

第3章 近赤外高速ハイパースペクトルシステムの開発とその応用^{30,31)}

3-1 新規手法の提案

第2章で述べた既往の研究例において、様々な食品の成分分布を可視化する近赤外分光イメージング手法の利点と同時に、その課題も明らかとなった。すなわち、

- 1) 物質の光吸収が大きい長波長領域（1,800 nm 以上）における透過スペクトル測定においては、吸光の飽和を防ぐため試料厚さを薄くする必要があり、精度の高い検量線を作成することが困難である。また、反射スペクトル測定においても、わずかな表面状態の差が、大きな吸光度の違いを生ずることが予想され、安定した計測は困難であると考えられる。さらに、長波長領域のスペクトル測定には2次元アレイ検出器を利用するか、従来の近赤外分光装置を改造する必要があり、このためのコストがかさむ。
- 2) XY 走査法や一次元位置情報－スペクトル同時取得法は位置情報の取得に長時間を要するため、青果物などの品質が変化しやすい対象の計測には不向きである。
- 3) バンドパスフィルタによる分光方式の場合、対象成分の吸収帯特定には近赤外分光分析装置による前実験が必要である上、実験条件の変化に伴う吸収帯のシフトや、多様な青果物・他の成分分布可視化に対応できない。

という3点が挙げられる。そこで本研究では、上記の課題を解決すべく、「近赤外高速ハイパースペクトルシステム」の開発と、食品を対象とした近赤外分光イメージング手法への適用を提案した。

3-2 近赤外高速ハイパースペクトルシステムの開発

前節で述べた課題を解決するハイパースペクトルシステムは、下記4点の特徴を備えている必要がある。すなわち、

- 1) 検出器が比較的安価であり、物質の光吸収が少ない可視及び近赤外領域のうち、波長範囲 400～1,100 nm のスペクトル測定を行う。
- 2) 試料厚さの影響が少ない反射スペクトル測定を行う。
- 3) 位置情報の取得を高速化するため、イメージ撮影法を採用する。
- 4) 吸収帯の特定から成分分布可視化までを一括して行うため、また様々な青

果物や成分に対応するため、連続スペクトルが測定可能な分光法を採用する。

の4点である。以上の条件を満たす撮像装置として、天体観測用に用いられている40万画素の冷却 CCD カメラ（武藤工業製 CV-04 II）を採用することとした。通常、CCD カメラは 8-bit 階調（256 段階）であるが、この CCD カメラは近赤外分光分析装置と同等の 16-bit 階調（65,536 段階）であり、線形特性が $\gamma=1$ 、すなわち入力信号と出力信号が正比例していることから、各画素が近赤外分光分析装置の受光器と同様の働きをすると考えられた。また、連続スペクトルが測定可能な分光法には FFT 法、グレーティング法、AOTF 法、液晶チューナブルフィルタ法が挙げられるが、比較的 low コストであること、動作が高速であること、可動部分がなく保守性に優れることから、液晶チューナブルフィルタ（Cambridge Research & Instrumentation 製 VS-NIR1-10-LC-20）を採用することとした。このフィルタは透過波長を 700~1,100 nm の任意の波長に設定でき、50 ms 以下の短時間で透過波長を変えることが可能である。また、半値幅は約 10 nm、波長誤差は約 ± 1.25 nm であり、その透過特性は図 3-1 に示す通りである。

上記の装置を組み合わせることにより、測定対象の 700~1,100 nm におけるハイパースペクトルを取得するシステムを構築した。このシステムでは近赤外領域のハイパースペクトルを高速に取得することが可能なため、「近赤外高速ハイパースペクトルシステム」と名付けることとした。本システムを用いることにより、吸収帯の特定から成分分布可視化までを一括して行うことが可能となった。また、液晶チューナブルフィルタを可視領域用に交換することにより、400~720 nm における計測も可能である。さらに、対象の大きさに合わせて顕微鏡、マクロレンズ、魚眼レンズなど様々な光学系に装着可能であるため、様々な食品の成分分布可視化に応用可能であると考えられた。

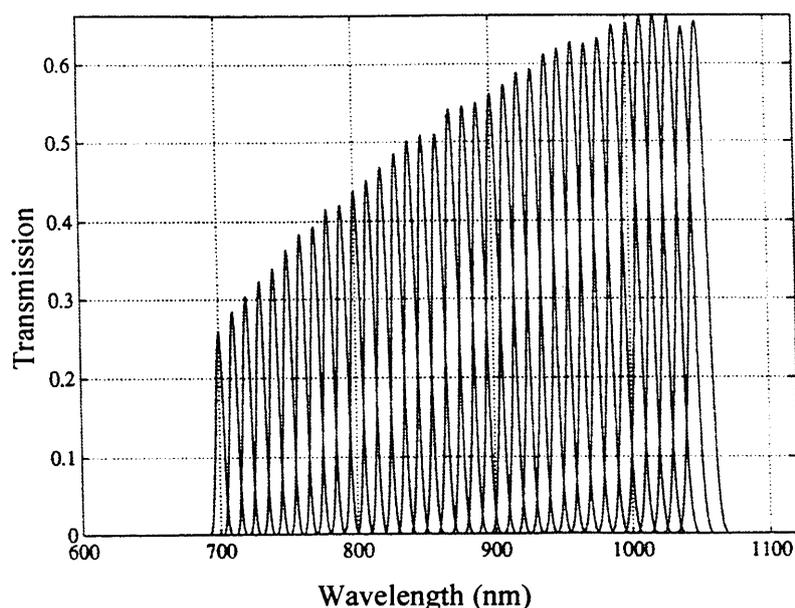


図 3-1 液晶チューナブルフィルタの透過特性

3-3 メロンの糖度分布可視化への応用

前章 2-5-3 節で述べた通り、筆者らはバンドパスフィルターを用いた装置でメロンの糖度分布を可視化した例を報告している^{25)、26)、27)、28)、29)}。そこで、本研究で開発した近赤外高速ハイパースペクトルシステムをメロンの糖度分布可視化に応用し、検量線の精度や可視化画像の正確さを比較することにより、本システムの有用性を検証することとした。

3-3-1 実験手順

1) 実験装置

図 3-2 に実験装置の概要を示す。メロンの果肉断面を観察するには 30 cm 四方程度の範囲を撮影可能なシステムを構築する必要がある。そこで、冷却 CCD カメラの前にカメラレンズ（キャノン株式会社製 FD 28 mm 1:3.5 S.C.）を取り付け、その前面に液晶チューナブルフィルタを装着した。照明には近赤外線照射装置（林時計工業社製 LA-100IR）を用い、サンプルの左右に配置した。また、冷却 CCD カメラとサンプル表面の焦点距離が一定となるよう、石英ガラスをカメラレンズと水平に設置し、その表面にサンプルを密着させた。また、一辺 300 mm の木枠の内部に硫酸バリウム粉末を敷き詰め、石英ガラスで密封することにより、図 3-3 に示す標準白色板を作成した。

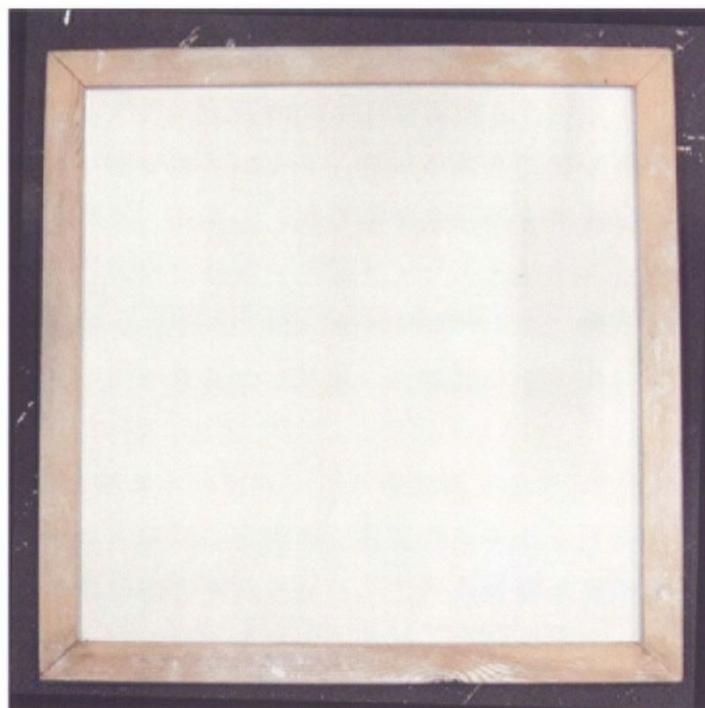
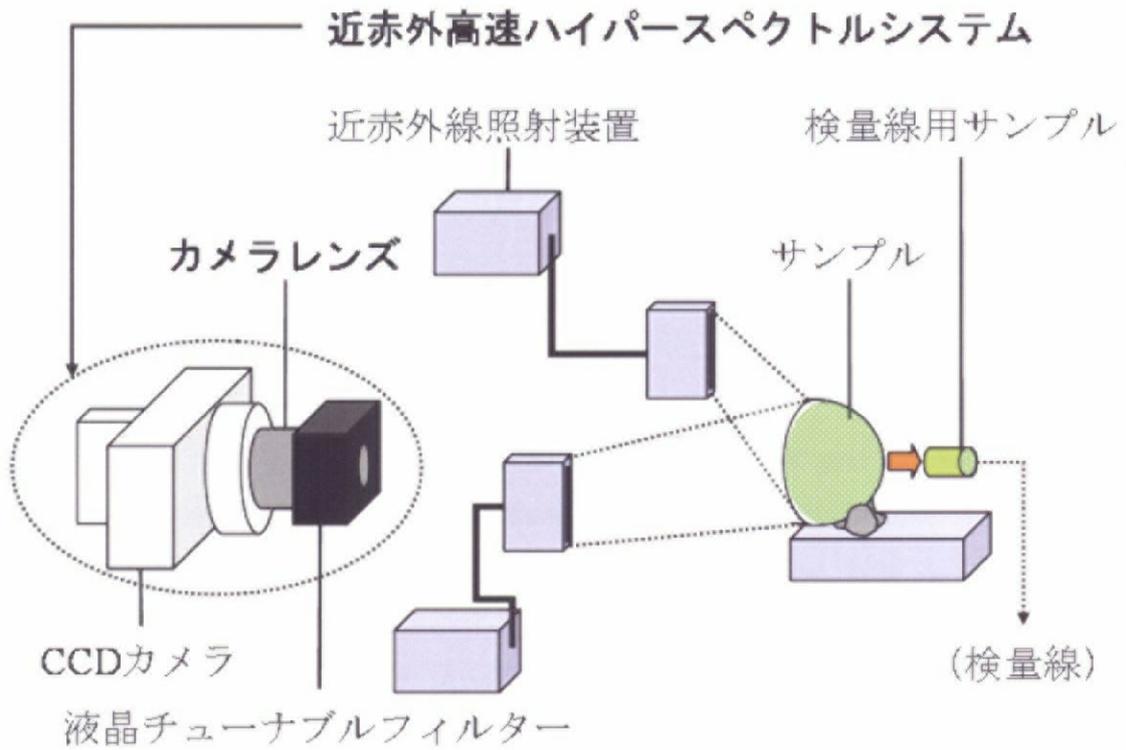


