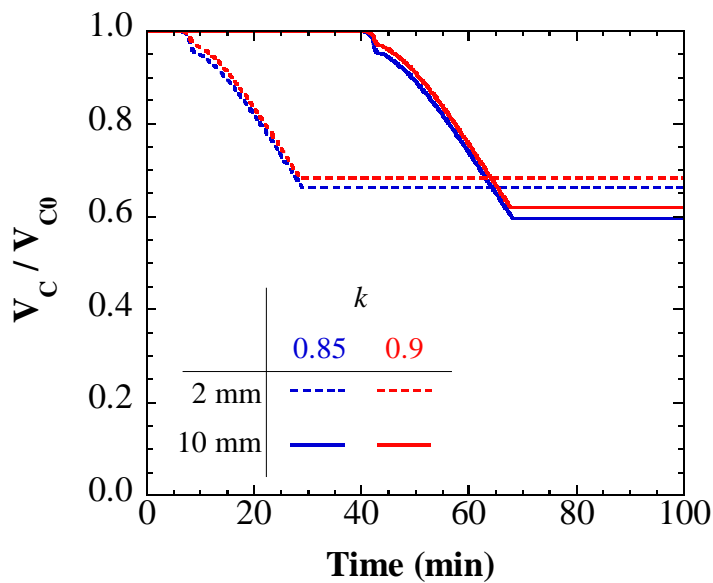


Fig. 5.25 Effects of partition coefficient on cell shrinkage.

5.5 結論

本章では、二重セルモデルに細胞内核生成理論を適用し、細胞外氷晶と細胞内過冷却水との間での蒸気圧差に基づく水分輸送機構を導入した。そして、魚肉組織の冷凍特性について一次元数値解析を行い、細胞収縮と細胞ダメージとの関連について調査した結果、以下の結論を得た。

- (1) 蒸気圧差による水分輸送量は浸透圧差による輸送量よりも多い。また、蒸気圧差に基づく水分輸送によって、細胞内液は細胞外に比べて高張な状態で凍結する。
- (2) 冷却速度が小さいと細胞内液が過冷却状態にある領域が広くなるため、過度の細胞脱水による塩害に注意する必要がある。
- (3) 予備脱水の影響で凍結前に細胞が収縮してしまうが、脱水の有無で凍結後の細胞サイズに差がないため、予備脱水を用いた凍結時間短縮による氷晶成長抑制を優先すべきである。
- (4) 冷凍過程における過度の細胞収縮が解凍後の組織復元を弱めることから、膜透過率が大きい組織には急速凍結を施して細胞脱水を最小限にする必要がある。また、膜透過率が大きくなると細胞内核生成温度が減少する傾向にあるため、細胞内の氷晶成長が抑制される。
- (5) 異なる分配係数（0.85 と 0.9）で冷凍特性を評価した結果、細胞外液の固液界面における溶質掃出しに違いが見られたが、用いた分配係数による細胞収縮への影響は小さい。

第 6 章

凍結魚肉組織の解凍過程における水分の再結晶化

6.1 緒言

第 2 章では、サバとタイを同じ条件下で凍結させて緩慢解凍したところ、タイの組織内部には再結晶化による損傷が発生したことについて述べた。そして、魚種による水分量の差異が影響していると考えると同時に、その再結晶化メカニズムを次のように推察した。緩慢解凍は水分再吸収の時間を長くするため、組織内への水分流入による凝固点上昇が生じ、昇温過程における組織内での再結晶化の可能性が高まる。この推察を踏まえると、再結晶化の発生形態の一つである melt/refreeze が損傷要因として思い浮かぶ。melt/refreeze は、温度の上下変動がある場合に現れる発生形態である。温度が上昇した際に氷の一部が融解する。その際、比較的小さな氷晶は消失して水となる。次に温度が降下した際、相平衡に従って、凍結濃縮相の水が残存していた氷晶上で再び結晶化する過程が melt/refreeze である (Sun, 2006)。

そこで、タイの組織内部で発生した再結晶化が melt/refreeze に起因する現象であるかを検証するために、二重セルモデルを用いた解凍過程の一次元熱・物質移動数値解析を行うことにする。

6.2 想定される再結晶化プロセス

Fig. 6.1 は、冷凍・解凍過程における細胞挙動と想定している再結晶化プロセスの概略図である。凍結の進行にともない、細胞外マトリックスと浸透圧平衡にある細胞において、浸透圧差・蒸気圧差による細胞脱水が生じる。このとき、蒸気圧差による輸送量が多いため細胞内液の方が高張状態となる。細胞内核生成後には蒸気圧差による水分輸送もなくなり、細胞内外液の濃度が一定となるので融点（あるいは凝固点）も変化しない。解凍が始まると、高張状態にある細胞内液が先に融解する。その後、

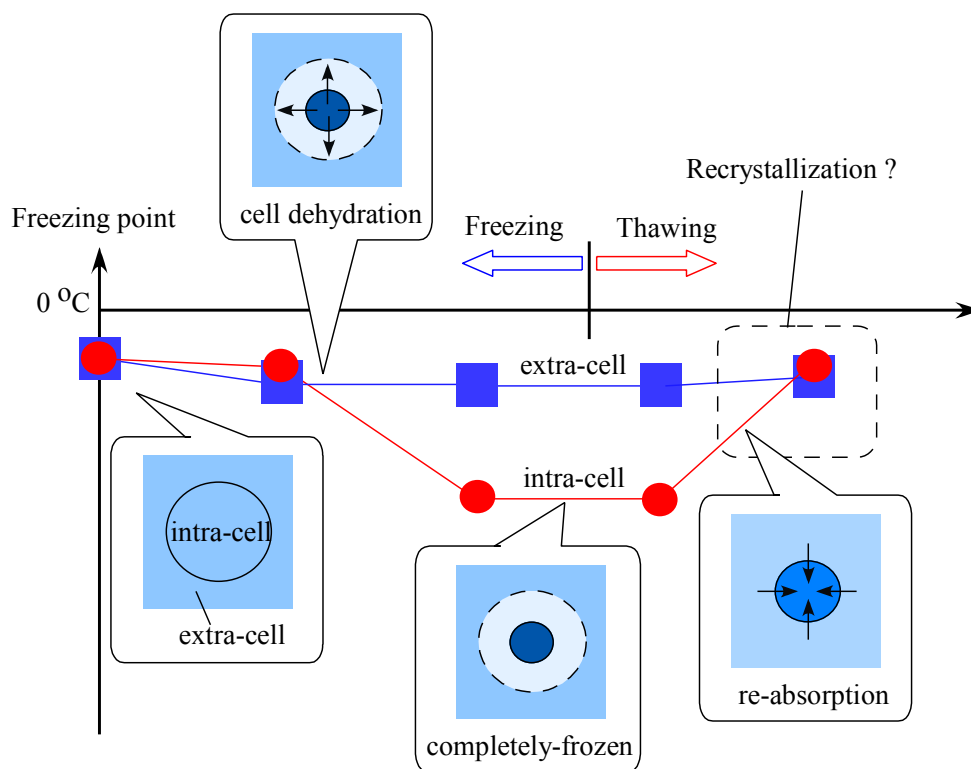


Fig. 6.1 Schematic of assumed-recrystallization process.

細胞外液の融解とともに細胞の水分再吸収が起こる。この水分再吸収によって、細胞内液の濃度が急激に低下して融点が上昇する。解凍が遅いと、融点上昇時に過冷却状態が生じ、再結晶化する可能性がある。

6.3 解凍過程の数値解析方法

本論文第5章で示した修正二重セルモデルを使用する。冷凍過程では固液界面における溶質掃出しを考慮したが、解凍過程では完全に液相となったコントロールボリューム同士での物質拡散のみを考慮する。冷凍時に蒸気圧差で輸送された濃度0 wt.%の氷層は、細胞外氷晶と共に融解するものとし、解凍時には浸透圧差に基づいて膜輸送される。温度場、固相率およびPIFは第5章と同様の方法で求められるため、本章では数値解析方法に関する詳細な説明を省略する。

6.4 計算条件

緩慢解凍条件下での解凍過程を考える。Fig. 6.2 に示すように、冷凍過程と同様の

解析対象（初期温度 T_0 ）において，雰囲気温度 T_{air} での熱伝達により片側から加熱，他方に対称境界条件（断熱）を仮定する．主要な計算条件を Table 6.1 に示す．濃度と細胞サイズの初期条件は，冷凍過程の計算結果に基づいて決定される．ここで，初期条件として用いられる冷凍過程の計算結果（細胞内外濃度，細胞収縮率）を Fig. 6.3 に示す．冷凍過程における計算条件は第 5 章 Table 5.1 と同様で，数値解析パラメータに関しては雰囲気温度 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ ，NaCl の液中での拡散係数 $1.0 \times 10^{-9}\text{ m}^2/\text{s}$ ，分配係数 0.9，膜透過率 $1.0 \times 10^{-11}\text{ m}^3/(\text{N}\cdot\text{s})$ ，初期細胞占有率 0.7 として解析を行った．

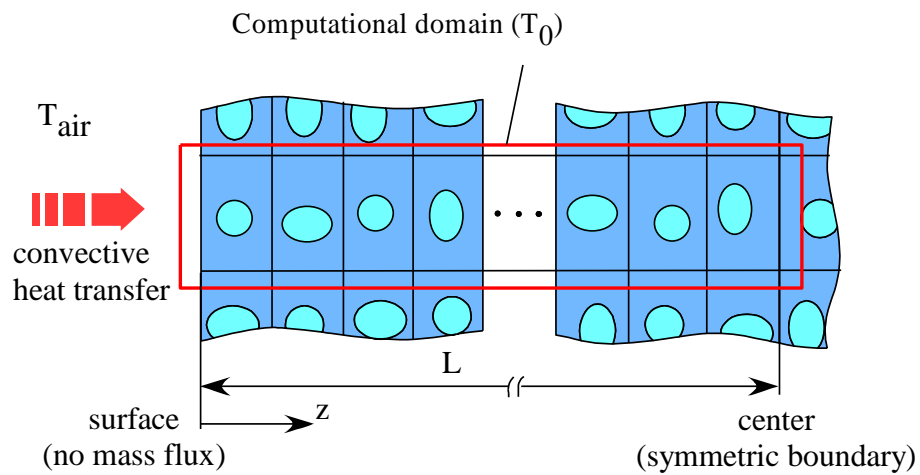
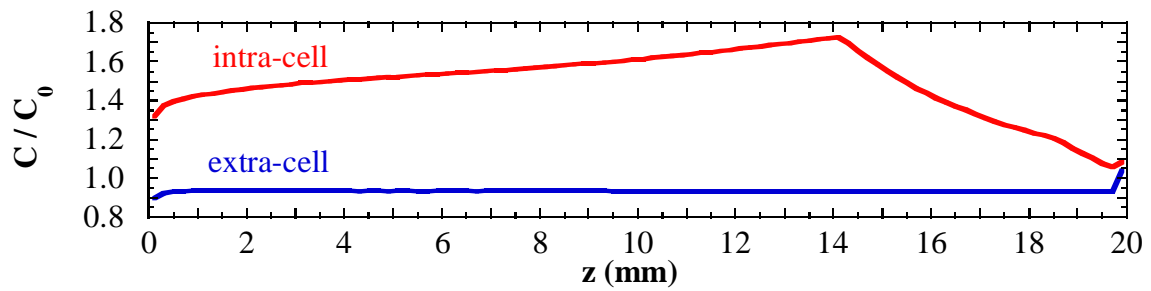


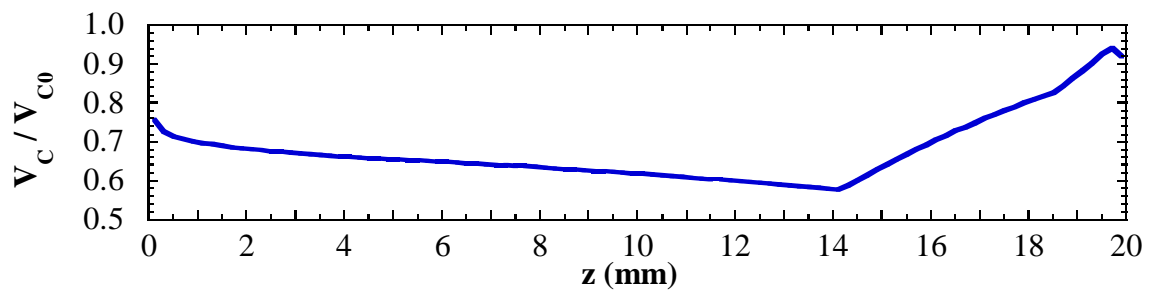
Fig. 6.2 Simulation system for heat and mass transfer in thawing process.

Table 6.1 Calculation conditions.