図 3-3 標準白色板

2) 試料

北海道産の緑肉メロンであるらいでん及び赤肉メロンのらいでんレッド各1個を試料とした。温度変化によるスペクトルのシフトを防ぐため、それぞれ室温25℃で一晩放置した後、半分に切断して暗室にて実験を行った。

3) ハイパースペクトルの計測

まず、標準白色板を設置し、その表面がなるべく均一に照明されるよう、照明装置の位置を調整した。次に試料の断面がカメラレンズのレンズ面と水平に向き合うように設置し、その断面画像を800~1,000 nmの範囲で5 nmおきに41枚撮影した。冷却 CCD カメラは768×512画素の画像を撮影可能であるが、隣り合う複数の画素を1つの画素として取り扱い、感度を高めるビニングモードで撮影した。ビニングサイズは2×2、画像サイズは384×256=98,304画素であり、露光時間は各波長におけるハイパースペクトルシステムの感度にあわせて0.2~5秒の範囲で変化させた。一枚あたりの平均露光時間は0.67秒であり、透過波長の変更処理を含めると、一枚あたりの平均撮影時間は約2秒であった。また、撮影したサンプルから直径25 mmの円柱状に果肉をくり抜き、これを検量線作成用サンプルとし、内側表面の画像を半割サンプルと同様にして撮影した。画像を取得した部分から1 mm厚のスライスを切り出し、1.5 ml マイクロチューブに封入した。果汁を採取しやすくするため、マイクロチューブを冷凍・解凍し、果肉の細胞壁を破壊した²⁴⁾。さらに、マイクロチューブに対して遠心分離を行い、上澄み液の糖度をデジタル糖度計(アタゴ社製 PR-100)で測定した。以上の作業を果肉の内側から果皮付近まで繰り返すことにより、様々な深さにおけるメロン果肉の分光画像と糖度のデータを得た。最後に、再び標準白色板を設置し、次節で述べる画像処理に備えて、標準白色板の表面を半割サンプルと同様にして撮影した。また、CCDカメラのシャッターを閉じ、同一条件で撮影した。標準白色板の画像はフラットフレーム、シャッターを閉じて撮影した画像はダークフレームと呼ばれる。

4) 画像処理^{32)、33)}

得られたハイパースペクトルには、(1) 暗電流ノイズ、(2) バイアス電圧、(3) 各画素の感度ムラ、(4) 不均一な照明に起因する光量ムラが含まれ、検量線作成や糖度分布可視化の際の誤差要因となる。これらの誤差要因を低減した上で、各画素における輝度値を吸光度に変換するため、下記の式3-1に示す画像処理を適用した。

$$A(\lambda) = -\log\left(\frac{[\text{サンプル}] - [\text{ダークフレーム}]}{[\text{フラットフレーム}] - [\text{ダークフレーム}]}\right) \dots (3-1)$$

($A(\lambda)$): 波長 λ における吸光度)

すなわち、サンプル画像及びフラットフィールドの輝度値からダークフィールドの輝度値を差し引くことによって上記の(1)、(2)の誤差要因を除去し、さらに前者を後者で除算することにより(3)、(4)の誤差要因を除去することが可能である。ここで、式3-1の分子は2-3-1項、式2-6の I_s 、分母は I_0 にあたるので、前者を後者で除算し、対数をとって符号を逆転させることにより、誤差要因の除去と同時に吸光度への変換を行った。

5) 検量線の作成

図3-4に、らいでんの場合を例にした検量線の作成手順を示す。まず、得られた検量線作成用サンプルの分光画像に、上記と同様の画像処理を行い、800~1,000 nmにおけるφ25 mm内の果肉部分の平均吸光度を求めた。図3-5にこれを連続的にプロットした吸光スペクトルを示す。スペクトルの加算的・乗算的な変動の影響を軽減し、吸光ピークを強調するため、前後3波長の画像を加算平均して平滑化を行った後、下記の式3-2にしたがってスペクトルを波長間隔30 nmで2次微分した。

$$\begin{aligned} d^2 A(\lambda) &= (A(\lambda+30) - A(\lambda)) - (A(\lambda) - A(\lambda-30)) \quad \dots (3-2) \\ &= A(\lambda+30) - 2 \times A(\lambda) + A(\lambda-30) \end{aligned}$$

図3-6に得られた2次微分スペクトルを示す。さらに、らいでん、らいでんレッドそれぞれの2次微分スペクトルと糖度の実測値について重回帰分析を行い、糖度と2次微分吸光度が高い相関を持つ波長を2つ採用し、2次微分吸光度と糖度の検量線を作成した。ここで、採用波長を2つに限ったのは、説明変数の増加による検量線の過剰適合及び画像処理が煩雑になることを防ぐためである。

6) 糖度分布の可視化

サンプル断面のハイパースペクトルの各画素について、式3-2にしたがって2次微分吸光度を求めた。次に、画像の各画素に検量線を適用し、各画素における糖度を求めた。最後に、糖度の大小をカラーマッピングし、糖度分布の可視化画像が得られた。

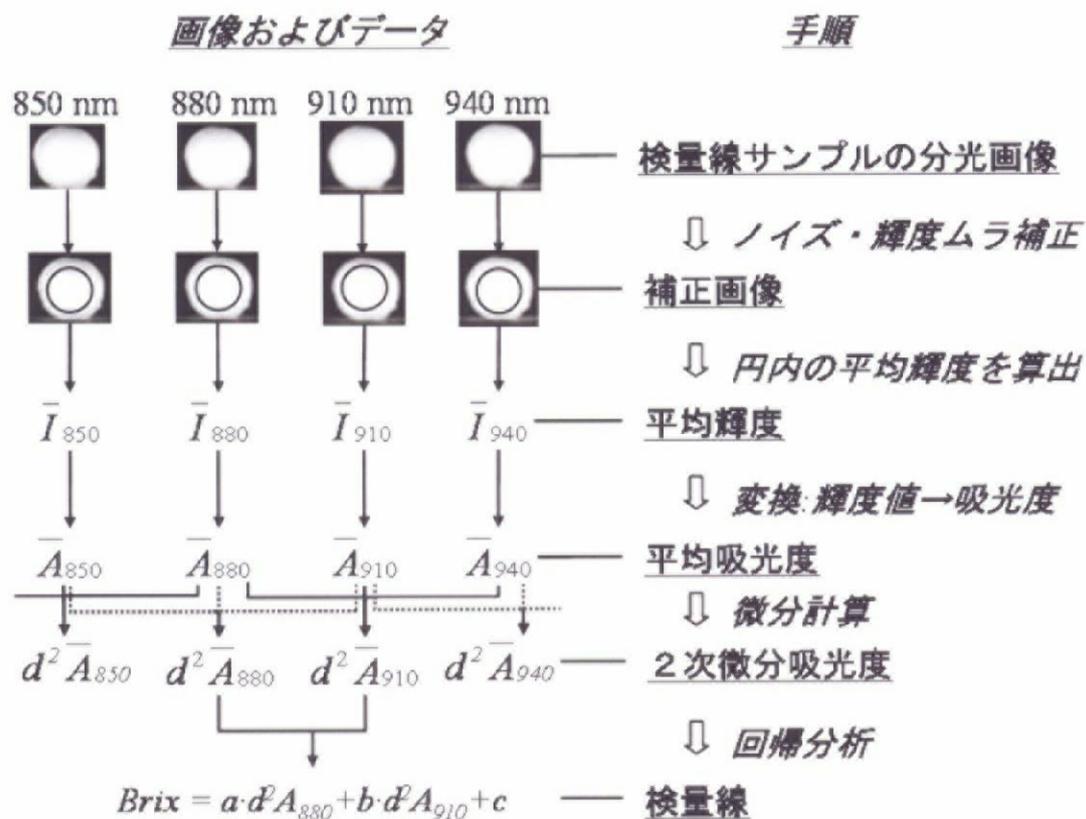


図 3-4 検量線作成手順 (らいでんの例)

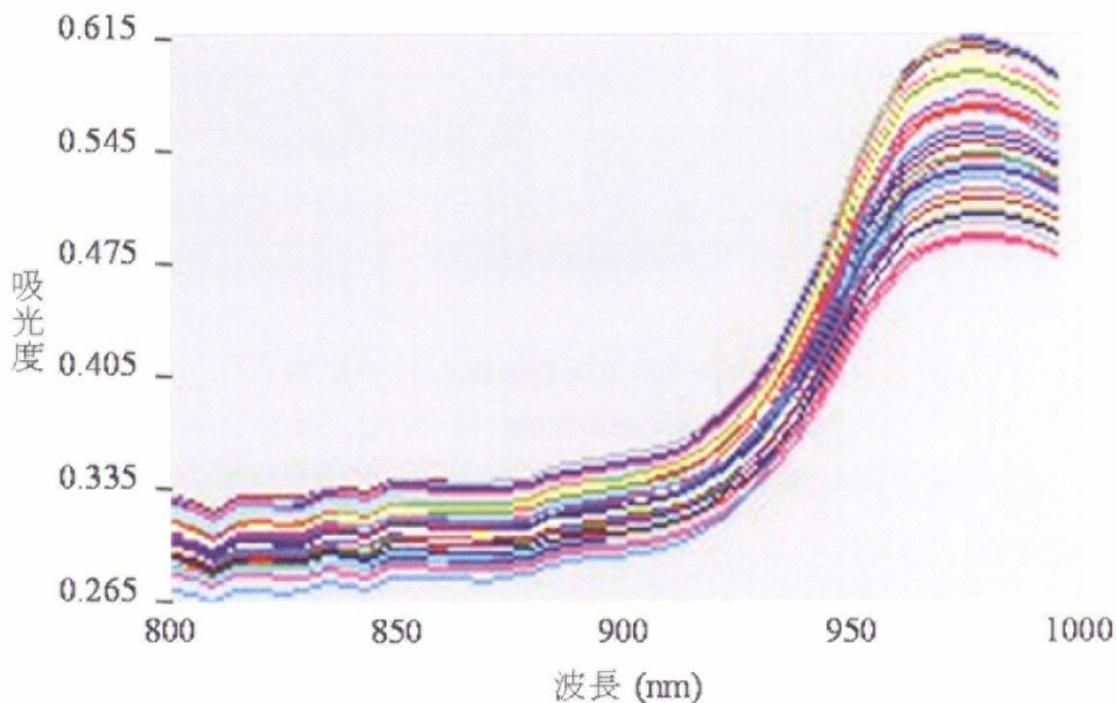


図 3-5 検量線用サンプルのスペクトル

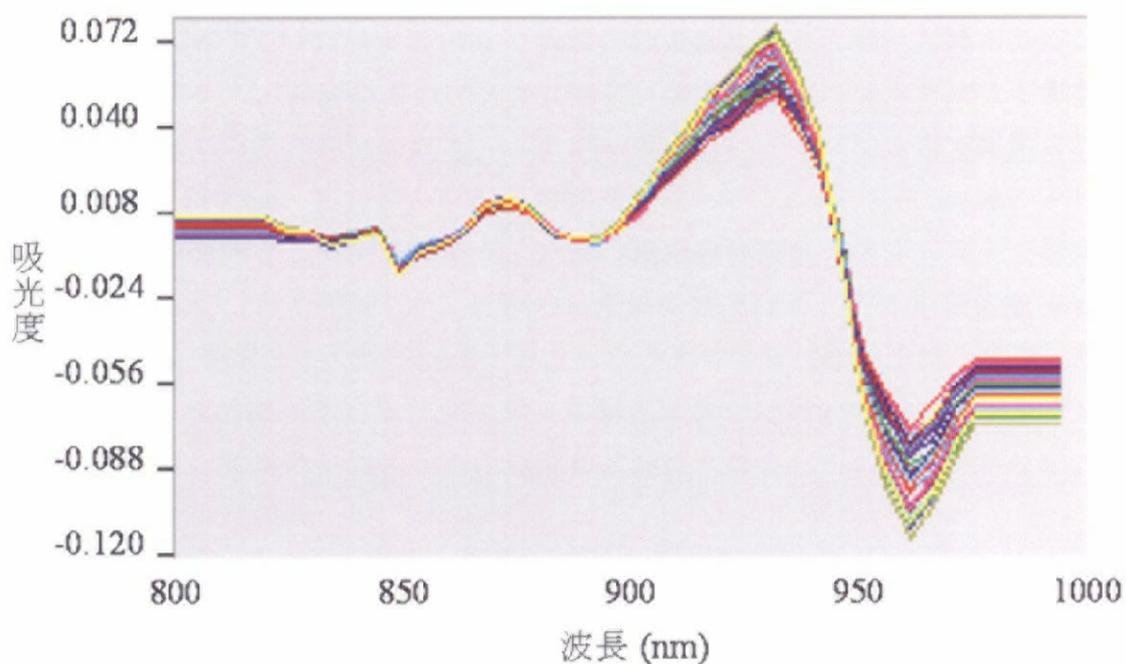


図 3-6 検量線用サンプルの 2 次微分スペクトル

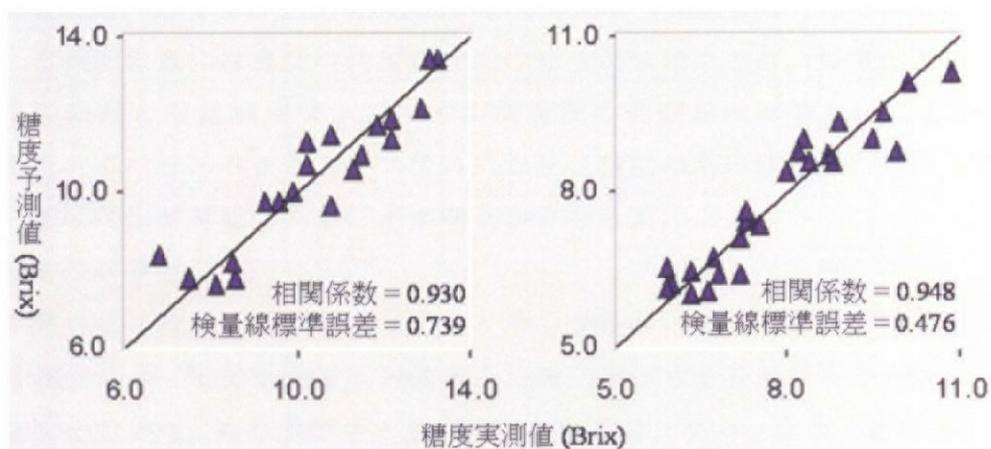


図 3-7 2 次微分吸光度と糖度の検量線
 (左：らいでん (910 nm 及び 880 nm)、
 右：らいでんレッド (915 nm 及び 955 nm))

3-3-2 結果及び考察

1) 波長選択と検量線

重回帰分析の結果、らいでんにおいては 910 nm と 880 nm、らいでんレッドにおいては 915 nm と 955 nm における 2 次微分吸光度の組み合わせと、糖度の間に高い相関があることが明らかになり、図 3-7 に示すように、選択波長における 2 次微分吸光度と糖度の検量線を作成した。910 nm 近傍には糖の吸収帯があること

が報告されている^{34)、35)、36)、37)}。また、880 nm 近傍の 2 次微分吸光度は果肉における光路長と³⁴⁾、955 nm 近傍の 2 次微分吸光度は水分と高い相関があることが知られており³⁸⁾、前者は果肉の光学的性質、後者は果肉の含水率による影響を補正する効果があると考えられた。したがって、らいでんの検量線で採用された 910 nm 及び 880 nm、らいでんレッドで採用された 915 nm と 955 nm は、メロン果肉の糖度検量線として妥当であり、2 本の検量線は誤差を補正した上で糖度を正確に反映していると判断した。2 本の検量線の精度はそれぞれ相関係数 0.930、0.948 であり、前章 2-5-3 節で述べた筆者らの研究で得られた検量線の精度（相関係数 0.891）を上回った。したがって、本研究で用いたハイパースペクトルシステムを用いて、糖度の推定に十分な精度の検量線が得られることが分かった。

2) 糖度分布の可視化

図 3-8 の左図に示すとおり、実画像から糖度分布を予測することは不可能であるが、図 3-8 の右図の糖度分布可視化画像では、果皮付近より果実の中心部において糖度が高いことが明らかであり、これは実際にメロンを食した際の食味と一致している。また、底部よりは上部がより糖度が高い傾向が観察され、「先に柔らかくなる底部が最も甘い」という通念が必ずしもあてはまらないことが分かった。また、可視化画像には糖度の異常な勾配は見られないことと、可視化画像における糖度の範囲と検量線用サンプルの実測糖度の範囲がほぼ等しいことから、近赤外高速ハイパースペクトルシステムにより、精度の高い検量線の作成と食品の成分分布可視化が可能であることが明らかとなった。

3) 計測の高速化

本研究では 1 波長の撮影に約 2 秒、1 サンプルのハイパースペクトル取得に約 80 秒を要したが、撮影と透過波長変更を正確に同期させるアプリケーションを開発することにより、測定時間を半分以下に短縮可能である。また、前章 2-5-2 節で述べたキウイフルーツの研究例と比較して約 3 倍のスペクトルを取得したので、最終的には計測を約 6 倍高速化することが可能であると考えられる。さらに、対象成分の吸収帯を特定するための近赤外分光分析装置による予備実験が不要となったので、成分分布測定 of 簡潔化・迅速化が期待された。

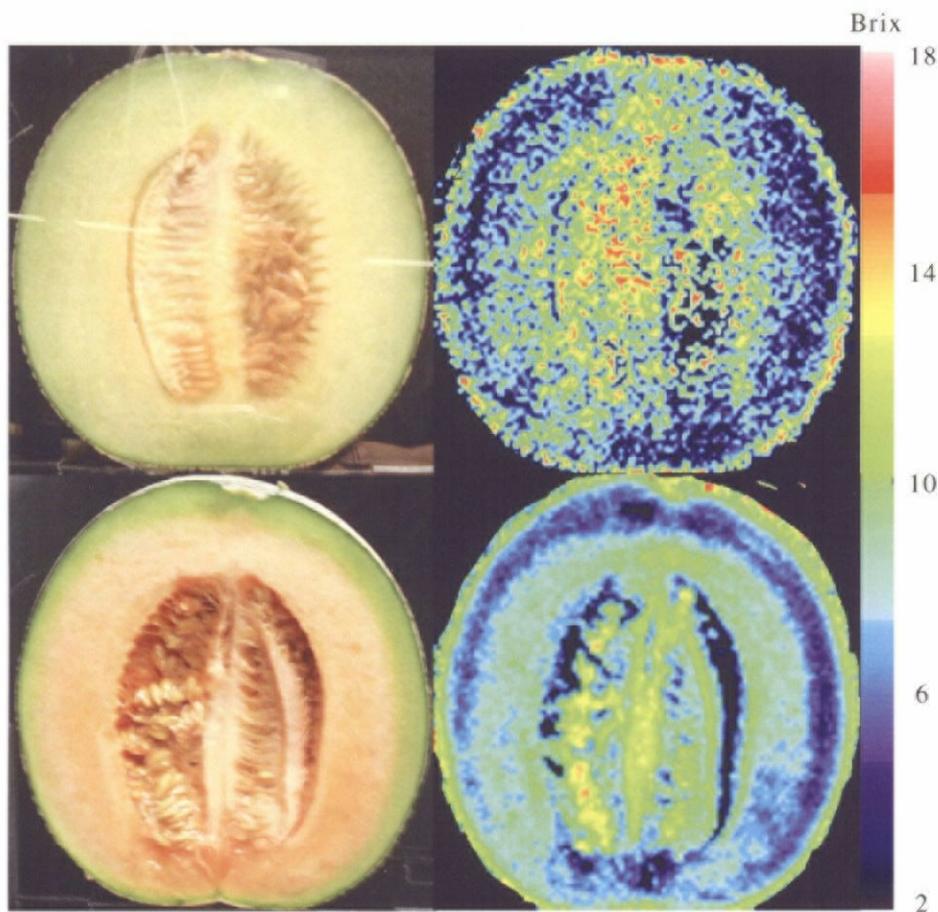


図 3-8 サンプルの実画像と糖度分布可視化画像
(上段：らいでん，下段：らいでんレッド)

3-4 ブルーベリー果実原料中の混入異物検知への応用^{39)、40)}

近年、消費者が食品の品質や安全性に大きな関心を持つようになり、ジャムやフルーツヨーグルトのソースなどの果実を加工した製品に混入した異物に対するクレームも増加している。そのため、果実加工工場では人手による目視検査を増強しているが、異物が果汁に染まり、果実とほぼ同じ色となってしまうため、異物を完全に除去することができないのが現状である。そこで、近年機能性食品として関心が高く、輸入量も増加しているブルーベリー果実を供試材料とし、近赤外高速ハイパースペクトルシステムを応用した高精度の異物検知技術の開発を目的とした。

3-4-1 実験手順

1) 実験装置

果実及び異物の大きさは最大でも 10 mm 四方程度であり、前節で扱ったメロンと比較すると格段に小さい。そこで、分光スペクトル取得の正確を期するため、図 3-9 に示すような小さな対象を計測可能なシステムを構築することとした。具体的には、実体顕微鏡 (Leica Microsystems 製 MZ FLIII) の鏡筒部を半分に切断し、間に可視領域(400~720 nm)を観察可能な液晶チューナブルフィルタ (Varispec 製 VS-VIS2-10-MC-35) を挿入した。本液晶チューナブルフィルタの透過特性を図 3-10 に示す。さらに、鏡筒上部に冷却 CCD カメラを装着した。顕微鏡下のサンプル照明にはハロゲンランプを光源とする照明装置 (HOYA-SCHOTT 製 Megalight50) を用いた。本システムにより、12 mm×9 mm の領域を拡大して計測することが可能となった。

2) 試料

米国より冷凍された状態で輸入したブルーベリー果実を用いた。また、異物にはブルーベリー果実に混入していた小石、葉、枝及び虫と、男性女性各 3 名から採取した毛髪を用いた。適量の果実を常温で 2 時間放置し、解凍した。解凍の際生じる果汁を採取し、これに異物を 1 時間浸し、果汁の色を付けた。これを、「異物が果汁の色に染まり、肉眼ではほとんど識別できない」という加工現場の状況を再現するためのモデル試料とした。