Thickness	L	20.0	[mm]
Initial temperature	T_0	-25.0	[$^\circ\text{C}$]
Ambient temperature	T_{air}	10.0	[$^\circ\text{C}$]
Heat transfer coefficient	h	20.0	[W/($\text{m}^2\cdot\text{K}$)]



(a) Intracellular and extracellular concentration.



(b) Cell shrinkage.

Fig. 6.3 Initial concentration and initial cell shrinkage profiles in thawing process.

6.5 解析結果と考察

6.5.1 温度，細胞内外濃度および細胞サイズの時間変化

加熱表面から 2, 6, 10 mm での解凍過程における細胞内外液の濃度，温度および細胞サイズの時間変化を Fig. 6.4~6.6 に示す．Fig. 6.4 は冷凍前の濃度（0.9 wt.%）で無次元化した値を縦軸にとっており，Fig. 6.6 についても冷凍前の細胞の大きさとの比を縦軸にとっている．細胞内外液の濃度と細胞の大きさについては，冷凍後の状態を解凍過程の初期条件として与えているため，各位置で異なる値となっている．温度履歴から，解凍過程では融点まで昇温し，融解している間は温度が一定となる．濃度の時間変化を見ると，細胞内外がどちらも液相となった時に，各位置で濃度変化が生じていることがわかる．その濃度変化が生じた時刻には細胞内濃度が減少するとともに細胞外濃度が上昇していることから，Fig. 6.6 に示すように，浸透圧差によって細胞内への水分流入が起きて細胞が復元する．

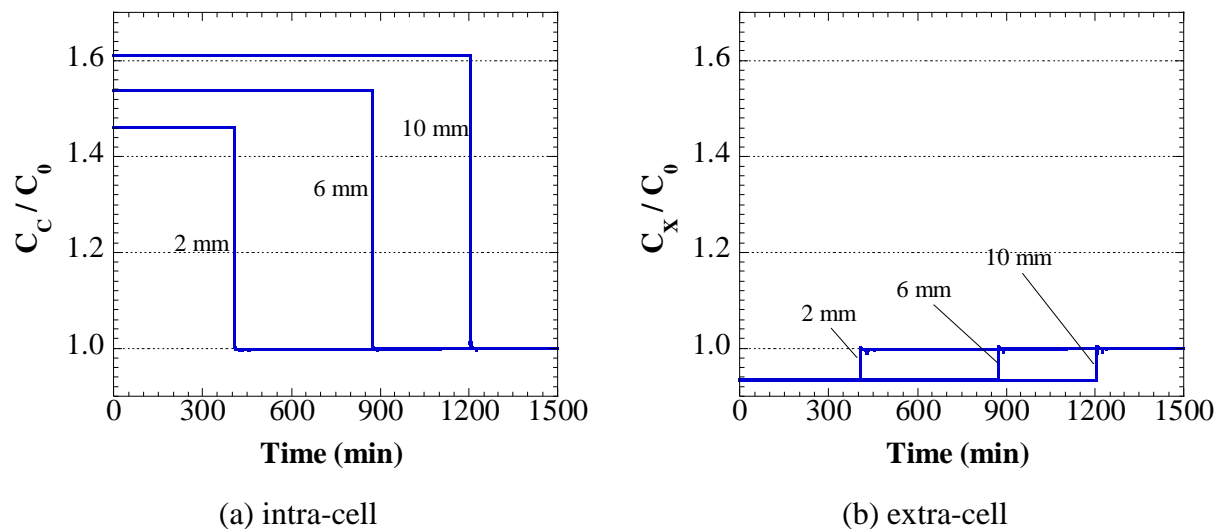


Fig. 6.4 Concentration-time curves in thawing process.

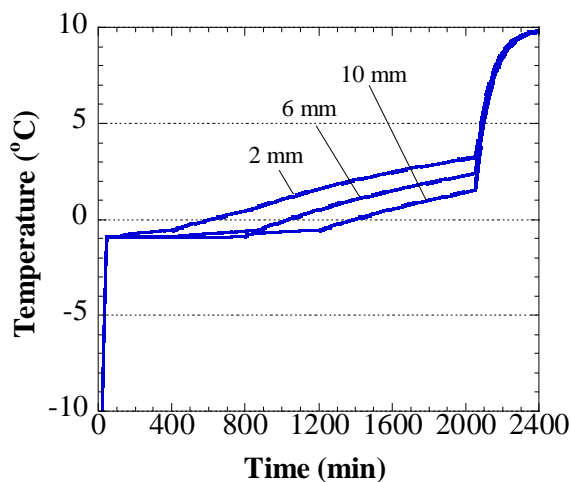


Fig. 6.5 Thermal histories in thawing process.

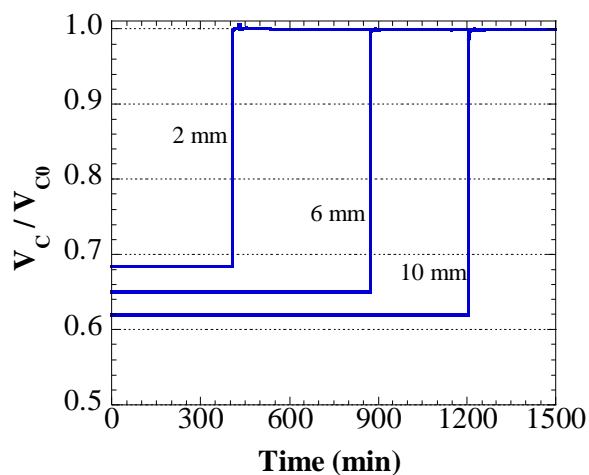


Fig. 6.6 V_c/V_{c0} vs. time in thawing process.

6.5.2 細胞内外液の固相率，濃度および温度分布

解凍開始 90 分後，300 分後，1200 分後の細胞内外の固相率，濃度および温度分布を Fig. 6.7~6.9 にそれぞれ示す．白黒のカラーマップが固相率分布であり，白が融解した部分，黒が凍結部分を表している．固相率分布の下のグラフが細胞内外の濃度分布であり，濃度分布は初期濃度によって無次元化した値を縦軸にとっている．各図の固相率分布からわかるように，細胞外は解凍開始から一方向に融解しているのに対し，細胞内では中心側に融解部分が見られる (Fig. 6.8 (a))．これは，高張状態で凍結した細胞の融点が低くなることに起因している．Fig. 6.8 の(b)の位置では細胞内液が先に融解するが，細胞外液が凍結しているため濃度は変化しない．細胞内外が両方とも液相である Fig. 6.8 の(c)のように細胞内濃度の低下に伴って融点が上昇する場合，解凍が遅いと再結晶化する可能性がある．

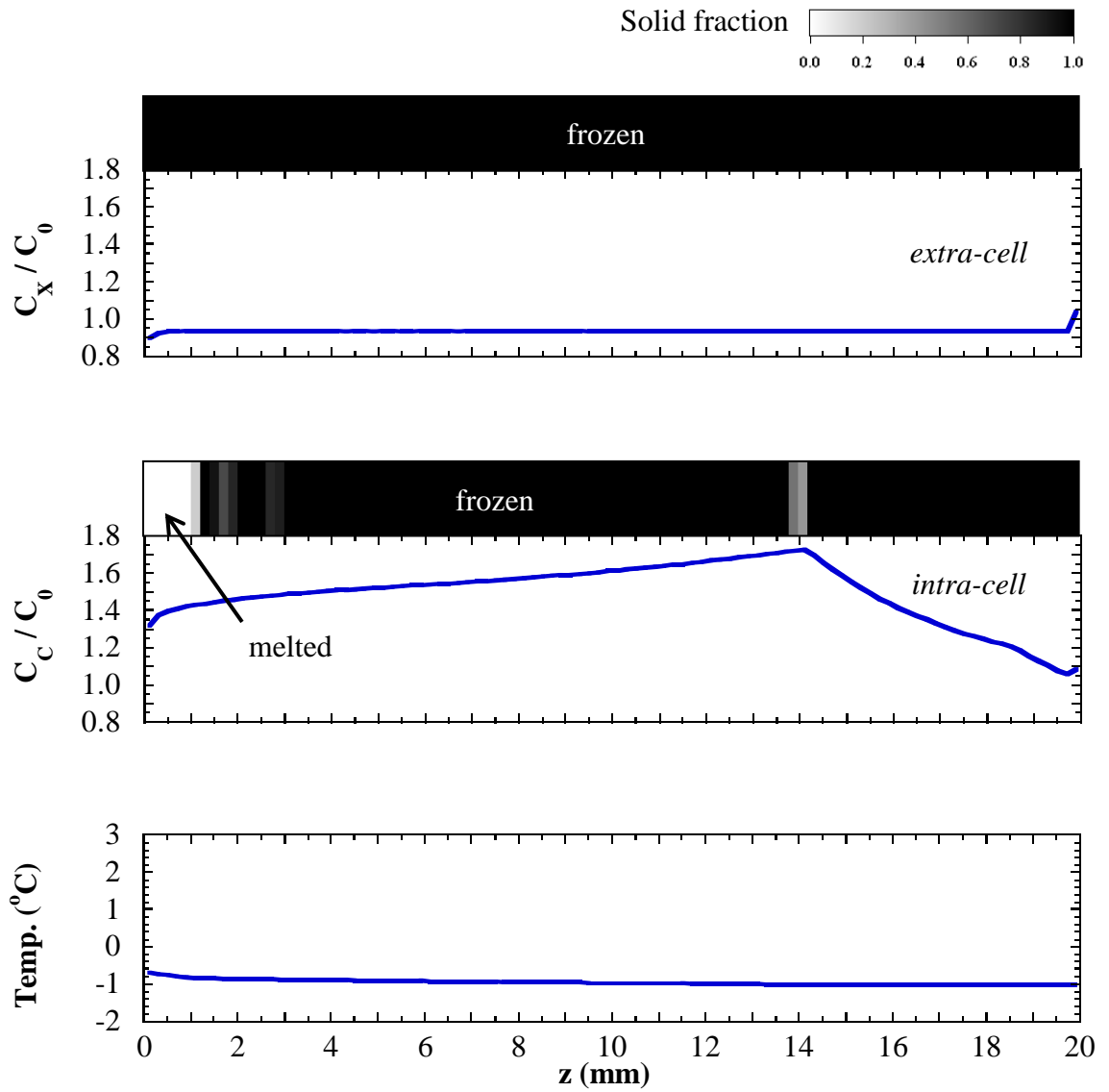


Fig. 6.7 Solid fraction, concentration and temperature profiles in thawing process (90 min later).

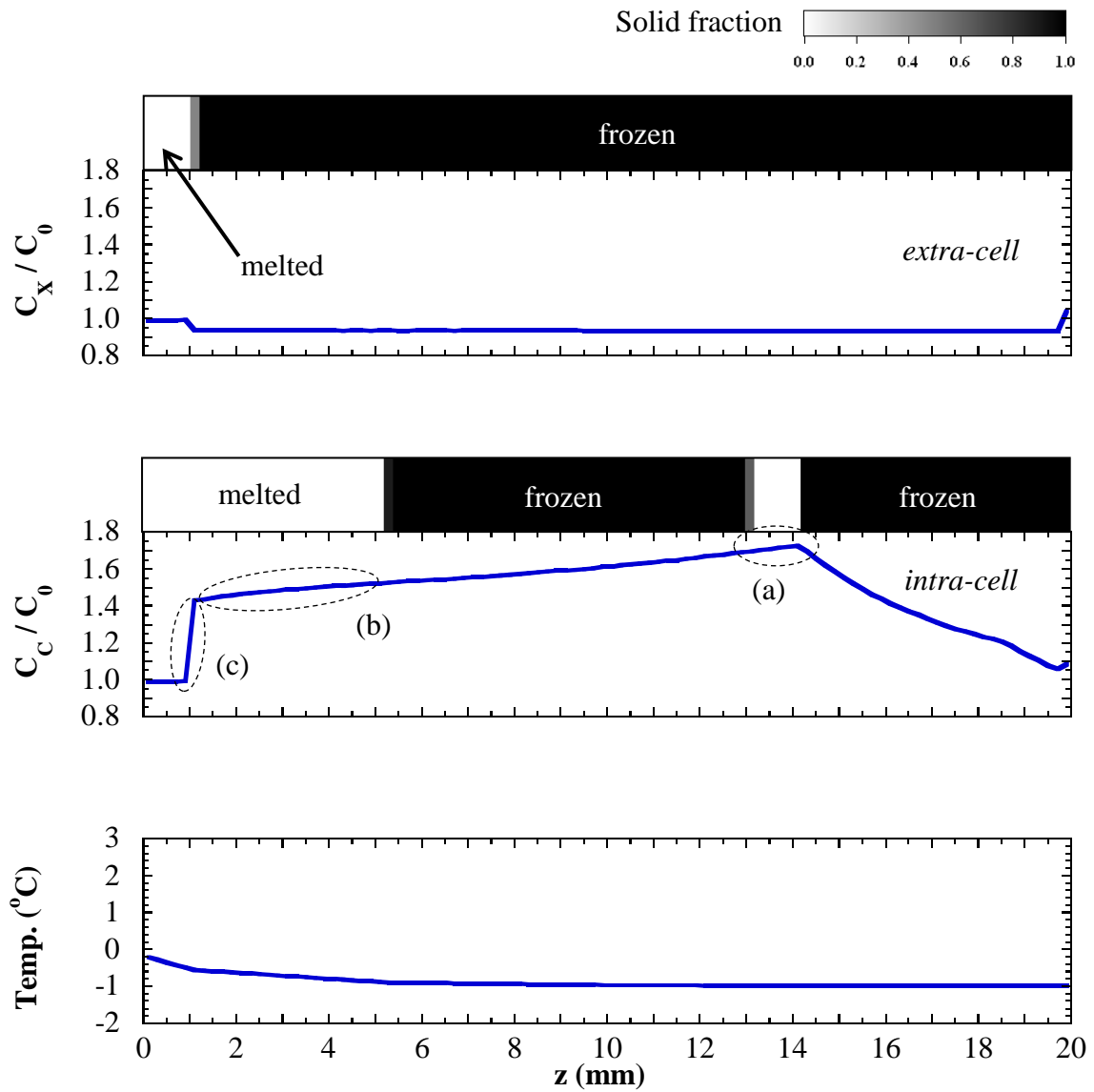


Fig. 6.8 Solid fraction, concentration and temperature profiles in thawing process (300 min later).