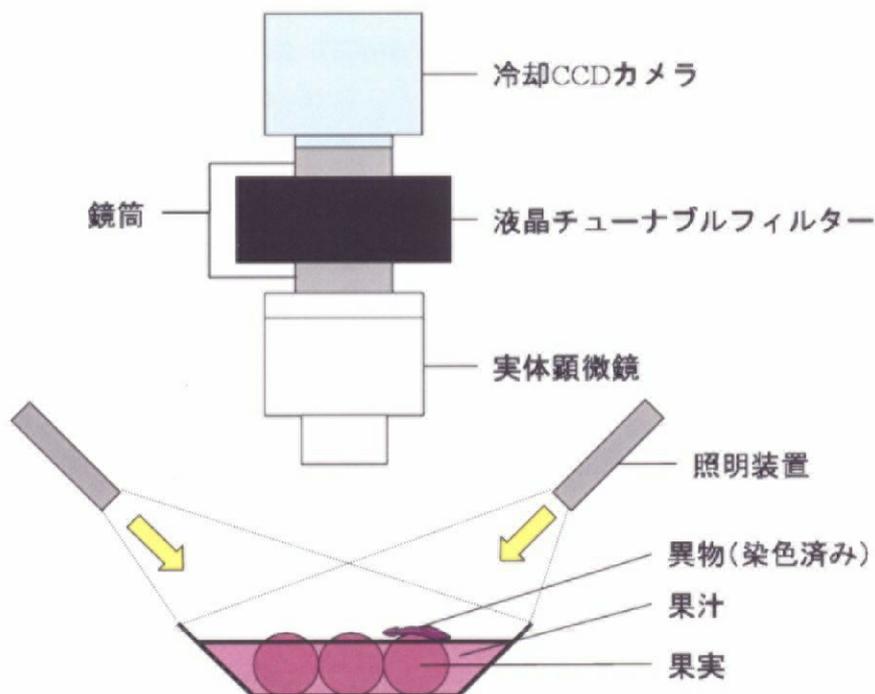


図 3-9 近赤外高速ハイパースペクトルシステム (実体顕微鏡仕様)

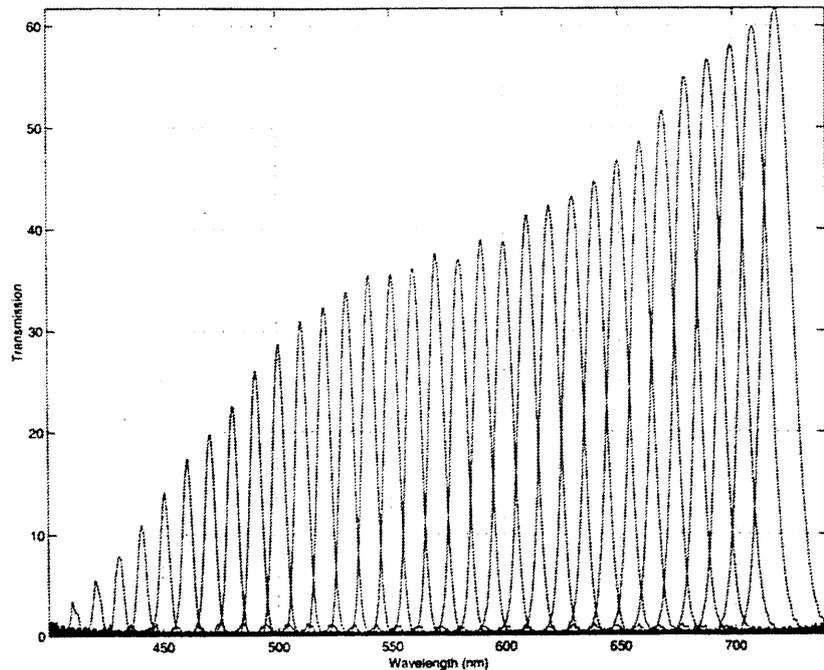


図 3-10 液晶チューナブルフィルタ（可視領域）の透過特性

3) ハイパースペクトルの計測

セラミック製標準白色板を分光イメージングシステムの下に置き、白色板表面をなるべく均一に照明するよう、照明装置の位置を調整した。この状態で白色板の画像を 405～720 nm の範囲で、5 nm おきに計 64 枚撮影した。ビニングサイズは 4×4、画像サイズは 192×128 画素とし、露光時間は 0.05 秒とした。次に、白色板の代わりに使い捨て秤量皿（Bio-Bik 製 D-M）を置き、その上に解凍したブルーベリー果実と染色した異物を載せて試料とし、白色板と同一条件で撮影した。また、前節の実験と同様に、フラットフレームとダークフレームを取得した。

4) 異物検知条件の検討

前節で述べた式 3-1 に従い、得られたハイパースペクトルの各画素における吸光スペクトルを算出した。次に、ハイパースペクトルの果実部分、異物部分のそれぞれにおいて、その平均スペクトルを計算し、前後 3 波長の吸光度を加算平均して平滑化を行った（図 3-11 上図）。両者のスペクトルを比較・検討することにより、異物と果実を識別することが可能な波長帯を特定した。また、図 3-11 の下図に示すように吸光スペクトルを波長間隔 30 nm で 2 次微分し、同様にして異物と果実を識別可能な波長帯を特定した。

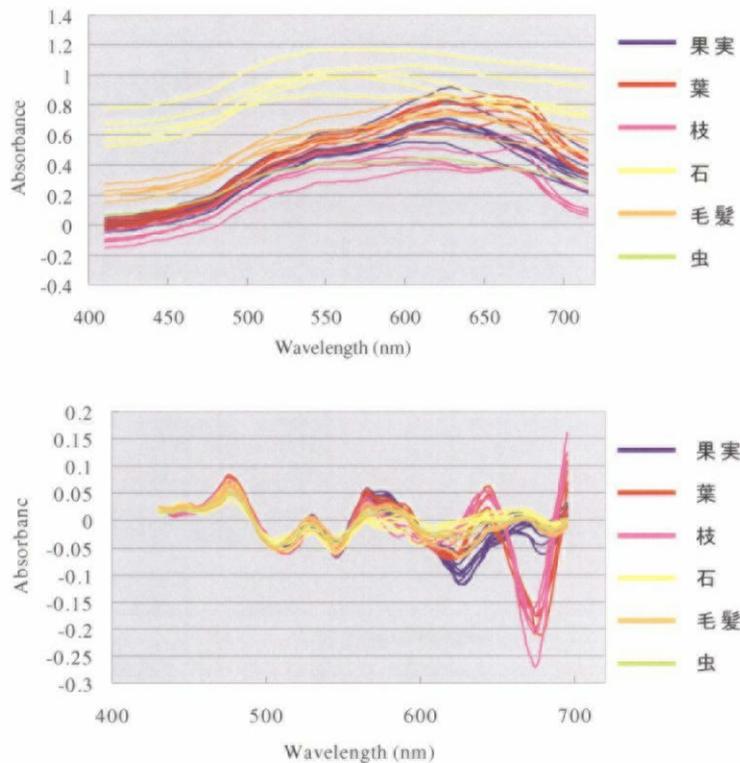


図 3-11 果実及び異物の原スペクトル（上）と二次微分スペクトル（下）

5) 異物検知画像の作成

特定した波長帯において取得した白色板の分光画像を、同じ波長で取得した試料の分光画像で除算し、常用対数をとって各画素における吸光度を算出した。さらに、得られた画像に対して二値化処理を行い、場合によっては白黒反転処理を加えて、異物の部分を白く、他の部分を黒く塗りつぶして異物の検知画像を作成した。検知画像における白色部分と、異物の実際の位置を比較することにより、異物の検知精度を検討した。

3-4-2 結果及び考察

1) 異物検知条件の決定

果実と異物の吸光スペクトルを比較・検討した結果、波長 450 nm 付近で小石の吸光度が他より大きいことが明らかとなり、この波長帯の分光画像を用いて小石が検知可能であることが分かった。また、2 次微分吸光スペクトルについて同様に比較・検討した結果、675 nm 付近で葉・枝の 2 次微分吸光度が果実より大幅に小さくなることが明らかになり、この波長帯の分光画像から 2 次微分分光画像を作成することにより、葉・枝の検知が可能であることが明らかとなった。波長 675 nm 近傍にはクロロフィルの吸収波長帯があるので^{41)、42)}、葉・枝にクロロフ

イルが含まれることから、この波長帯で検知が可能であると考えられた。

2) 異物検知画像

図 3-12 (上) に示すように、450 nm における分光画像から各画素の吸光度を算出し、石とその他の吸光度の中間値を閾値として二値化処理を行い、図 3-13 (右) に示す石の検知画像を作成した。また、図 3-12 (下) に示すように、675 nm とその前後の 645 nm、705 nm の 3 枚の分光画像を用い、差分処理を行って画像の各画素における 2 次微分吸光度を算出した。さらに、葉・枝とその他の 2 次微分吸光度の中間値を閾値として二値化処理を行い、白黒反転処理を施して、図 3-13 (右) に示す葉・枝の検知画像を作成した。小石及び葉・枝の検知画像における白色部分はそれぞれの異物が置かれた実際の位置 (図 3-13 (左)) と良好に一致し、本研究で開発した異物検知技術が有効であることが明らかとなった。

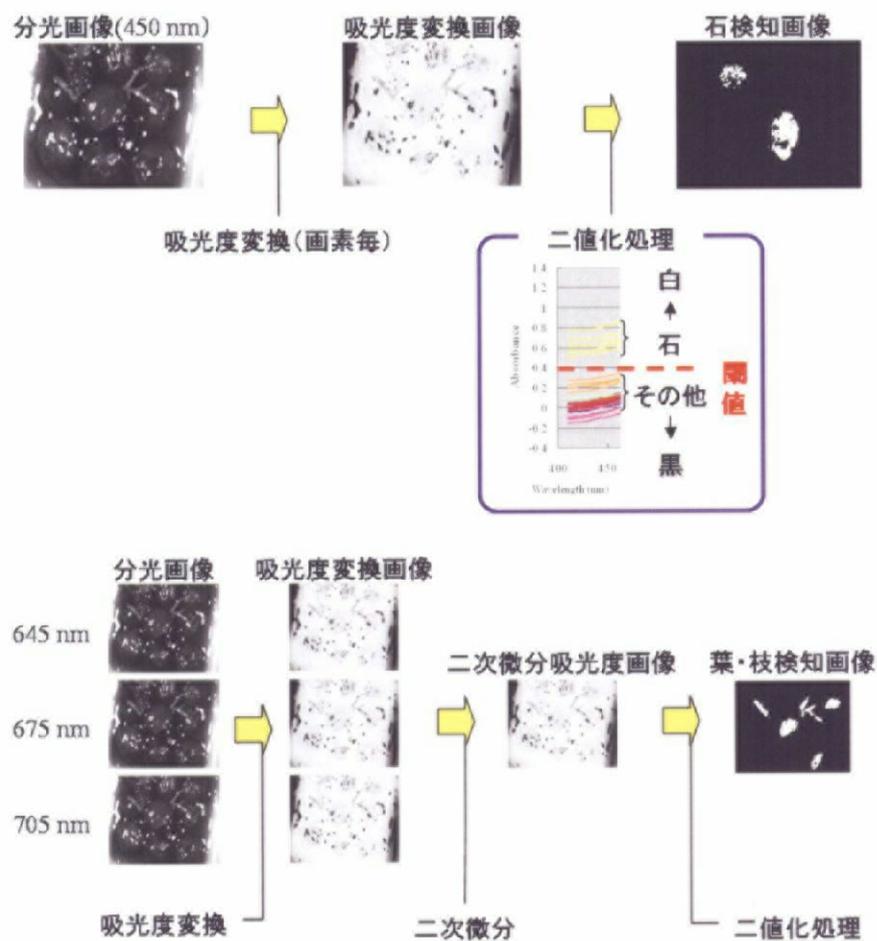


図 3-12 異物検知画像の作成手順 (上: 石、下: 葉及び枝)