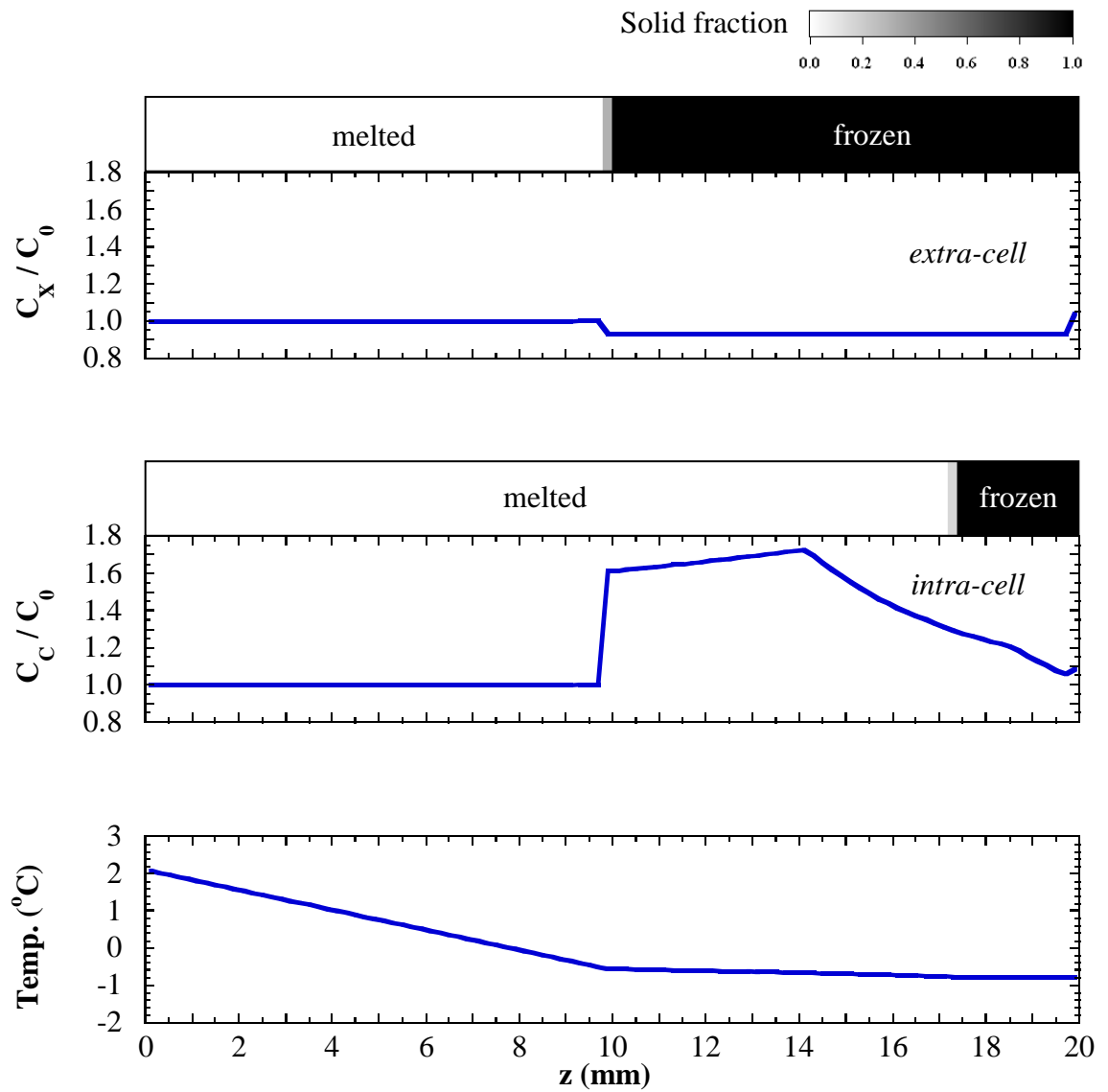


Fig. 6.9 Solid fraction, concentration and temperature profiles in thawing process (1200 min later).

6.5.3 解凍時再結晶化の検証

加熱表面から 2 mm と 10 mm に位置する細胞について、解凍時再結晶化の検証を行った結果を Fig. 6.10 a, b に示す。左軸に細胞内固相率と細胞内核生成確率 PIF，右縦軸に温度と細胞内液の融点をとっており、時間に対してプロットしている。時間に沿って説明すると、まず、コントロールボリューム内の温度が細胞内液の融点まで昇温する。そこから細胞内液が融解するまで平衡状態となり、融解後に再び昇温し始める。その後、細胞外液の融点に達して融解が進行すると、細胞膜を介した水分輸送が起こる。この時点では細胞外液よりも細胞内液の方が高張状態にあるため、細胞内へ水分が流入して細胞内濃度が低下した結果、細胞内液の融点が上昇する。しかし、細胞内液の融点よりも場の温度が高くなっているため、過冷却状態になっていないことが Fig. 6.10 からわかる。細胞内液の過冷却状態が細胞内核生成の必要条件の一つであることから、図中の PIF の値に上昇している様子は見られない。

ここで、第 5 章での冷凍過程の解析結果を含めて考察してみる。Fig. 5.23 に示したように、冷凍過程において細胞内核生成が生じなかった温度帯では、解凍過程においても氷核が形成される条件を満たすとは考え難い。したがって、melt/refreeze に基づいて本章で想定された解凍時再結晶化プロセスは起こり得ない現象と考えられる。そうすると、本論文第 2 章で確認したサバとタイとの解凍後組織損傷の差異について再度考察する必要がある。再結晶化自体は凍結貯蔵中にも起こり得る現象であり、結晶の表面自由エネルギーが自発的に減少する結果として進行する形態が有力となっている。第 2 章の Fig. 2.11 に示した凍結組織の顕微鏡写真において、確認できない小さな氷晶が組織内部に形成されているとすれば、緩慢解凍中に氷晶成長速度が大きい温度帯で再結晶化が起こり、組織内部で氷晶が肥大化する可能性がある。予備脱水を施したタイで再結晶化による組織内部の損傷が減少した要因は、組織内部に微細氷晶が形成されなかった、あるいは解凍時の氷晶成長が比較的遅かったためと推察される。本章で取り扱った二重セルモデルでは氷晶成長が考慮されていないため、解凍時再結晶化を数値解析によって再現するには氷晶成長機構を含むモデルを構築する必要がある。

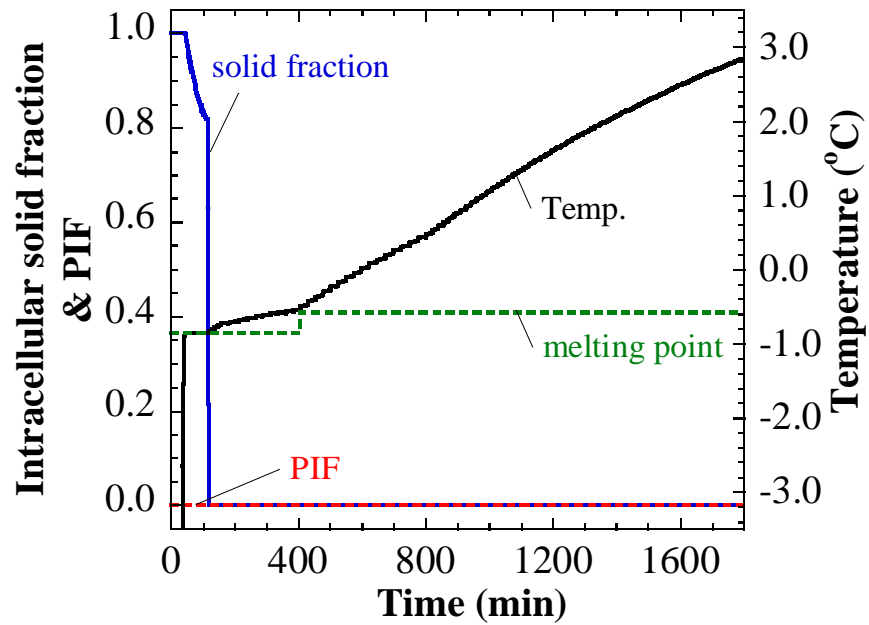
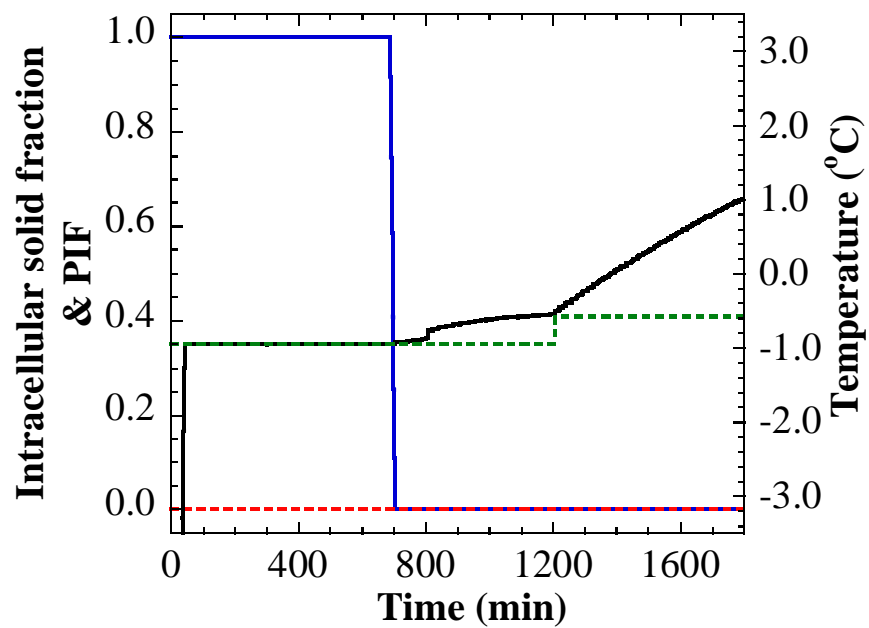
(a) $z = 2$ mm(b) $z = 10$ mm

Fig. 6.10 Verification of recrystallization of intracellular water in thawing process ($z = 2, 10$ mm).

6.6 結論

タイ組織内部で発生した再結晶化が melt/refreeze に起因する現象であるかの検証を目的とし、二重セルモデルを用いた解凍過程の一次元熱・物質移動数値解析を行った結果、以下の結論を得た。

- (1) 冷凍過程で細胞内核生成が生じない温度帯では解凍過程でも核生成が起こらない。それ故に、melt/refreeze に基づいて想定された解凍時再結晶化プロセスは起こり得ないと考える。
- (2) (1)のことを踏まえ、サバとタイの解凍組織に見られた損傷の差異は、氷晶の表面自由エネルギーが自発的に減少することで生じる氷晶成長の結果であると推察する。
- (3) 本論文で提案している二重セルモデルには氷晶成長が考慮されていないため、解凍時再結晶化を再現するには氷晶成長機構を含むモデルの構築が必要となる。

第 7 章

組織細胞内における氷晶成長速度の実験評価

7.1 緒言

本論文第 6 章では、二重セルモデルを用いた解凍過程の一次元数値解析を行うことによって、細胞内での再結晶化が melt/refreeze に起因するかの検証を行った。その結果、融解した細胞内水分が核生成を起こして結晶化するという再現結果は得られず、解凍時再結晶化が氷晶成長に起因するという考えに至った。それ故に、組織内氷晶の成長状態を把握することは、解凍時組織損傷のメカニズムを探るためにも重要と考えられる。また、第 2 章では予備脱水によって組織内部の損傷を軽減できることが確認されたため、氷晶成長に対する含水率の影響を検証する必要がある。これまでに、食品・生体をターゲットにして氷晶成長を評価した研究例はいくつかあるが、水溶液中や凍結魚肉の細胞外氷晶に対して行われているものが多く（高井ら, 1997; Hagiwara et al., 2002; 小城ら, 2006）、細胞内部に形成された氷晶に関してはほとんど評価されていない。そこで本章では、タマネギ表皮組織における細胞内水分の核生成から氷晶成長までを顕微鏡観察し、氷晶成長への含水率の影響について検討を行う。

7.2 タマネギ表皮組織における凍結挙動の顕微鏡観察実験

7.2.1 供試試料

供試試料として使用するタマネギ球根部の表皮組織は、Fig. 7.1 に示すような厚み $\sim 90 \mu\text{m}$ の単層構造であるため観察試料に適している。また、細胞の大きさが $50\sim 800 \mu\text{m}$ と細胞内部を観察するのに十分な大きさであることも選択理由となる。観察試料の準備方法を以下に示す。

まず、タマネギ球根部の中央から剥離された表皮組織を $3 \times 3 \text{ cm}^2$ のサイズにカットする。予備脱水の効果に着目するため、カットされた組織に自然乾燥（気温 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 、

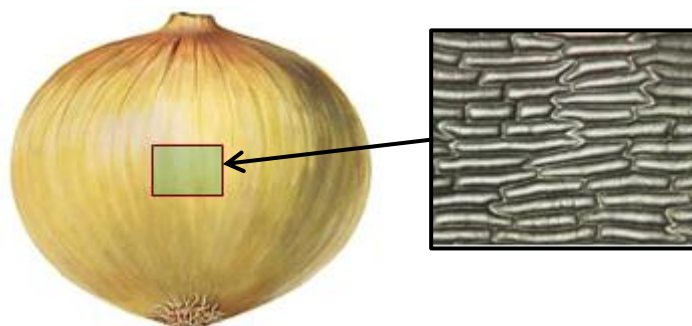


Fig. 7.1 Typical onion epidermal tissue in an inner skin of white onion bulb.

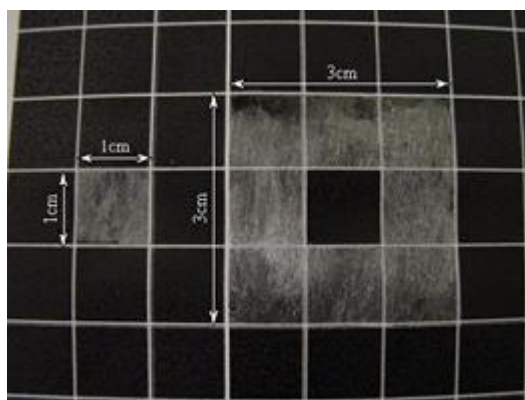


Fig. 7.2 Size of prepared tissues. Right: $3 \times 3 \text{ cm}^2$ before pre-dehydration. Left: $1 \times 1 \text{ cm}^2$ after pre-dehydration.

湿度 60 %) を施すことで脱水試料を用意し，未脱水試料ならびに脱水試料の中央部から切り出された $1 \times 1 \text{ cm}^2$ の切片を観察試料とした (Fig. 7.2 参照). ここで， $3 \times 3 \text{ cm}^2$ の組織を自然乾燥させた際の含水率時間変化を Fig. 7.3 に示す. 縦軸の含水率は乾量基準値をとっており，試料質量を絶乾時の質量で除したものである. 初期含水率は $\sim 7.0 \text{ g/g-dry}$ で，乾燥が進行するにつれて含水率が減少し，60 分後にはほぼ一定値となる. 本実験では組織を約 15 分間自然乾燥させて，含水率 3.5 g/g-dry の脱水試料を準備した.

7.2.2 実験装置および実験方法

細胞内氷晶の成長過程を観察するため，温調可能な顕微鏡用加熱冷却ステージ (Linkam 10008) を用いた顕微鏡観察実験を行う. Fig. 7.4 は観察システムの概略図であり，試料の加熱と冷却はステージ上で行われ，ハイスピードカメラで透過光観察映

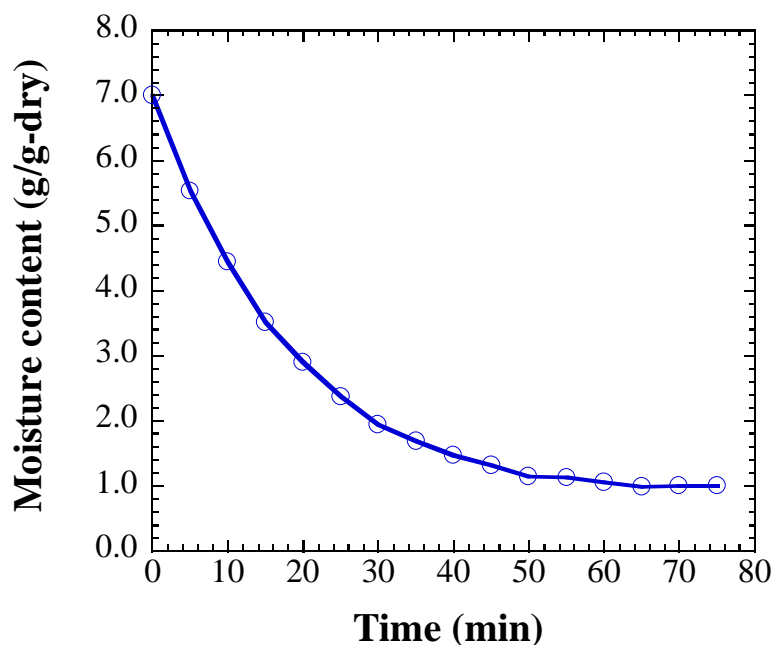


Fig. 7.3 Dehydration rate of onion epidermal tissue ($3 \times 3 \text{ cm}^2$) by natural air drying (25°C , 60 %RH).

像を記録しながら実験を行う。加熱と冷却は、液体窒素とヒーターで試料を静置する銀ブロックの温度を調節することによって行われる。解凍時氷晶成長に影響を及ぼす因子としては、組織中の水分量に加えて冷凍後の氷晶サイズが挙げられる。そこで、細胞内氷晶が急速凍結によって微細化された状態と、緩慢凍結によって粗大化してしまっただ状態との比較を行う。Fig. 7.5 a, b は、急速凍結（冷却・加熱速度 $50^\circ\text{C}/\text{min}$ ）と緩慢凍結（冷却・加熱速度 $1^\circ\text{C}/\text{min}$ ）のステージ温度制御図をそれぞれ示している。カバーガラスで挟んだ観察切片を 2°C に保たれたステージ上に設置し、各条件下で冷却した後に急速凍結では -50°C 、緩慢凍結では -15°C で定温保持する。その後、 -9°C まで加熱され、この加熱開始時から観察・記録が行われる。なお、各条件に対して未脱水および脱水試料を 3 サンプルずつ用意した。

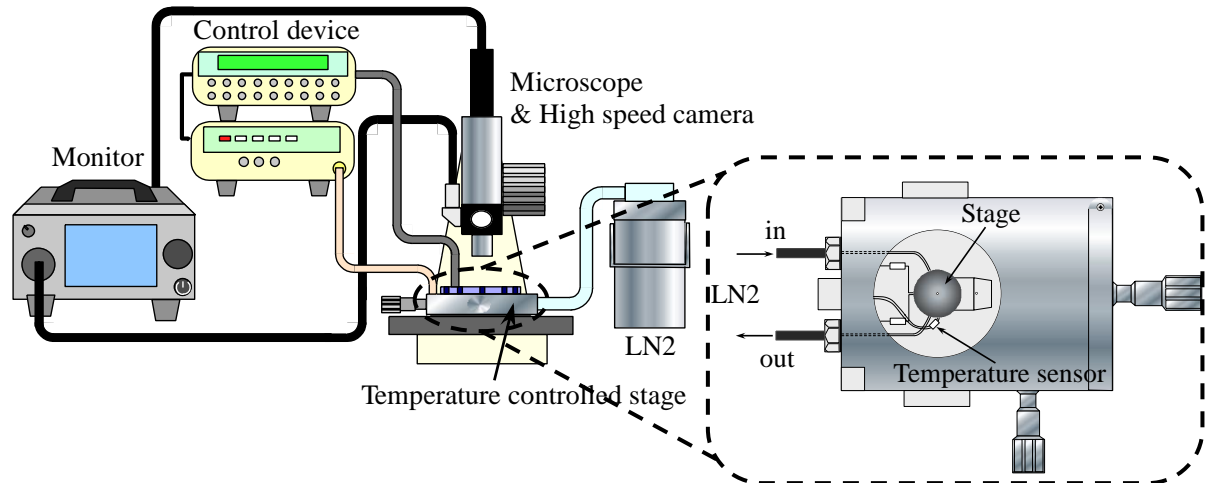


Fig. 7.4 Observation system and temperature controlled stage.

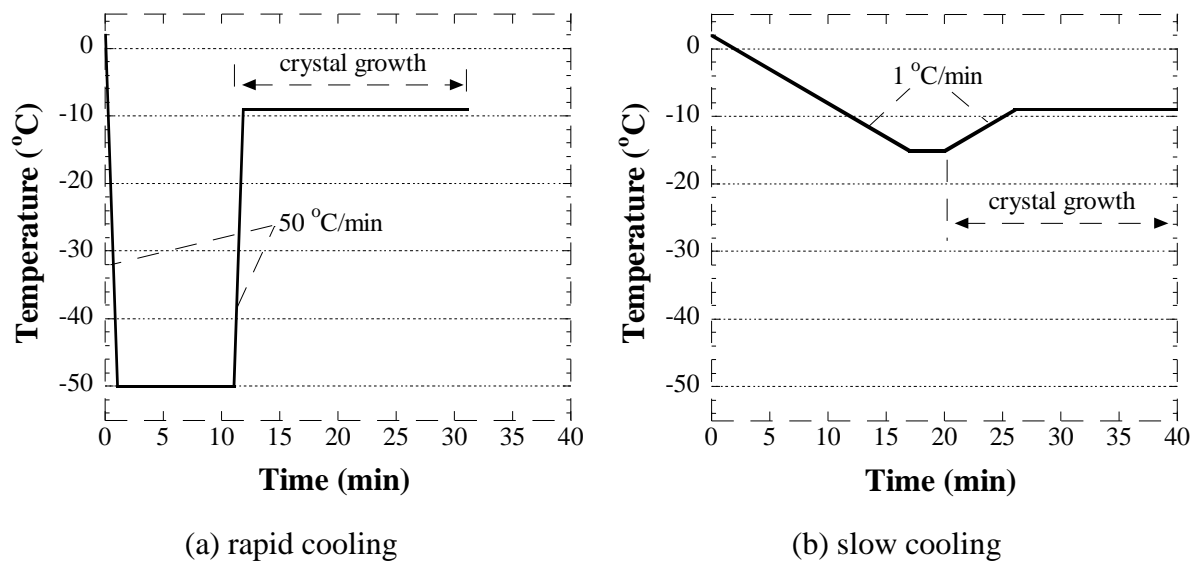


Fig. 7.5 Temperature control of microscope stage.