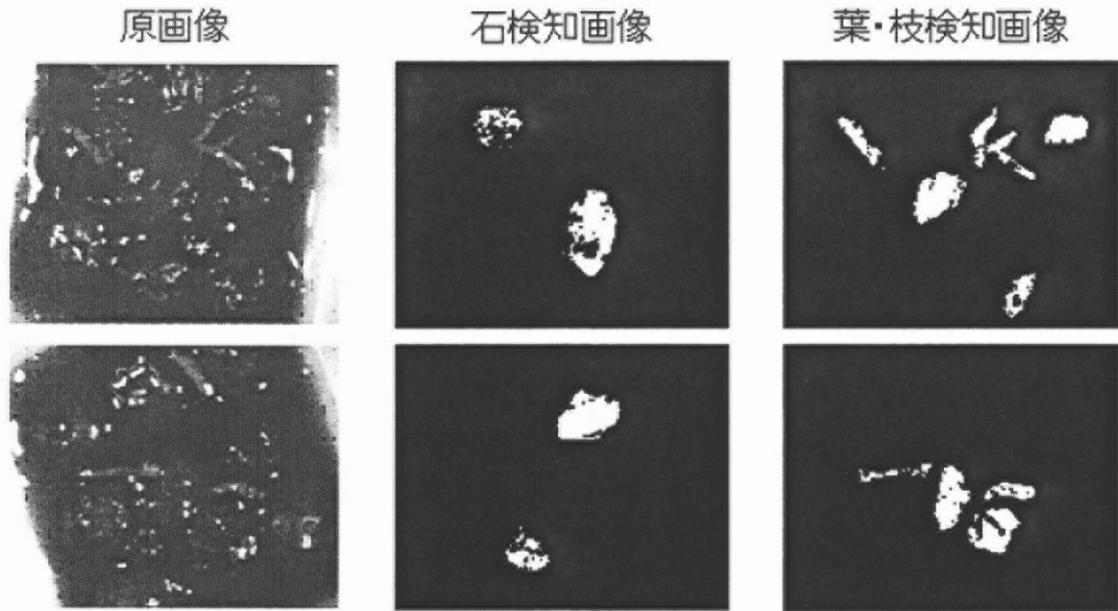


図 3-13 異物検知画像

3-4-3 フィージビリティスタディ

1) 目的

以上で開発した異物検知技術は、12 mm×9 mm の範囲を対象としている。一方、実際の加工現場で検知を行うためには、ベルトコンベア上を流れる広範囲の果実を対象としなければならない。そこで、実際の加工現場への適用可能性を検討するため、フィージビリティスタディを行った。

2) 実験装置

図 3-14 に示すように、前節で述べたメロンの糖度分布可視化で用いたシステムと同様にして、冷却 CCD カメラにカメラレンズを取り付け、そこに液晶チューナブルフィルタを装着したシステムを構築し、120 mm×160 mm の範囲を計測可能なシステムを構築した。この範囲にはブルーベリー果実を約 200 個敷き詰めることが可能である。

3) 試料

異物として、混入に対する消費者のクレームが最も多い葉及び枝を用いることとした。3-4-1 項で述べた手順と同様にしてブルーベリー果実を解凍し、生じた果汁で葉及び枝を染色して供試材料とした。

4) 分光画像の撮影

まず、標準白色板の表面がなるべく均一に照明されるよう、照明装置の位置を調整した。次に、葉及び枝の検知に有効であることが明らかとなった 675 nm とその前後の 645 nm、705 nm の 3 波長で、標準白色板を撮影した。ピニングサイ

ズは 4×4、画像サイズは 192×128 画素とし、露光時間は 0.37 秒とした。最後に、標準白色板の上に果実を置き、さらに撮影範囲の四隅及び四辺の中央を含む計 12 カ所の果実上に葉及び枝を載せ、標準白色板と同じ条件で分光画像を撮影した。

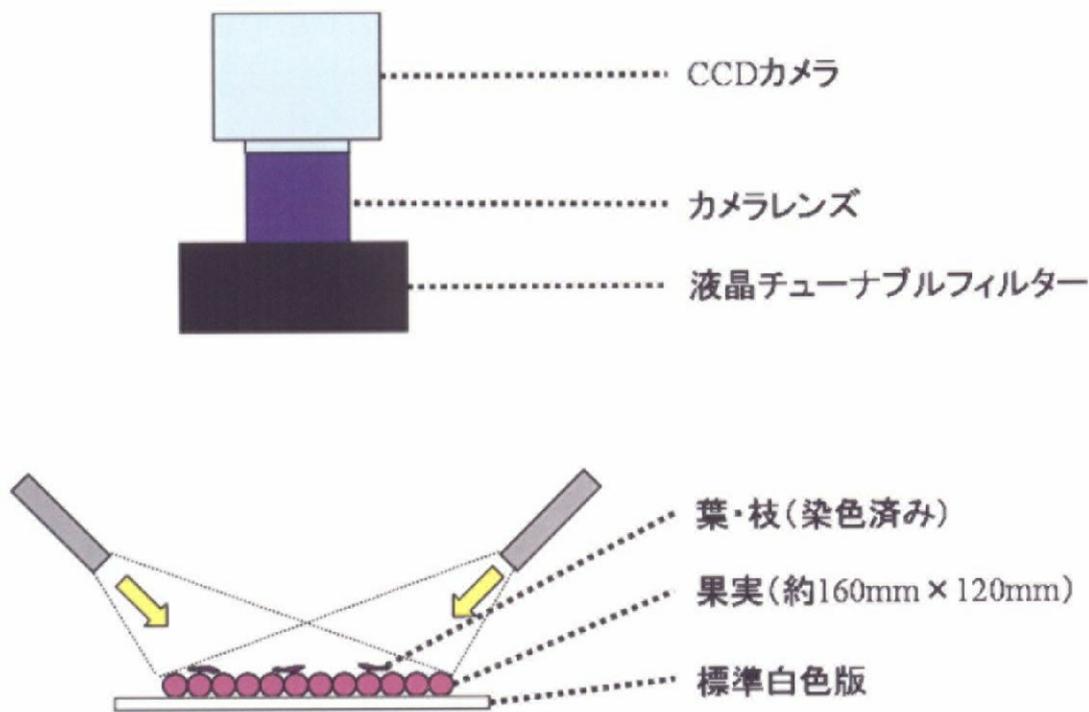


図 3-14 フィージビリティスタディ用計測システム

5) 異物検知画像の作成

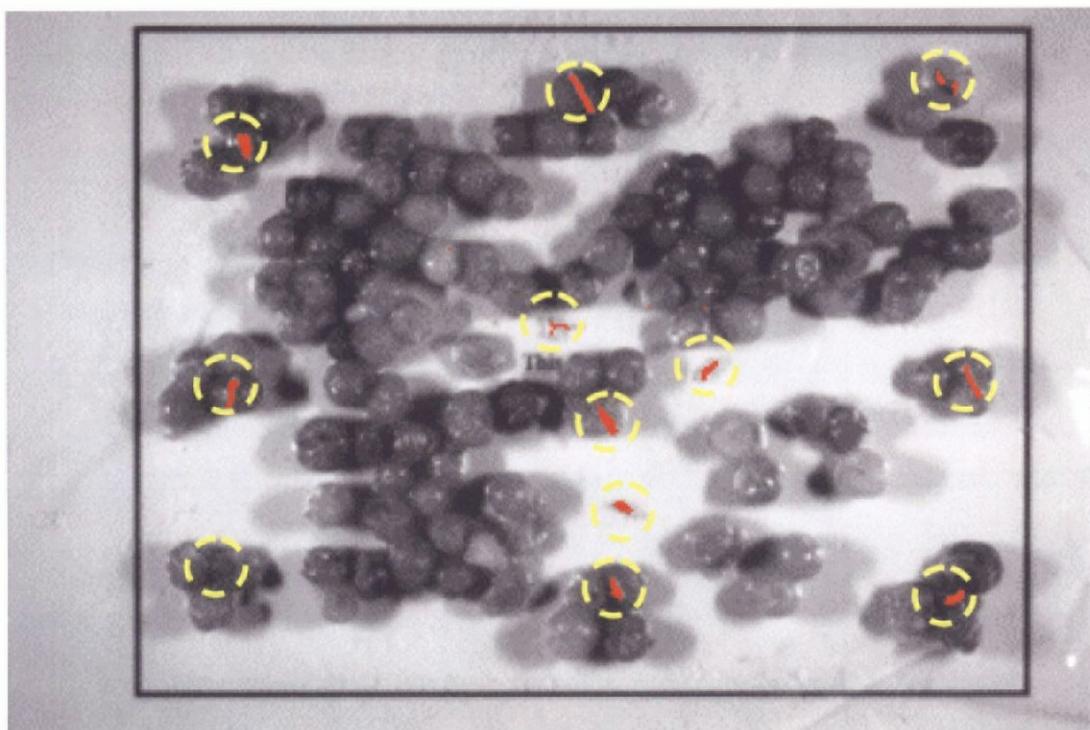
前項で述べた方法と同様にして、分光画像の各画素における 2 次微分吸光度を算出し、二値化処理を行って図 3-15 に示す異物検知画像を作成した。

6) 結果及び考察

異物検知画像において、12 個の葉・枝のうち 11 個が白く表示されており、本研究で開発した異物検知手法が広範囲の果実に対しても有効であることが明らかとなった。一方、検知できなかった葉は、中央部よりも照明強度の弱い撮影範囲の左下に位置していた。したがって、照明ムラの影響が画像処理によって除去しきれなかったため、正確に検知できなかった可能性がある。

7) 安全性評価への展開

本研究の検知対象は主に葉・枝であり、直接人体に危害を及ぼす物質ではない。しかしながら、カビなどの様々な危害物質や、腐敗などの品質劣化に伴う吸光スペクトルを特定した上で本手法を適用することにより、様々な食品の安全性評価に応用可能が期待される。例えば、米等の小型の農産物に対する全数検査や、ほうれん草等の不定形な農産物の検査などが考えられる。