7.3 氷晶成長状態の評価方法

細胞内水分を確認できる状態まで倍率を上げて観察した顕微鏡写真を Fig. 7.6 に示す。Fig. 7.6 a, b は、初期状態と凍結後の状態をそれぞれ示しており、凍結時には細胞内が暗化して内部の状態を確認できなくなる。組織内氷晶の大きさを評価する場合、100 個程度の氷晶直径を測定して統計処理を行うことが必要となるが、Fig. 7.6 b の状態では不可能と思われる。そこで、氷晶の大きさにより透過光の反射状態が変化することを利用し、成長状態を評価することを考える。細胞内核生成時には *flashing* と呼ばれる凍結挙動が観察されるが、*flashing* では多くの微細氷晶が形成される。そのような微細氷晶が支配的な領域では光の乱反射が過度に生じるため、透過光観察の場合だと細胞内が暗化した画像となる。また、氷晶が成長すると乱反射の度合いが減少するため、暗化していた部分が明るくなる。観察画像から氷晶の成長状態を評価するプロセスを Fig. 7.7 に示す。まず、観察映像から任意の時刻で画像を抽出し、二値化処理を施す。二階調画像から、微細氷晶が存在している黒色部の占有面積を求め、面積割合を算出してその時間変化を評価する。

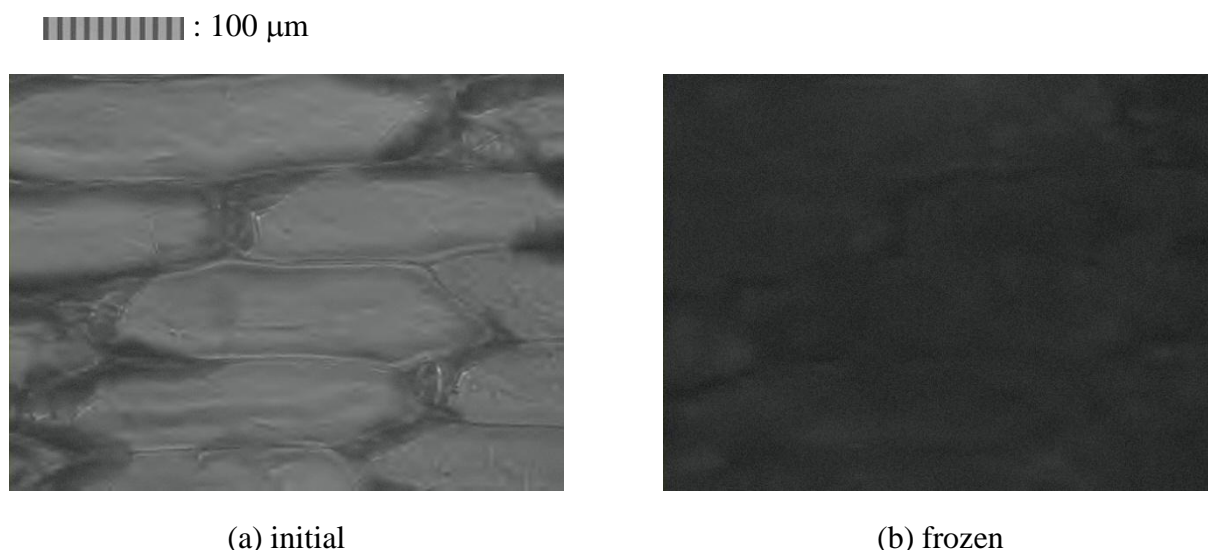


Fig. 7.6 Closeup view of an onion cell.

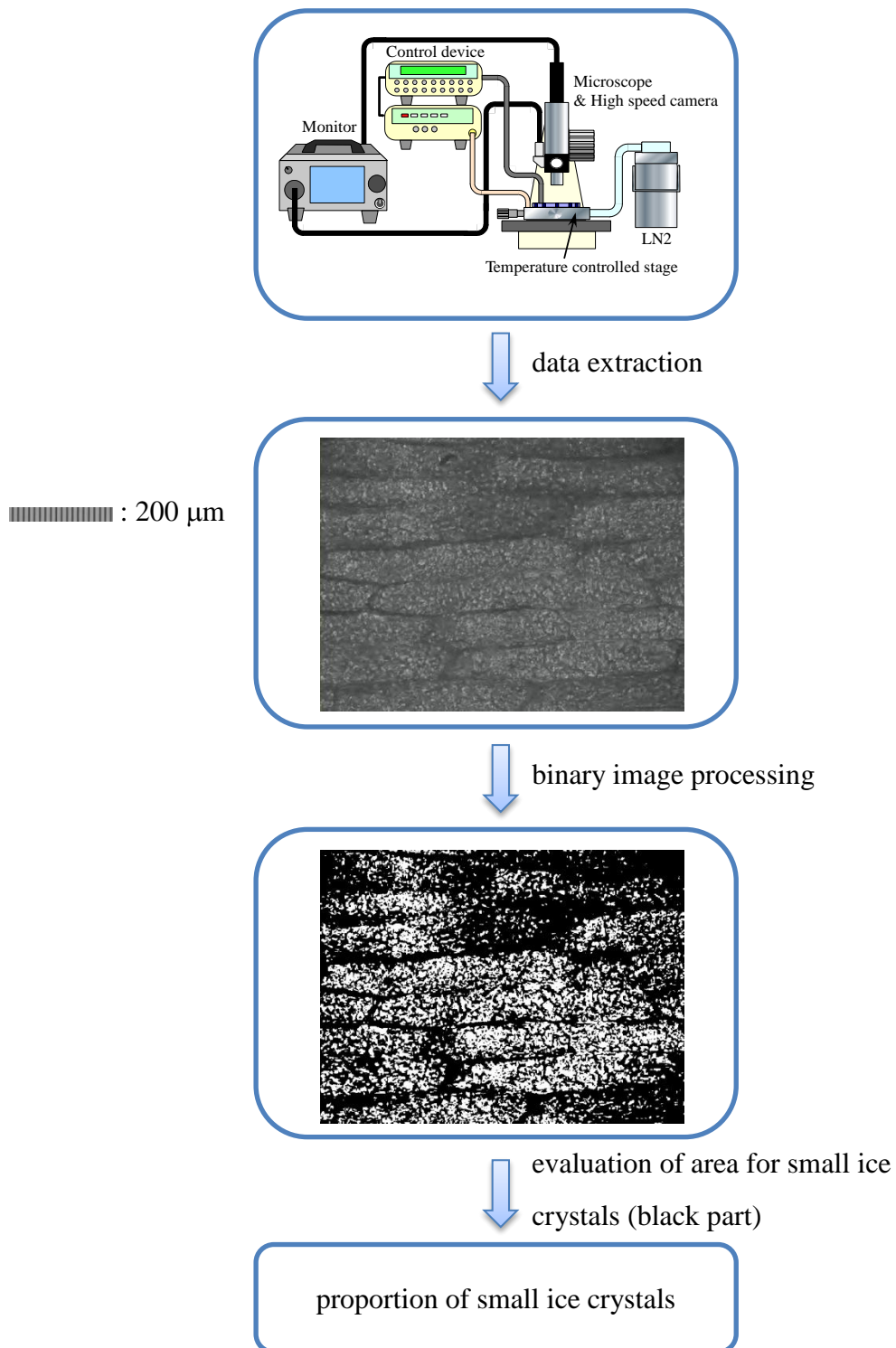


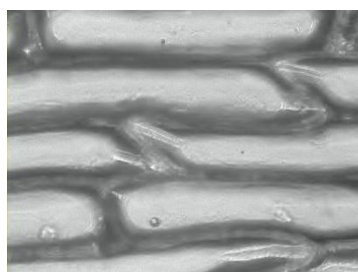
Fig. 7.7 Evaluation method of area for small ice crystals.

7.4 実験結果と考察

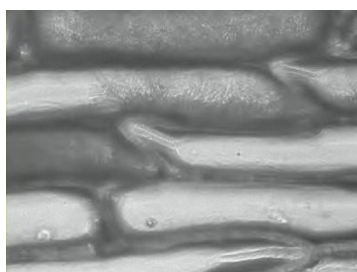
7.4.1 細胞内水分挙動

本実験における細胞内水分挙動の一例として、Fig. 7.5 b に示した緩慢凍結を施した未脱水試料の顕微鏡写真を Fig. 7.8 に示す。各写真にはステージ温度と観察時間 (min:sec) を併記している。Fig. 7.8 b~d からわかるように、 $-11\text{ }^{\circ}\text{C}$ 付近で細胞内核生成が生じ、細胞毎に flashing を起こしながら凍結している様子が確認される。加温過程の観察写真である Fig. 7.8 f~i では、暗化していた部分が徐々に明るくなっているこ

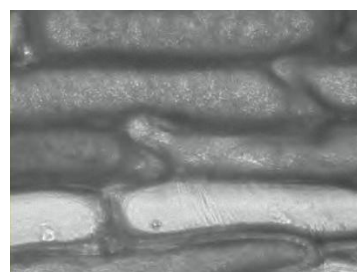
■■■■■■■■ : 200 μm



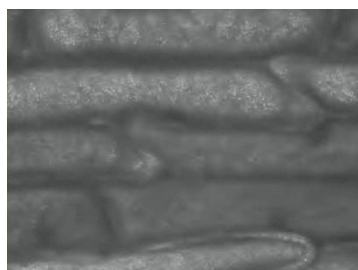
(a) $2.00\text{ }^{\circ}\text{C}$ (00:00)



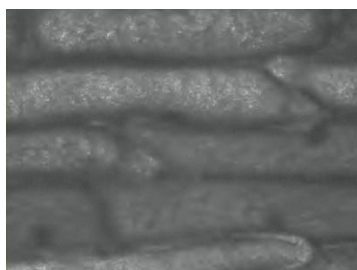
(b) $-10.65\text{ }^{\circ}\text{C}$ (12:39)



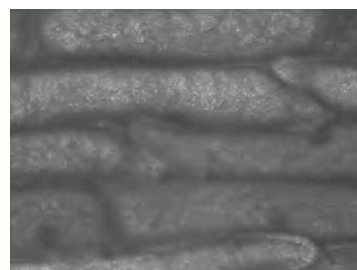
(c) $-10.70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (12:42)



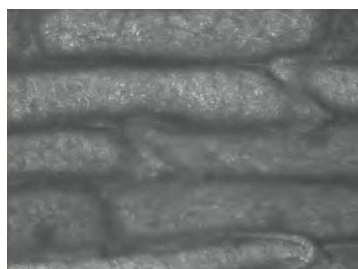
(d) $-10.75\text{ }^{\circ}\text{C}$ (12:45)



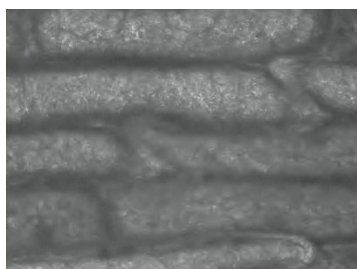
(e) $-15.00\text{ }^{\circ}\text{C}$ (20:00)



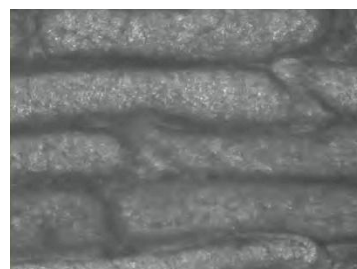
(f) $-11.00\text{ }^{\circ}\text{C}$ (24:00)



(g) $-9.00\text{ }^{\circ}\text{C}$ (28:00)



(h) $-9.00\text{ }^{\circ}\text{C}$ (32:00)



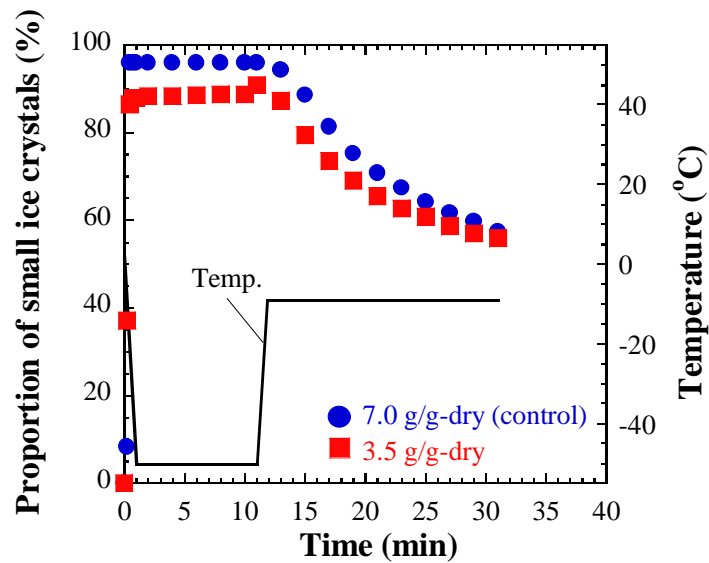
(i) $-9.00\text{ }^{\circ}\text{C}$ (40:00)

Fig. 7.8 Photomicrographs of an onion epidermal tissue. (a)~(e): cooling process. (f)~(i): heating process.

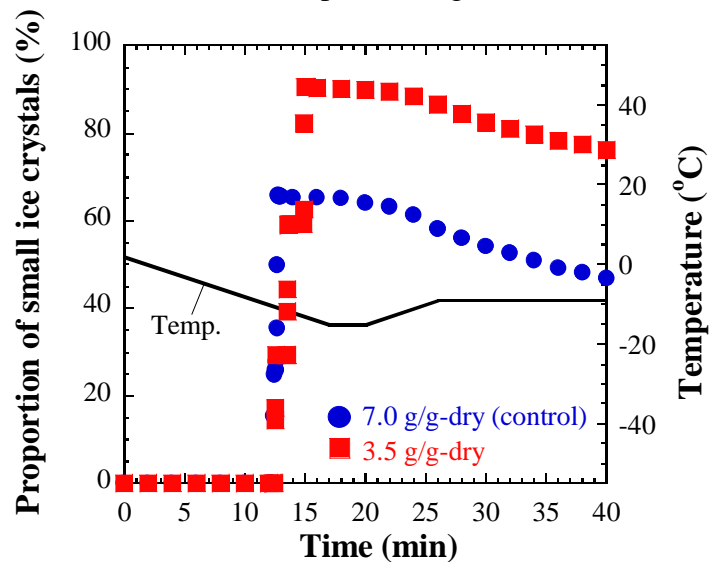
とがわかる。これは、細胞内の氷晶が融合・成長を繰り返してより大きな氷晶へと変化していることを示している。この一連の流れは、急速凍結条件においても確認された。

7.4.2 細胞内氷晶の成長

細胞内氷晶の成長状態を確認するために、未脱水および脱水試料中に微細氷晶が占める面積割合の時間変化を評価した結果が Fig. 7.9 である。左軸に微細氷晶が占める面積割合、右軸に試料温度をとっており、異なる冷却速度での結果をそれぞれ示して



(a) rapid cooling



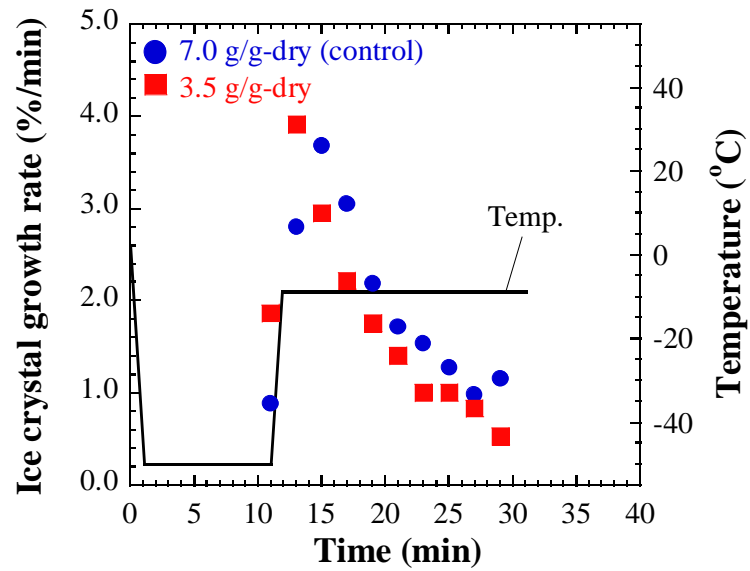
(b) slow cooling

Fig. 7.9 Proportion of small ice crystals and temperature vs. time.

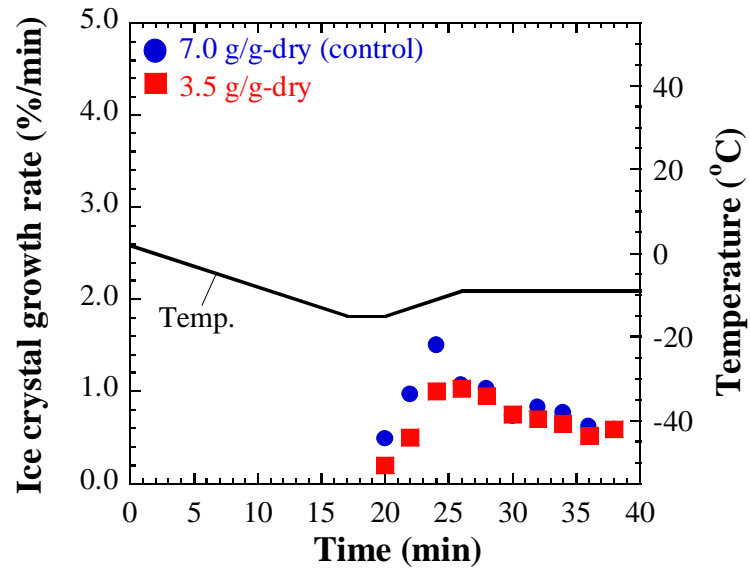
いる。まず、細胞内氷晶の発生から成長までの変化について、Fig. 7.9 b を用いて説明する。冷却開始から約 12 分後に細胞内核生成が生じ、暗化した細胞が瞬時に増加する。-15 °C で保持されている間は微細氷晶の面積割合にほとんど変化がなく、加温過程 (20 分後) に入ってから徐々に減少している。急速凍結した場合でも同様の傾向を示しており、融解温度帯に近いところでの氷晶成長が支配的であることを確認できる。また、緩慢凍結を施した試料では予備脱水の有無による明確な差が面積割合に表れており、Fig. 7.9 a, b を比較すると、予備脱水によって冷却速度に関わらず微細な氷晶が形成されていることがわかる。

7.4.3 細胞内における氷晶成長速度

Fig. 7.9 に示した微細氷晶の面積割合の時間変化における 2 点間の傾きを氷晶成長速度と定義し、脱水の有無および急速・緩慢凍結の差異について再度考察する。加温過程における氷晶成長速度を観察時間に対してプロットしたものが Fig. 7.10 である。左軸に氷晶成長速度、右軸に試料温度をとっており、異なる冷却速度での結果をそれぞれ示している。どちらの冷却速度においても、氷晶成長速度が急激に増加してから減少に転じており、氷晶成長速度の極大値が存在していることがわかる。また、それらの極大値には明らかな差があり、冷却・加熱速度の差異が影響しているものと考えられる。予備脱水の有無に関しては、急速凍結試料では予備脱水によって成長速度が低減されている。緩慢凍結試料については、脱水試料の氷晶成長の方が少しだけ遅くなっている。このことから、解凍過程における氷晶成長の抑制に対しても予備脱水は有効と考えられる。



(a) rapid cooling



(b) slow cooling

Fig. 7.10 Ice crystal growth rate and temperature vs. time.

7.4.4 氷晶成長速度と魚種の違いによる解凍後組織損傷の差異に関する考察

本実験で得られた結果を踏まえ、本論文第2章で示されたサバとタイの解凍後組織損傷の差異について再度考察する。サバとタイを同じ冷凍方法で凍結させて緩慢解凍を施したところ、タイの筋組織内部には氷晶による多くの損傷が観察された。第6章での解析結果からこの損傷が解凍時の氷晶成長に起因する考えに至るとともに、予備脱水試料については損傷が軽減された点を踏まえ、氷晶成長に対する含水率の影響を検証する必要があると判断した。細胞内氷晶の成長速度を評価した結果、異なる含水率で成長速度に違いが見られたため、初期含水率がサバよりも高いタイでは氷晶成長速度が大きいと考えられる。このことから、冷凍時にタイの筋組織内部には小さな氷晶が存在していて、緩慢解凍過程における氷晶成長によって組織内部からの損傷が引き起こされたものと推察する。予備脱水試料の損傷軽減に関しては、脱水によって氷晶成長速度が低減されて、再結晶化による組織内部の損傷が減ったと考えられる。

解凍時における氷晶の成長抑制に備えるだけなら、流水解凍などで解凍を速めれば成長する前に融解温度帯を通過する。しかし、組織内への水分再吸収について第2章で述べたように、サバにおいては緩慢解凍によって再吸収率が高まり、タイにおいては予備脱水量の多い場合に再吸収率が上昇した。解凍時の組織復元には水分再吸収が不可欠で、単純に解凍を速めただけでは十分に復元しない。それ故に、タイのように含水率の多い魚種では予備脱水と緩慢解凍を併用することで、再結晶化による組織損傷を防ぐとともに組織復元も促進されるものとする。

7.5 結論

タマネギ表皮組織における細胞内氷晶成長過程の顕微鏡観察を行い、冷却速度と含水率の氷晶成長速度への影響を検討した結果、以下の結論を得た。

- (1) 融解温度帯での氷晶成長が支配的となっており、解凍過程においても結晶化速度の大きい温度帯を通過する時間が重要となる。
- (2) 緩慢凍結条件下では予備脱水の有無で細胞内氷晶の大きさに明確な違いが表れており、予備脱水によって冷却速度に関わらず微細な氷晶が形成される。
- (3) 低含水率試料では氷晶成長速度が減少したことから、予備脱水は細胞内氷晶の成長抑制に有効である。
- (4) 第 2 章で確認された再結晶化による組織損傷について再度考察すると、(3)から、初期含水率がサバよりも高いタイでは氷晶成長速度が大きく、冷凍時に筋組織内部で形成された微細氷晶が緩慢解凍時に成長したことによって、組織内部からの損傷が引き起こされたものと推察する。

第 8 章

総括

本論文では、食品・生体の冷凍保存を改善するために行われる脱水冷凍法について、その冷凍と解凍過程における組織内の熱・物質移動現象を明らかにするとともに、氷晶による組織損傷機構との関連を調べ、より高品位な冷凍保存を可能にするための冷凍・解凍方法に関する提言を行うことを目的とした。特に、魚種による組織損傷の差異を確認し、二重セルモデルの作成および冷凍過程の数値解析を経て、解凍時の氷晶の再結晶化について詳細に考察している。

第 1 章で研究背景と目的を述べた後、第 2 章では脱水冷凍を施した魚肉組織（サバとタイ）について、解凍速度と魚種による組織損傷の違いを調べ、冷凍・解凍特性との関連を検討した。サバにおいては、緩慢解凍が組織内への水分再吸収に効果的であり、解凍時のドリップが低減されるとともに、予備脱水によってその効果が高まった。一方、タイにおいては、緩慢解凍は組織内部に再結晶化による損傷が発生しやすいものの、脱水量を多くすればそれを抑制できることを確認した。これらのことから、最適な脱水冷凍を考えるには、解凍過程における水分挙動の把握が重要であると結論付けた。

第 3 章では、魚肉組織の冷凍過程における予備脱水の影響を明らかにすることを目的とし、組織内の熱・物質移動を記述するための二重セルモデルを構築し、数値解析を行って実験結果と比較した。温度履歴の比較から、数値解析結果は実験結果に見られる冷却特性を定量的に表現しており、二重セルモデルによる数値解析の有効性が示された。

第4章では、脱水冷凍においてその影響が顕著になると予測される凍結濃縮効果を考慮するため、固液界面における溶質掃出しを記述する溶質の分配係数を実験的に評価した。測定対象には、生体の冷凍保存に関する数値解析で多用されている NaCl 水溶液に加え、第2章で魚種の違いを確認したサバとタイの組織液を選定した。方向性凝固観察法を用いた実験観察によって、溶質分配係数を簡易的に測定できる方法を提案するとともに、初期濃度と分配係数との関係を示した。その結果、NaCl 水溶液（1～5 wt.%）で約 0.90、サバとタイの組織液では 0.89 と 0.84 となった。先行研究の値と比較すると、計測した NaCl 水溶液の分配係数が同程度の値を示しており、本手法の有効性も確認された。

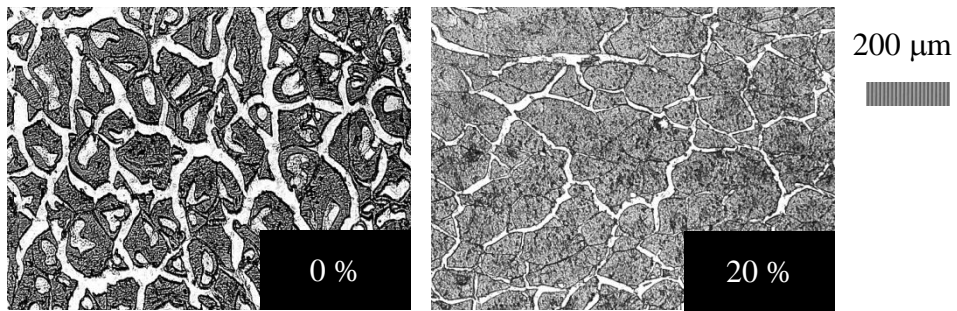
第5章では、第3章で提案した二重セルモデルに、細胞内核生成理論と氷・過冷却水間での蒸気圧差に基づく水分輸送機構を導入した。このモデルを用いて冷凍過程の数値解析を再度行い、細胞収縮と細胞損傷との関係について調査した。蒸気圧差による細胞膜を介した水分輸送量は、凍結濃縮がもたらす浸透圧差による輸送量よりも多く、蒸気圧輸送によって細胞内液が細胞外に比べてより高張な状態で凍結した。予備脱水の影響について見た結果、凍結前に細胞が収縮してしまうが、脱水の有無で凍結後の細胞サイズに差はなく、予備脱水を用いた凍結時間短縮による氷晶成長抑制を優先すべきと考えた。また、第2章の結論を踏まえて魚種の違いに着目した数値解析を行った。膜透過率が大きいと細胞内核生成温度が低下する傾向にあるため、細胞内における氷晶成長が抑制されると考えられる。

第6章では、タイの筋組織内部で発生した再結晶化が melt/refreeze に起因する現象であるかの検証を目的とし、二重セルモデルを用いた解凍過程の熱・物質移動数値解析を行った。第5章に示した冷凍過程の結果を含めて考察すると、冷凍過程で細胞内核生成が生じない温度帯では解凍過程でも核生成が起こらないため、melt/refreeze に基づいて想定した解凍時再結晶化プロセスが起こり得ないと考えた。このことからサバとタイとの解凍後組織損傷の差異は、氷晶の表面自由エネルギーが自発的に減少することで生じる氷晶成長の結果であると考えられる。