 葉・枝の位置

 画像処理による検知位置

図 3-15 フィージビリティスタディにおける異物検知結果

3-5 まとめ

- 1) 既往の研究例から、下記 3 点の近赤外分光イメージング手法の課題を明らかにした。

(1) 物質の光吸収が大きい長波長領域 (1,800 nm 以上) における透過スペクトル測定においては、安定した計測が困難な上、位置情報の取得とスペクトル測定に大きなコストを要する。

(2) XY 走査法や一次元位置情報-スペクトル同時取得法は位置情報の取得に長時間を要するため、青果物などの品質が変化しやすい対象の計測には不向きである。

(3) バンドパスフィルタによる分光方式の場合、対象成分の吸収帯特定には近赤外分光分析装置による前実験が必要である上、実験条件の変化に伴う吸収帯のシフトや、多様な青果物・他の成分分布可視化に対応できない。

- 2) 上記の課題を解決するため、「近赤外高速ハイパースペクトルシステム」の開発と、食品を対象とした近赤外分光イメージング手法への適用法を提案した。

- 3) 本システムの特徴は、下記の4点である。
 - (1) 検出器が比較的安価であり、物質の光吸収が少ない近赤外領域のうち波長範囲400~1,100 nmのスペクトル測定を行う。
 - (2) 試料厚さの影響が少ない反射スペクトル測定を行う。
 - (3) 位置情報の取得を高速化するため、イメージ撮影法を採用する。
 - (4) 吸収帯の特定から成分分布可視化までを一括して行うため、また様々な青果物や成分に対応するため、連続スペクトルが測定可能な分光法を採用する。

- 4) 本システムを応用し、メロンの果肉断面における糖度分布を可視化した。得られた検量線の精度は高く、糖度分布の可視化画像は実際の糖度分布を正確に反映していると考えられたので、本システムを用いて精度の高い検量線の作成と様々な食品の成分分布可視化が可能であることが明らかとなった。

- 5) 本システムを応用し、ブルーベリー果実原料に混入する異物の検知技術を開発した。その結果、異物を正確に検知でき、加工現場で要求される広範囲の検査にも適用可能であることが明らかになったので、様々な食品の安全性評価に応用可能であると考えられる。

第4章 マルチバンドイメージスキャナの開発とその応用⁴³⁾

4-1 新規手法の提案

第3章では、近赤外高速ハイパースペクトルシステムを開発し、それをメロンの糖度分布可視化及びブルーベリー果実原料中の混入異物検知に応用した。その結果、本システムが食品の成分分布可視化及び安全性評価に有効であると考えられた。しかしながら、本システムには下記の課題が残された。

- 1) サンプルの位置決めと保持、CCDカメラの焦点調節などの作業に熟練を要する。
- 2) サンプルの撮影面を均一に照明するのは困難であり、画像処理を行っても、照明ムラによる測定誤差を完全に除去することはできない。
- 3) CCD素子の冷却温度や環境温の変動により CCD素子の感度が変化するため、経時的な測定誤差が生じる^{44)、45)}。

そこで本研究では、取り扱いが簡便で、常に一定の条件で対象をスキャンするイメージスキャナに着目し、任意波長におけるサンプルのスキャンを安定して行う「マルチバンドイメージスキャナ」を開発して、その有効性を検証するため、メロンの糖度分布可視化に取り組んだ。

4-2 イメージスキャナの特性⁴⁶⁾

書類や写真、フィルムをデジタル画像ファイルとして取り込むイメージスキャナは、デジタルカメラと並ぶデジタル画像入力装置である。本研究では、市場で最も普及しているフラットヘッドタイプのイメージスキャナをベースに、マルチバンドイメージスキャナの開発を行うこととした。まず、フラットヘッドタイプのイメージスキャナの概要について述べる。

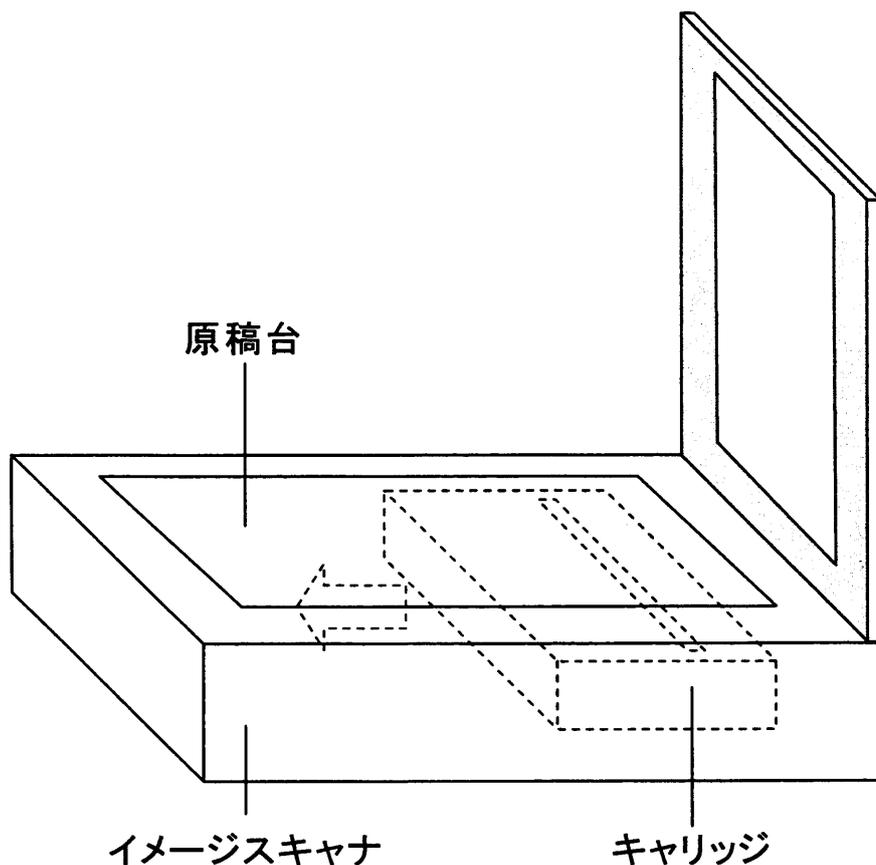


図 4-1 フラットヘッド型イメージスキャナのご概念図

4-2-1 構造

図 4-1 にフラットヘッドタイプのイメージスキャナのご概念図を示す。このタイプのイメージスキャナにはキャリッジと呼ばれる箱が内蔵されており、図 4-2(a) に示すように、この中に光源、ミラー、レンズ及び CCD ラインセンサよりなる光学系が配置されている。CCD ラインセンサには数千個のフォトダイオードが直線状に配列されており、イメージスキャナ上に置かれたサンプルの画像情報を一次的に取得する。これを主走査と呼ぶ。また、キャリッジ全体を CCD ラインセンサの配列と直角な方向に移動することにより、サンプル全体の 2 次元的な画像情報を得ることが可能である。これを副走査と呼ぶ。副走査の際、キャリッジ内の光学系とサンプル間の距離及び角度は常に一定に保たれるため、光源の光量変動が生じない限り、スキャン画像における副走査方向の輝度ムラは発生しない。

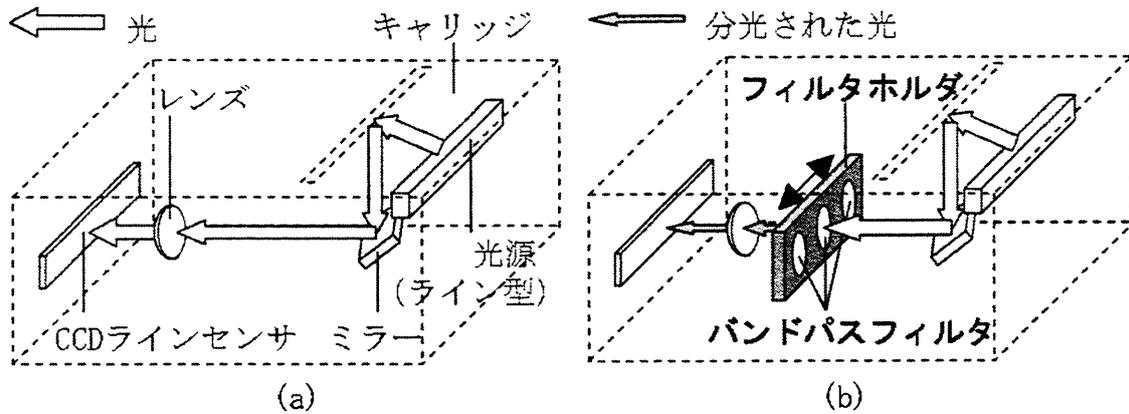


図 4-2 キャリッジ内の光学系配置

(a: 通常のイメージスキャナ、b: マルチバンドイメージスキャナ)

4-2-2 シェーディング補正

サンプルをなるべく均一に照明するため、図 4-2 (a) に示すように、イメージスキャナにはライン型の光源が搭載されている。しかしながら、サンプルにおける照度分布には若干のムラが生じる⁴⁷⁾。また、レンズのコサイン 4 乗則により、レンズの周辺部を透過する光は中心部を透過する光よりも暗くなる⁴⁸⁾。さらに、CCD ラインセンサの個々のフォトダイオードには感度ムラがあり、暗電流ノイズの大きさもまちまちである^{32)、33)}。したがって、CCD ラインセンサに入力される画像信号には、これらの不均一要因を反映した強度ムラが生じていると考えられる。そこで、スキャンに際しては、以下の手順でシェーディング補正と呼ばれる画像校正が行われる。まず、サンプルスキャンに先立ち、イメージスキャナに内蔵された一様な反射率からなる標準白色板をスキャンし、その輝度値を白基準 (l_w) とする。また、ランプを消灯してスキャンすることにより黒基準 (l_b) を計測する。次に、サンプルをスキャンして画像の入力データ (l_{in}) を得る。以上で得られたデータに対し、下記の式 4-1 を適用して、シェーディングを補正した出力データ (l_s) を得る。

$$l_s = 2^N \times (l_{in} - l_b) / (l_w - l_b) \quad \dots(4-1)$$

(N : A/D変換のビット数)

すなわち、画像の入力データ及び白基準から黒基準を差し引くことによって暗電

流ノイズによる誤差を除去し、前者を後者で除算することによって、画像の入力データを白基準で標準化する。次に、イメージスキャナの階調度乗じることにより、出力データに変換する。以上の過程を各画素に適用することにより、CCDラインセンサの画素間の輝度ムラ、すなわち主走査方向の輝度ムラを校正した出力データが得られる。また、シェーディング補正はサンプルスキャン毎に行われるので、電圧・室温などの環境変動に伴う経時的な測定誤差も低減されるものと考えられる。