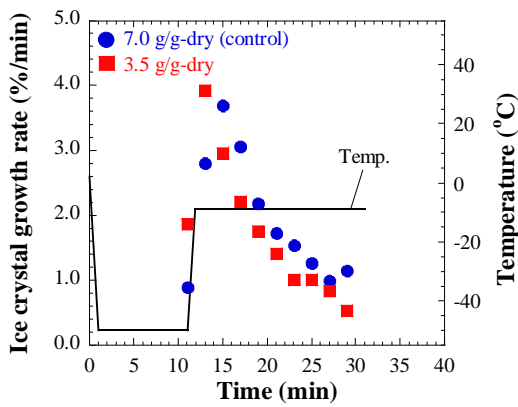
第7章では、第6章での結論を踏まえ、氷晶成長に対する含水率の影響を検証する

必要があると考え、タマネギ表皮組織における細胞内水分の凍結挙動を顕微鏡観察した。氷晶成長を画像解析から評価した結果、融解温度帯での氷晶成長が支配的となっており、解凍過程においても最大氷晶生成帯の通過時間が重要であることを確認した。また、予備脱水試料では氷晶成長速度が減少したことから、細胞内氷晶の成長抑制に対する予備脱水の有効性を示した。第7章での結果を踏まえ、初期含水率の高いタイでは氷晶成長速度が大きく、確認された再結晶化による組織損傷は、冷凍過程における組織内部の微細氷晶が緩慢解凍時に成長することによって引き起こされた損傷であると推察した。

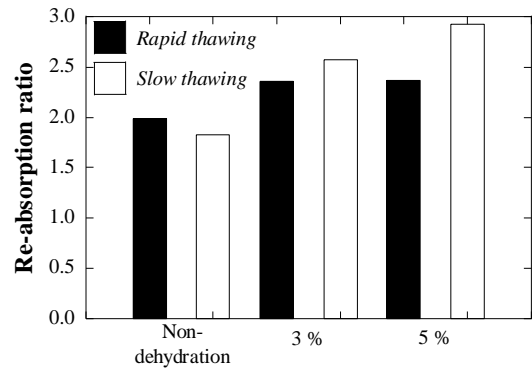
以上、本論文は食品・生体の冷凍・解凍における組織内熱・物質移動現象と損傷機構に焦点を当て、実験・解析の両面から明らかにした成果をまとめたものである。その締めくくりに、魚肉組織の解凍過程における損傷と復元を同時に評価する指標を回復率とした上で、回復率への解凍速度の影響について考える。Fig. 8.1 は定性的な傾向を表す図で、横軸に解凍速度、縦軸に回復率をそれぞれとり、脱水冷凍に着目した本研究で得られた結果を反映したものとなっている。また、第7章までに得られた結果を再度 Fig. 8.1a~c に示している。未脱水組織において、解凍が遅いと再結晶化のリスクが高まるが、迅速に解凍すれば組織への水分再吸収が十分でないため、それぞれの場合において回復率が減少する。それ故に、再結晶化による損傷を低減すると同時に、再吸収も促進できる解凍速度が定まると予想される。一方、脱水された組織においては、緩慢解凍時の再結晶化による損傷が減少し、これは低含水率で氷晶成長速度が小さくなることに起因すると考察した (Fig. 8.1a, b)。また、解凍が速い場合の再吸収率についても改善が見られたが、脱水の効果は緩慢解凍においてより顕著であった (Fig. 8.1c)。加えて、予備脱水による氷晶微細化の効果を考慮すると、未脱水組織よりも冷凍時の損傷が少なく、解凍後の状態が向上するものと考えられる。これらのことから、氷晶成長を防ぐには急速に解凍すればよいが、解凍時の組織復元には水分再吸収が不可欠であり、単純に解凍を速めただけでは十分に復元しない。したがって、含水率の多い魚種では予備脱水と緩慢解凍を併用することで、再結晶化による組織損傷を防ぐとともに組織復元が促進され、良質な冷凍保存が可能になるものとする。



(a) Photomicrograph of micro-structure of sea breams after slow thawing.



(b) Ice crystal growth rate and temperature vs. time.



(c) Re-absorption ratio of mackerels after thawing.

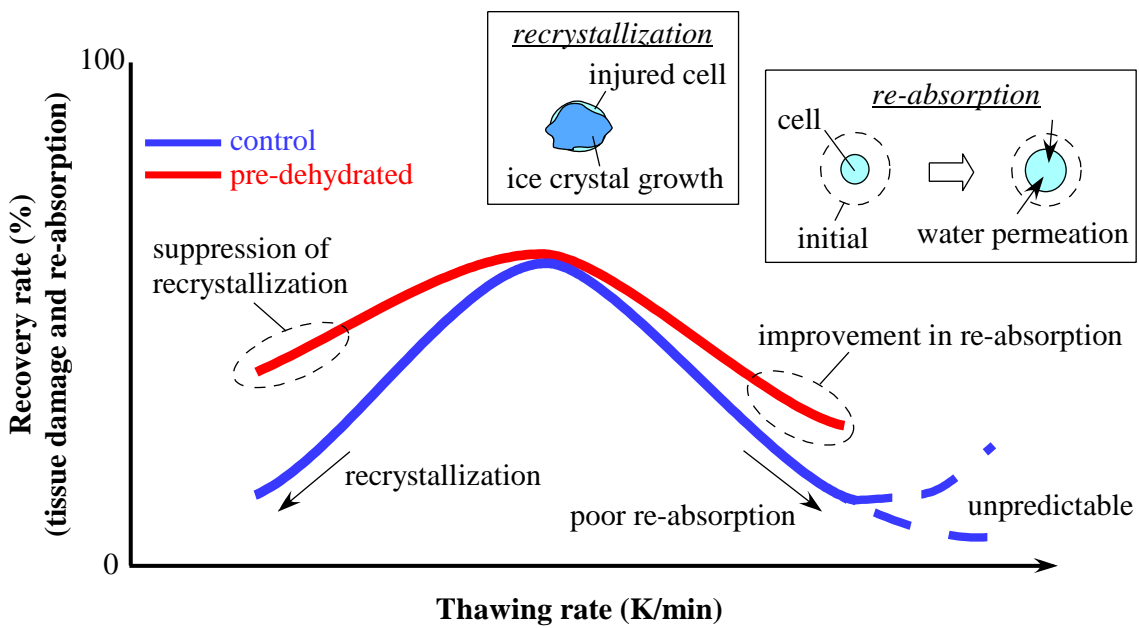


Fig. 8.1 Effects of thawing rate on recovery rate (tissue damage and re-absorption).

参考文献

- Balasubramanian, S.K., Venkatasubramanian, R.T., Menon, A., and Bischof, J.C., 2008, "Thermal injury prediction during cryoplasty through in vitro characterization of smooth muscle cell biophysics and viability," *Annals of Biomedical Engineering*, 36, 86-101.
- Benson, C.M.K., Benson, J.D., and Critser, J.K., 2008, "An improved cryopreservation method for a mouse embryonic stem cell line," *Cryobiology*, 56, 120-130.
- Bischof, J.C. and Rubinsky, B., 1993, "Microscale heat and mass transfer of vascular and intracellular freezing in the liver," *Journal of Heat Transfer*, 115, 1029-1035.
- Butler, M.F., 2001, "Instability formation and directional dendritic growth of ice studied by optical interferometry," *Crystal Growth and Design*, 1, 213-223.
- Cao, E., Chen, Y., Cui, Z., and Foster, P.R., 2003, "Effect of freezing and thawing rates on denaturation of proteins in aqueous solutions," *Biotechnology and Bioengineering*, 82, 684-690.
- Choi, J. and Bischof, J.C., 2011, "Cooling rate dependent biophysical and viability response shift with attachment state in human dermal fibroblast cells," *Cryobiology*, 63, 285-291.
- Cui, Z.F., Dykhuizen, R.C., Nerem, R.M., and Sembanis, A., 2002, "Modeling of cryopreservation of engineered tissues with one-dimensional geometry," *Biotechnology Progress*, 18, 354-361.
- Delgado, A.E. and Rubiolo, A.C., 2005, "Microstructural changes in strawberry after freezing and thawing processes," *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.*, 38, 135-142.
- Delgado, A.E. and Sun, D.W., 2001, "Heat and mass transfer models for predicting freezing processes – a review," *Journal of Food Engineering*, 47, 157-174.

- Devireddy, R.V., Smith, D.J., and Bischof, J.C., 2002, "Effect of microscale mass transport and phase change on numerical prediction of freezing in biological tissues," *Journal of Heat Transfer*, 124, 365-374.
- Eastridge, J.S. and Bowker, B.C., 2011, "Effect of rapid thawing on the meat quality attributes of USDA select beef strip loin steaks," *Journal of Food Science*, 76, 156-162.
- Engelman, D.M., 2005, "Membranes are more mosaic than fluid," *Nature*, 438, 578-580.
- Fadda, S., Briesen, H., and Cincotti, A., 2011, "The effect of EIF dynamics on the cryopreservation process of a size distributed cell population," *Cryobiology*, 62, 218-231.
- Flemings, M.C., 1974, "Solidification processing," *Mcgraw-Hill College*, 34-36.
- Goula, A.M. and Lazarides, H.N., 2012, "Modeling of mass and heat transfer during combined processes of osmotic dehydration and freezing (osmo-dehydro-freezing)," *Chemical Engineering Science*, 82, 52-61.
- Hagiwara, T., Wang, H., Suzuki, T., and Takai, R., 2002, "Fractal analysis of ice crystals in frozen food," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3085-3089.
- Hamidi, N., 2009, "Study on freezing damage prevention by microwave pre-dehydration," PhD Thesis, Kyushu Institute of Technology, Kitakyushu, Japan.
<http://hdl.handle.net/10228/2515>
- Hayashi, Y., Momose, N., and Tada, Y., 1994, "Micro-freezing of biological material," *Thermal Science and Engineering*, 2, 85-89.
- Illingworth, T.C., Golosnoy, I.O., Gergely, V., and Clyne, T.W., 2005, "Numerical modeling of transient liquid phase bonding and other diffusion controlled phase changes," *Journal of Materials Science*, 40, 2505-2511.
- Karlsson, J.O.M., 2001, "A theoretical model of intracellular devitrification," *Cryobiology*, 42, 154-169.

References

- Karlsson, J.O.M., 2010, "Effects of solution composition on the theoretical prediction of ice nucleation kinetics and thermodynamics," *Cryobiology*, 60, 43-51.
- Karlsson, J.O.M., Cravalho, E.G., Rinkes, I.H.M.B., Tompkins, R.G., Yarmush, M.L., and Toner, M., 1993, "Nucleation and growth of ice crystals inside cultured hepatocytes during freezing in the presence of dimethyl sulfoxide," *Biophysical Journal*, 65, 2524-2536.
- Li, DX., Liu, BL., Liu, YS., and Chen, CL., 2008, "Predict the glass transition temperature of glycerol-water binary cryoprotectant by molecular dynamic simulation," *Cryobiology*, 56, 114-119.
- Lin, J., Novak, B., and Moldovan, D., 2012, "Molecular dynamics simulation study of the effect of DMSO on structural and permeation properties of DMPC lipid bilayers," *Journal of Physical Chemistry B*, 116, 1299-1308.
- Liu, J., Phy, J., and Yeomans, E., 2012, "Theoretic considerations regarding slow cooling and vitrification during cryopreservation," *Theriogenology*, 78, 1641-1652.
- Liu, J., Zieger, M.A.J., Lakey, J.R.T., Woods, E.J., and Critser, J.K., 1997, "The determination of membrane permeability coefficients of canine pancreatic islet cells and their application to islet cryopreservation," *Cryobiology*, 35, 1-13.
- Liu, L., Miyawaki, O., and Hayakawa, K., 1999, "Progressive freeze-concentration of tomato juice," *Food Science and Technology Research*, 5, 108-112.
- Liu, Z., Muldrew, K., Wan, R.G., and Elliott, J.A.W., 2003, "Measurement of freezing point depression of water in glass capillaries and the associated ice front shape," *Physical Review E*, 67, 061602(9 pages).
- Mao, L., Udaykumar, H.S., and Karlsson, J.O.M., 2003, "Simulation of micro-scale interaction between ice and biological cells," *International Journal of Heat and Mass Transfer*, 46, 5123-5136.