4-2-3 γ 補正

コンピュータ等のディスプレイにおいて、入力信号 (i_{in}) と画面上の輝度値 (i_{out}) には

$$i_{out} = i_{in}^\gamma \quad \dots (4-2)$$

の関係が成り立つ。このような入出力特性は γ 特性と呼ばれ、 γ 値の大きさが特徴づけられる⁴⁹⁾。ディスプレイにおいては γ の値は 1 よりも大きく、入力信号-出力信号曲線は下に凸となるので、入力信号強度が半分になると、画面上の輝度値は半分よりも暗くなる。そこで、イメージスキャナで取得したサンプルの反射率とディスプレイ上の輝度値の関係を線形にするため、下記の式 4-3 に示すように、イメージスキャナはシェーディング補正されたデータ (l_s) を $1/\gamma$ 乗した値を最終的な出力データ (l_{out}) として出力する。

$$l_{out} = l_s^{1/\gamma} \quad \dots (4-3)$$

この結果、 i_{out} と l_s の関係は下記の式 4-4 の示すように線形となり、サンプルの反射率はディスプレイ上で正確に再現される。

$$i_{out} = i_{in}^\gamma = \alpha \times l_{out}^\gamma = \alpha \times (l_s^{1/\gamma})^\gamma = \alpha \times l_s \quad \dots (4-4)$$

(α : イメージスキャナとディスプレイ間のデータ転送特性)

以上の過程は γ 補正と呼ばれ、ディスプレイ上での表示を前提とした通常のスキャン画像取り込みにおいては自動的に行われる。

4-3 マルチバンドイメージスキャナの開発

4-3-1 構造と特徴

本研究では市販のイメージスキャナ（セイコーエプソン製 ES-2200）をベースに、図 4-2 (b) に示すように、キャリッジ内のミラーとレンズの間にバンドパスフィルタを挿入することにより、任意の波長におけるスキャン画像の取得が可能なマルチバンドイメージスキャナを開発した（図 4-3 (左)）。バンドパスフィルタは図 4-3 (右) に示すフィルタホルダに 3 枚搭載可能であり、フィルタホルダを左右にスライドさせることにより、スキャン波長を選択することが可能である。また、副走査時の光量変動を極力抑えるため、光源には定電圧電源を搭載したハロゲンランプを用いた。本装置の最大スキャン寸法は 216 mm×297 mm、最大有効画素数は 13,600×18,720 画素（1,600dpi 時）であり、その際の実効解像度は約 32 μm である。また、本装置の階調度は 16bit（65,536 段階）であり、従来の近赤外分光分析装置と同等であるので、本装置は近赤外分光分析による定量解析にも利用可能であると考えられた。さらに、本装置はイメージスキャナとしての特性を備えているため、輝度ムラがなく、経時的な測定誤差の少ない、安定した計測が期待された。

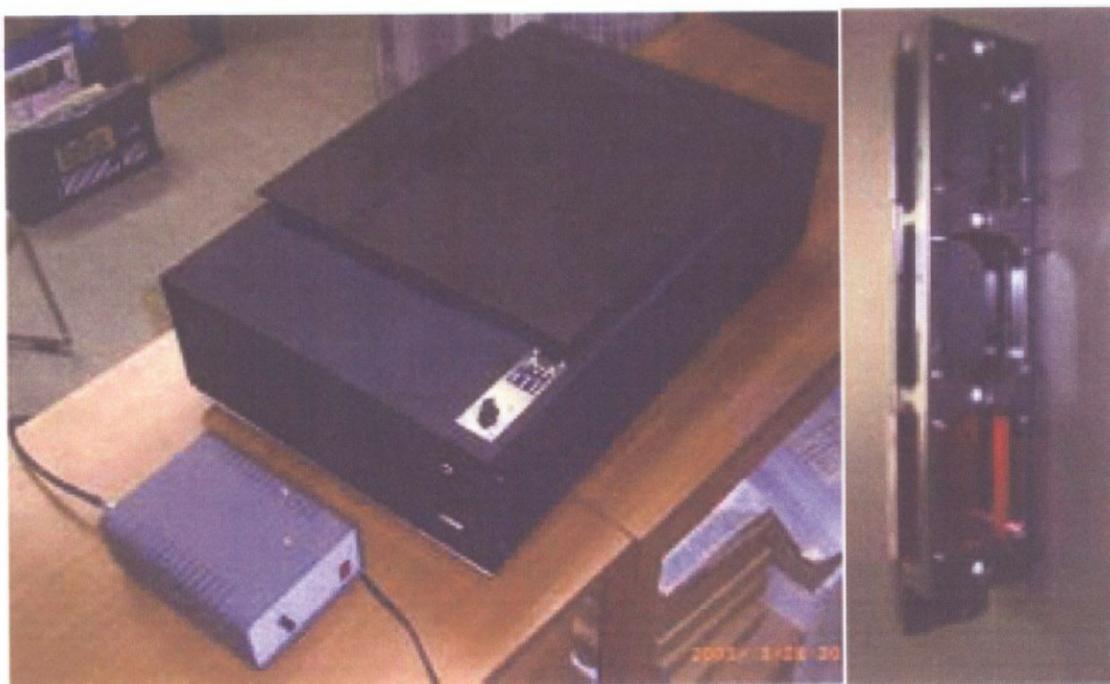


図 4-3 マルチバンドイメージスキャナ (左) とバンドパスフィルタホルダ (右)

4-3-2 γ 特性の検証実験

4-2-3 項で述べたとおり、イメージスキャナにおいては出力画像に対して自動的に γ 補正が適用される。マルチバンドイメージスキャナを用いて近赤外分光法で定量解析を行うためには、 γ 補正を無効化してデータを線形化する必要があると考えられたが、そのためには「twain」と呼ばれるイメージスキャナのデータ転送仕様を学び、特殊なプログラムを構築する必要があった。そこで、出力画像に対して再度 γ 補正を行い、サンプルの反射率と出力データ間の線形性を確保することとした。イメージスキャナの γ 補正における γ 値の大きさを検証するため、予備試験を行った。具体的には、反射率が既知の標準板を複数用意し、それぞれをマルチバンドイメージスキャナにてスキャンした。出力画像の輝度値と実際の反射率を比較することにより、 $\gamma=1.8$ であることが確認された。よって、出力画像に対して $\gamma=1/1.8=0.56$ となるように再度 γ 補正を適用することにより、定量解析に必要なデータの線形性が確保されることが明らかとなった。

4-4 メロンの糖度分布可視化への応用⁵⁰⁾

4-4-1 実験手順

1) サンプル

本装置の有効性を確認するため、メロンの糖度分布可視化を試みた。高知県産アンデスメロン（緑肉）及び熊本県産クインシーメロン（赤肉）を用いた。品温変動による測定誤差の低減を図るため、それぞれ室温 25℃で一昼夜放置した後、実験に供試した。

2) 果肉断面の分光スキャン

まず、マルチバンドイメージスキャナのフィルタホルダに、糖度と吸光度が逆相関関係にある 676nm のバンドパスフィルタ（エドモンド・オプティクス・ジャパン製 43192-E）を装着した²⁵⁾。次に、サンプルを半分に分割し、その切断面を 300 dpi にてスキャンし、果肉断面のスキャン画像を得た（図 4-4 (a) 及び (b)）。

3) 画像処理

定量解析に必要なデータの線形性を確保するため、得られたスキャン画像の γ 値が 0.56 になるように、 γ 特性を再補正した（図 4-4 (c)）。さらに、吸光度の定義に従い、得られたスキャン画像の各画素に下記の式 4-5 を適用することにより、図 4-4 (d) に示す吸光度画像を得た。

$$\text{吸光度} = -\log_{10} \left(\frac{\text{サンプルの輝度値}}{\text{標準白色板の輝度値}} \right) = \log_{10} \left(\frac{65,535}{\text{サンプルの輝度値}} \right) \dots (4-5)$$

ここで、標準白色板の輝度値が 65,535 となっているのは、式 4-1 において標準白色板の輝度値がサンプル輝度値の基準になっており、かつ本装置において N=16 であるためである。

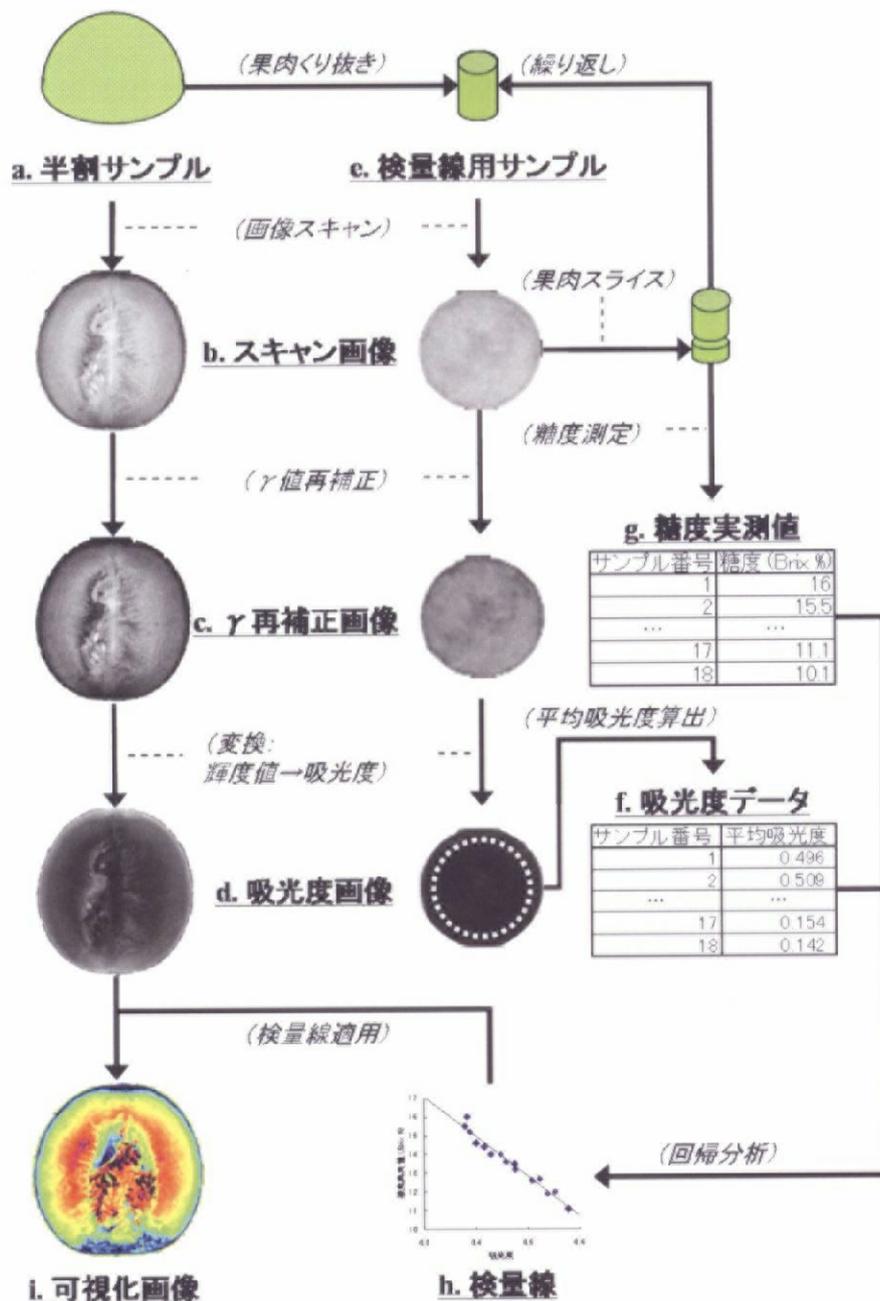


図 4-4 糖度分布の可視化手順

4) 検量線の作成

断面をスキャンしたサンプルより円柱状に果肉を抜き取り、これを検量線用サンプルとしてその内側果肉断面をスキャンした(図 4-4 (e) 及び (b))。得られた画像の γ 値を再補正したのち、各画素に式 4-5 を適用して吸光度画像に変換した(図 4-4 (c))。次に、図 4-4 (c) に示す白点線の範囲内にある画素の平均吸光度を算出した(図 4-4 (f))。さらに、スキャンした部分から 1mm 厚のスライスを切り出し、3-3-1 項 3) と同様にして果汁を絞り、その糖度をデジタル糖度計(アタゴ製 PR-100)で測定した(図 4-4 (g))。以上の作業を果肉の内側から果皮付近まで繰り返すことにより、検量線用サンプルの様々な深さにおける吸光度と糖度実測値を得た。さらに、両者に線形回帰分析を適用し、図 4-5 に示す吸光度と糖度の検量線を作成した。