- Matsuda, A. and Kawasaki, K., 1997, "Concentration and separation of impurities in liquid by freezing with supersonic radiation," *Journal of Chemical Engineering of Japan*, 30, 825-830.
- Mazur, P., 1963, "Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing," *The Journal of General Physiology*, 47, 347-369.
- Mazur, P., 1970, "Cryobiology - freezing of biological systems," *Science*, 168, 939-949.
- Mazur, P., 1984, "Freezing of living cells: mechanism and implications," *American Journal of Physiology*, 247, 125-142.
- Mazur, P., 1989, "Equilibrium, quasi-equilibrium, and nonequilibrium freezing of mammalian embryos," *Cell Biochemistry and Biophysics*, 17, 53-92.
- Mazur, P. and Koshimoto, C., 2002, "Is intracellular ice formation the cause of death of mouse sperm frozen at high cooling rate?," *Biology of Reproduction*, 66, 1485-1490.
- Mazur, P., Seki, S., Pinn, I.L., Kleinhans, F.W., and Edashige, K., 2005, "Extra- and intracellular ice formation in mouse oocytes," *Cryobiology*, 51, 29-53.
- Meryman, H.T., 2007, "Cryopreservation of living cells: principles and practice," *Transfusion*, 47, 935-945.
- Miyawaki, O., Liu, L., and Nakamura, K., 1998, "Effective partition constant of solute between ice and liquid phases in progressive freeze-concentration," *Journal of Food Science*, 63, 756-758.
- Mori, S., Choi, J., Devireddy, R.V., and Bischof, J.C., 2012, "Calorimetric measurement of water transport and intracellular ice formation during freezing in cell suspensions," *Cryobiology*, 65, 242-255.
- Ngapo, T.M., Babare, I.H., Reynolds, J., and Mawson, R.F., 1999, "Freezing and thawing rate effects on drip loss from samples of pork," *Meat Science*, 53, 149-158.

References

- Ohnishi, S. and Miyawaki, O., 2005, "Osmotic dehydrofreezing for protection of rheological properties of agricultural products from freezing-injury," *Food Science and Technology Research*, 11, 52-58.
- Petzold, G. and Aguilera, J.M., 2009, "Ice morphology: fundamentals and technological applications in foods." *Food Biophysics*, 4, 378-396.
- Prinzivalli, C., Brambilla, A., Maffi, D., Scalzo, R.L., and Torreggiani, D., 2006, "Effect of osmosis time on structure, texture and pectic composition of strawberry tissue," *European Food Research and Technology*, 224, 119-127.
- Ramallo, L.A. and Mascheroni, R.H., 2010, "Dehydrofreezing of pineapple," *Journal of Food Engineering*, 99, 269-275.
- Schultz, S.G., 1980, "Basic principles of membrane transport," Cambridge University Press.
- Seki, S. and Mazur, P., 2008, "Effect of warming rate on the survival of vitrified mouse oocytes and on the recrystallization of intracellular ice," *Biology of Reproduction*, 79, 727-737.
- Sun, DW., 2006, "Handbook of frozen food processing and packaging," (ed. by Sun, DW.), CRC Press, 4-29.
- Toner, M., Cravalho, E.G., and Karel, M., 1990, "Thermodynamics and kinetics of intracellular ice formation during freezing of biological cells," *Journal of Applied Physics*, 67, 1582-1593.
- Torreggiani, D. and Bertolo, G., 2001, "Osmotic pre-treatments in fruit processing: chemical, physical and structural effects," *Journal of Food Engineering*, 49, 247-253.
- Tsuruta, T., Ishimoto, Y., and Masuoka, T., 1998, "Effects of glycerol on intracellular ice formation and dehydration of onion epidermis," *Annals of the New York Academy of Sciences*, 858, 217-226.
- Voller, V.R., 2006, "A similarity solution for solidification of an under-cooled binary alloy,"

International Journal of Heat and Mass Transfer, 49, 1981-1985.

Weng, L., Chen, C., Zuo, J., and Li, W., 2011, "Molecular dynamics study of effects of temperature and concentration on hydrogen-bond abilities of ethylene glycol and glycerol: implications for cryopreservation," *Journal of Physical Chemistry A*, 115, 4729-4737.

Weng, L., Li, W., and Zuo, J., 2010, "Kinetics of osmotic water flow across cell membranes in non-ideal solutions during freezing and thawing," *Cryobiology*, 61, 194-203.

Wolkers, W.F., Balasubramanian, S.K., Ongstad, E.L., Zec, H.C., and Bischof, J.C., 2007, "Effects of freezing on membranes and proteins in LNCaP prostate tumor cells," *Biochimica et Biophysica Acta*, 1768, 728-736.

Woods, E.J., Zieger, M.A.J., Gao, D.Y., and Critser, J.K., 1999, "Equation for obtaining melting points for the ternary system ethylene glycol/sodium chloride/water and their application to cryopreservation," *Cryobiology*, 38, 403-407.

Wu, L., Orikasa, T., Tokuyasu, K., Shiina, T., and Tagawa, A., 2009, "Applicability of vacuum-dehydrofreezing technique for the long-term preservation of fresh-cut eggplant: Effects of process conditions on the quality attributes of the samples," *Journal of Food Engineering*, 91, 560-565.

Yang, G., Zhang, A., Xu, L.X., and He, X., 2009, "Modeling the cell-type dependence of diffusion-limited intracellular ice nucleation and growth during both vitrification and slow freezing," *Journal of Applied Physics*, 105, 114701(11 pages).

阿部周司・大迫一史・渡辺学・鈴木徹, 2009, "凍結魚肉の解凍条件が解凍後の魚肉に与える影響", *日本冷凍空調学会論文集*, 26, 149-158.

阿部靖之, 2011, "動物の胚および卵子の凍結技術", *冷凍*, 86, 311-316.

上田和明・荒武章太郎・鶴田隆治・牧野宏治・武内雅弘・高稲正美, 2009, "マイクロ波デハイドロフリージングによる冷凍品の解凍特性", *日本冷凍空調学会年次大*

会講演論文集, 東京, B213.

大中逸雄, 1985, “コンピュータ伝熱・凝固解析入門”, 丸善, 201-202.

上西浩史・荒木徹也・白樫了・相良泰行, 2002, “溶液系材料の凍結プロセスシミュレーションモデルの開発”, 低温生物工学会誌, 48, 119-124.

上西浩史・荒木徹也・白樫了・上野茂昭・相良泰行, 2003, “溶液系食品材料の三層凍結プロセスシミュレーションモデルの開発”, 日本冷凍空調学会論文集, 20, 309-316.

小城陽子・渡辺学・高井陸雄・萩原知明・鈴木徹, 2006, “凍結食品中の氷結晶粒の形態変化と凝集プロセスのフラクタルによる評価”, 日本冷凍空調学会論文集, 23, 299-304.

白樫了・棚澤一郎, 1995, “生体組織の凍結過程の数値シミュレーション”, 日本機械学会論文集 (B 編), 61, 2642-2647.

白樫了・棚澤一郎, 1997, “生体組織内における凍害防御剤の拡散係数の測定”, 日本機械学会論文集 (B 編), 63, 2793-2796.

白樫了・棚澤一郎, 1998, “生体凍結保存における細胞膜透過係数の測定”, 日本機械学会論文集 (B 編), 64, 1867-1871.

鈴木徹, 2012, “生産側の食品の種類と特性の基礎原理”, 冷凍, 87, 10-19.

妹尾学, 1987, “膜の化学”, 大日本図書.

高井陸雄・鈴木徹・佐藤雄二・山田有紀子, 1997, “凍結食品中の氷結晶の消長速度とガラス転移”, 低温生物工学会誌, 43, 118-123.

高橋慎也・赤堀匡俊・青木和夫, 2011, “膨潤性土壌の凍上現象に及ぼす NaCl 水溶液の影響”, 日本機械学会熱工学コンファレンス, 浜松, F223, 337-338.

田子真・石沢徳秀・菅原征洋, 2009, “凍結問題の簡易的数値計算法”, 日本冷凍空調学会論文集, 26, 439-450.

- 多田幸生・大森梓・瀧本昭・大西元, 2009, “懸濁浮遊細胞の凍結における細胞の掃き出し・捕捉挙動”, 日本冷凍空調学会年次大会講演論文集, 東京, E332.
- 多田幸生・百生登・蔣蓉・林勇二郎, 1996, “細胞の解凍過程におけるマイクロ挙動と障害”, 日本冷凍協会論文集, 13, 321-329.
- 田中和夫・小嶋秩夫, 1991, “食品冷凍工学”, 恒星社厚生閣.
- 田中一成・河野賢治・鶴田隆治, 2007, “食品のマイクロ波常温乾燥特性”, 日本機械学会講演論文集, No. 078-2, 223-224, 沖縄.
- 棚澤一郎・永田真一・木村直宏, 1992, “生体の凍結保存に関する研究”, 生産研究, 44, 475-478.
- 鶴田隆治・川水努・野中功・増岡隆士, 1996, “玉ねぎ表皮組織の凍結機構に関する実験的研究”, 日本機械学会論文集 (B 編), 62, 2446-2451.
- 鶴田隆治・ハミディ ヌルホリス, 2008, “マイクロ波による常温予備乾燥を行なう新規冷凍法”, 日本冷凍空調学会論文集 (B 編), 25, 291-298.
- 鶴田隆治・林伊久, 2006, “間欠照射と外気導入によるマイクロ波減圧乾燥の乾燥促進”, 日本機械学会論文集 (B 編), 72, 2761-2766.
- 日本機械学会編, 1997, “生体機械工学”, 丸善, 41-46.
- 日本冷凍空調学会編, 2000, “食品関係者のための食品冷凍技術”, 日本冷凍空調学会.
- 萩原知明, 2011, “不凍タンパク質の再結晶化抑制の実際”, 冷凍, 86, 562-568.
- 濱田奈保子・齋藤利則・小林武志・今田千秋・渡邊悦生, 2003, “魚の鮮度保持に及ぼす脱水シートの効果”, 日本調理科学会誌, 36, 354-359.
- ハミディ ヌルホリス・鶴田隆治, 2009, “冷凍過程の氷晶成長に及ぼすマイクロ波予備乾燥の影響”, 日本機械学会論文集 (B 編), 75, 1497-1502.
- 尾藤方通, 1986, “魚の解凍硬直に及ぼす鮮度, 凍結温度, 解凍速度, 解凍温度の影響”,

References

東海区水産研究所研究報告, 119, 25-31.

福迫尚一郎・稲葉英男, 1996, “低温環境下の伝熱現象とその応用”, 養賢堂.

御木英昌・西元諄一, 1987, “凍結魚の解凍”, 日本冷凍協会論文集, 4, 15-25.

百生登・多田幸生・林勇二郎, 1996, “生体組織細胞の解凍過程の数値シミュレーション”, 日本冷凍協会論文集, 13, 331-340.

保井明子・高島薫子・岸本健四郎, 1996, “冷凍保存肉の食味に及ぼす脱水シートの影響”, 日本調理科学会誌, 29, 207-211.

謝辞

本論文を終えるにあたり、主指導教員としてご指導ご鞭撻を賜りました鶴田隆治教授に謹んで感謝いたします。研究に対する姿勢・考え方について、日頃のご指導から多くのことを学ばせていただきました。先生がご教授下さったことが私の礎になるとともに、社会人としての自分の在り方を常に正してくれることを確信しております。長山暁子准教授には、研究だけでなく学生生活への多大なるご配慮を賜り、活気ある研究室を作ってくださいました。研究室で過ごした6年間のご支援に感謝を申し上げます。また、竹中繁織教授、橘武史教授、宮崎康次教授には本論文をまとめるに際し、懇切丁寧なご指導を賜りましたことを深く感謝申し上げます。

この研究を進めるにあたり、数値解析に関する悩みや実験試料の発注などについて、ご多忙の中でも相談に乗って下さった谷川洋文助教に厚く御礼申し上げます。兄弟子である徳永敦士さんには、学会準備や研究室ゼミなどに関する様々なご助言をいただきました。後期課程における私の道標だった徳永さんに心から感謝いたします。

本論文第2章および第4章に関しては、上田和明君と椛嶋昭宏君のご支援なくしては成し遂げることができませんでした。中でも椛嶋君には、繊細な操作技術を必要とする実験や難題をお願いしたこともありました。研究内容についてディスカッションできる数少ない後輩でした。お二人ともありがとうございました。

伝熱研究室で共に過ごした仲間のおかげで、充実した研究生活を送ることができました。後期課程に進んだ私を気にかけて下さり、北九州に来られる度に近況を話して下さった先輩方にとっても感謝しています。伝熱研究室を選んで良かったです。

九州工業大学で過ごした7年間、地元を離れての学生生活は長かったと感じると同時に、これまでに出会った方々との思い出が私の宝物になっています。そしてこの7年間を通じ、「技術に堪能なる士君子」として成長できていることを願うばかりです。

最後に、常に精神面と健康面での支えとなり、自分本位な人生を歩ませてくれた家族に感謝します。

2013年3月 奥 祐一郎