5) 糖度分布の可視化

作成した検量線を、半割サンプル断面の吸光度画像の各画素に適用し、吸光度を糖度に変換した。さらに、糖度の大小をカラーマッピングすることにより、図 4-6 に示す糖度分布の可視化画像を得た。なお、サンプルの分光スキャンから糖度分布の可視化に至る過程のうち、スキャン画像の取得及び γ 特性の再補正には画像処理ソフト(Adobe Inc.製 Adobe Photoshop 6.0)、吸光度画像の作成、平均吸光度算出及び糖度分布の可視化には数値解析ソフト(The MathWorks Inc.製 MatLab 6.1)、回帰分析及び検量線の作成には表計算ソフト(Microsoft Inc.製 Microsoft Excel 2002)を用いた。

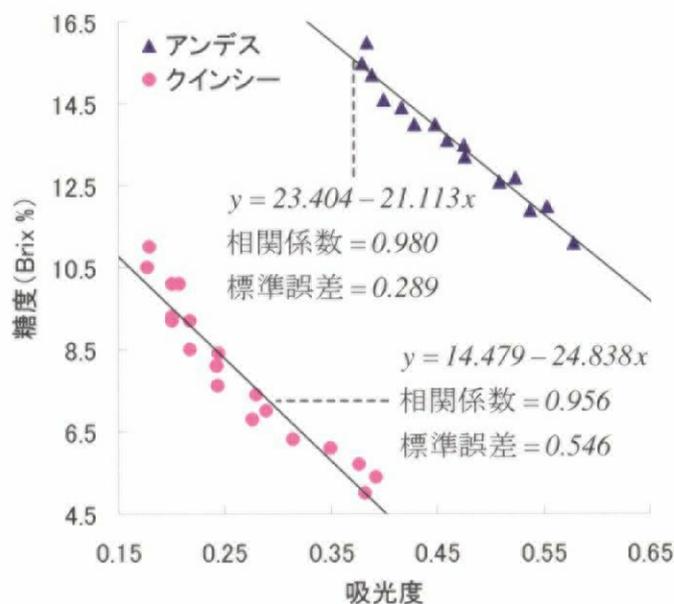


図 4-5 吸光度と糖度の検量線

4-4-2 実験結果及び考察

1) 糖度の検量線

図 4-5 に示すように、検量線の相関係数はアンデスメロンで 0.980、クインシーメロンで 0.956 であり、従来の近赤外分光装置を用いた果実の糖度推定とほぼ等しい精度であった^{34)、35)、36)、37)、51)}。これは、マルチバンドイメージスキャナの階調度が近赤外分光装置と同程度であり、吸光度の微少な差を捉えることが可能であること、さらに、サンプルスキャン毎のシェーディング補正により、経時的な誤差が低減されたことによるものと考えられる。

2) 糖度分布の可視化画像

図 4-6 に示す糖度分布の可視化画像において、糖度分布の異常な勾配は見られないことから、照明ムラなどの空間的な誤差要因は除去されたと考えられた。これは、マルチバンドイメージスキャナがイメージスキャナの特性を兼ね萎えており、シェーディング補正による画像校正と、光学系とサンプル間の距離及び角度が常に一定に保たれるという特性から、主走査方向・副走査方向双方の輝度ムラがほぼ生じなかったためと思われる。また、検量線の精度が高いことと、アンデスメロン及びクインシーメロンの糖度分布可視化画像における糖度の範囲が、検量線用サンプルの実測糖度の範囲（アンデスメロン 11.1~16.0、クインシーメロンで 5.0~10.5）とほぼ等しいことから、実際の糖度を反映した正確な糖度分布可視化画像が構築されたと考えられた。さらに、近赤外高速ハイパースペクトルシステムよりも高精細な画像が取得可能になったため、アンデスメロンの断面において、果肉上部の水平方向に走る繊維状組織の糖度が周囲よりも高くなっている様子が明らかになるなど、より細かい構造・成分分布解析が可能となった。

以上のことから、マルチバンドイメージスキャナは安定・高精度・高精細という特徴を有し、近赤外分光イメージングによる成分分布可視化に有用であることが明らかとなった。また、現在市販されているイメージスキャナの解像度は 4,800dpi（約 10.5 μm /1 画素相当）であり、今後も解像度の向上が予想されること、またその取り扱いが簡便であることから、簡易型分光顕微鏡として利用可能なマルチバンドイメージスキャナの開発も可能であると考えられる。今後は、様々な食品における成分分布可視化に、マルチバンドイメージスキャナを応用することが期待される。

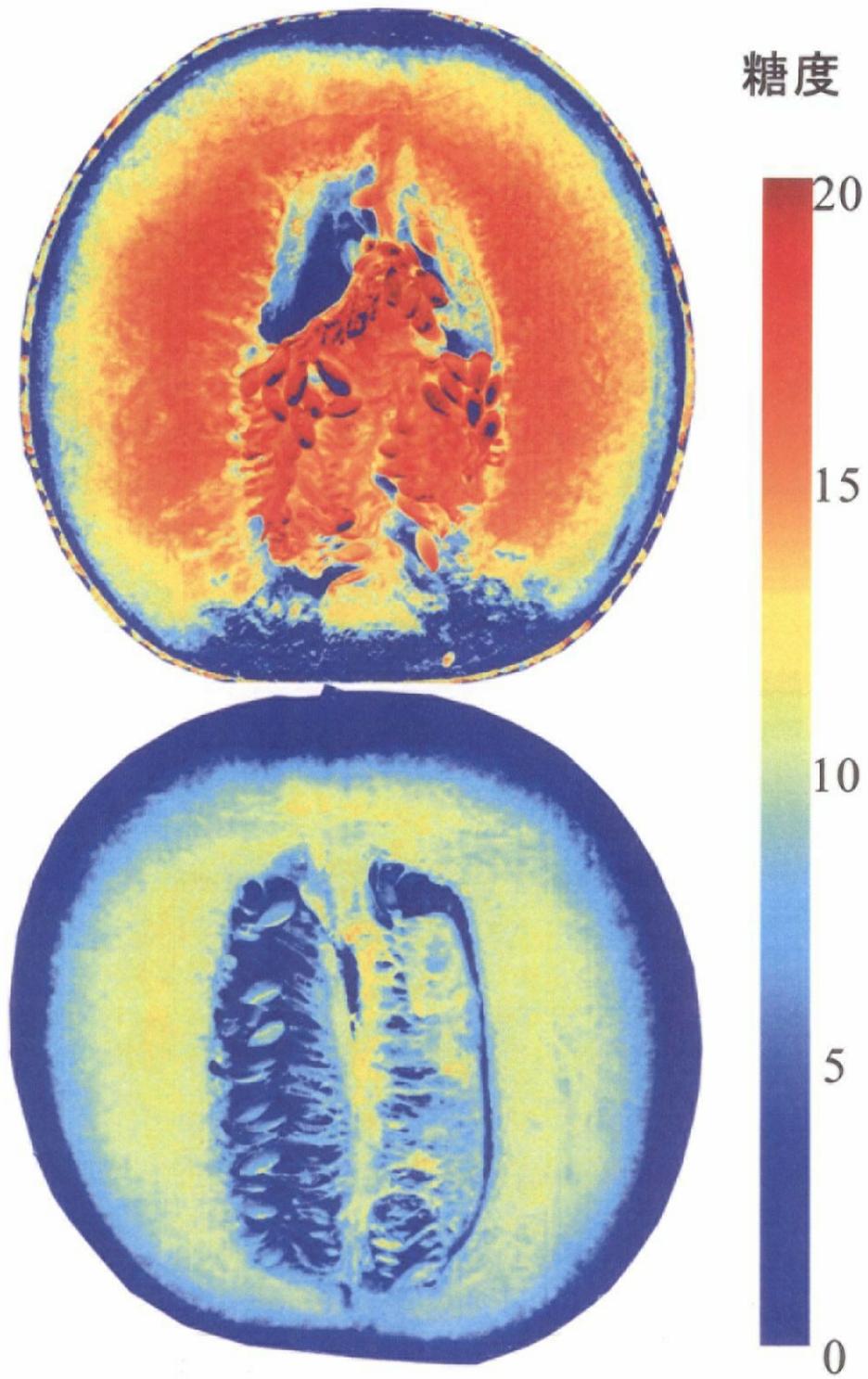


図 4-6 メロンの糖度分布可視化画像
(上：アンデスメロン、下：クインシーメロン)

4-5 まとめ

- 1) 第3章で開発した「近赤外高速ハイパースペクトルシステム」には、下記3点の課題が残された。
 - (1) サンプルの位置決めと保持、CCDカメラの焦点調節などの作業に熟練を要する。
 - (2) サンプルの撮影面を均一に照明するのは困難であり、画像処理を行っても、照明ムラによる測定誤差を完全に除去することはできない。
 - (3) CCD素子の冷却温度や環境温の変動によりCCD素子の感度が増減するため、経時的な測定誤差が生じる。

- 2) 上記の課題を解決するため、取り扱いが簡便で、常に一定の条件で対象をスキャンするイメージスキャナに着目し、市販のフラットヘッド型イメージスキャナをベースにして、任意波長におけるサンプルのスキャンを安定して行う「マルチバンドイメージスキャナ」を開発した。

- 3) 本システムは3枚のバンドパスフィルタを装着可能なフィルタホルダを内蔵しており、任意の波長で対象をスキャンすることが可能である。また、イメージスキャナとしての特色を兼ね備えているため、輝度ムラがなく、経時的な測定誤差の少ない安定した計測で、高精細な分光画像を取得可能である。

- 4) 本システムを用いてメロンの果肉断面における糖度分布を可視化した。得られた検量線の精度は高く、実際の糖度を反映した正確な糖度分布可視化画像が構築されたと考えられた。また、得られた可視化画像は近赤外高速ハイパースペクトルシステムよりも高精細であった。

- 5) イメージスキャナは取り扱いが簡便であり、今後も解像度の向上が予想されることから、簡易型分光顕微鏡として利用可能なマルチバンドイメージスキャナの開発も可能であると考えられる。今後は、様々な食品における成分分布可視化に、マルチバンドイメージスキャナを応用することが期待される。