

## 第5章 励起-蛍光マトリックスイメージング手法の開発とその応用

### 5-1 吸光スペクトルと励起・蛍光マトリックス

励起・蛍光マトリックス (Excitation-Emission Matrix : EEM) は、対象の蛍光強度を、励起波長及び蛍光波長を独立して走査しながら計測して得られる等高線状のグラフである (図 5-1)。EEM は励起波長、蛍光波長及び蛍光強度の互いに直交する 3 軸からなる 3 次元のデータであり、波長と吸光度からなる 2 次元データである吸光スペクトルと比較するとその情報量は膨大である。また、EEM 計測においては吸光と発光という二つの過程を観察することになるので、吸光のみを観察する吸光スペクトルに比べて、定性的にも詳細な情報が得られると考えられる。したがって、EEM と位置情報を同時に取得し解析する「EEM イメージング手法」を開発することにより、近赤外分光イメージング手法よりも詳細に成分分布を可視化できると考えられる。EEM イメージング手法の基礎となる蛍光測定の実理について次節に述べる。

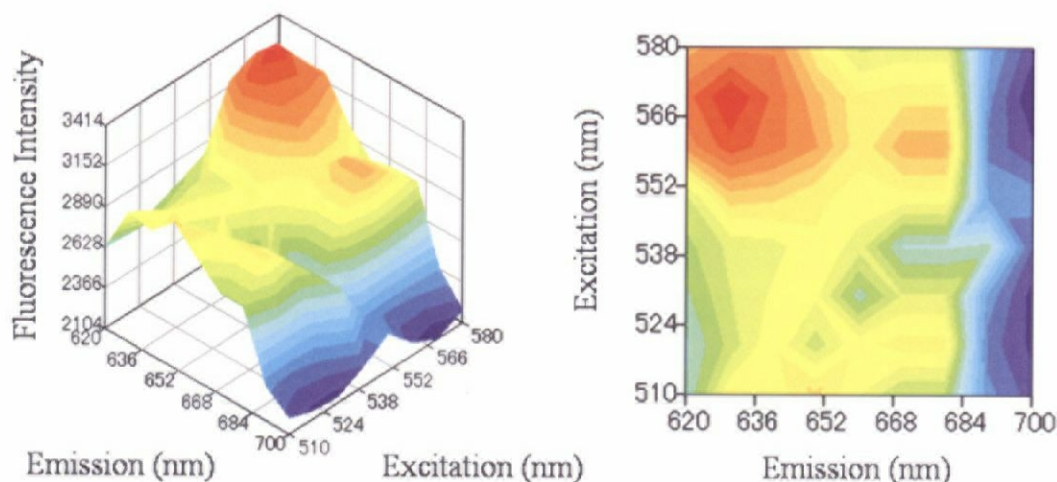


図 5-1 ローダミン B の EEM (左 : 3 次元表示、右 : 俯瞰図)

### 5-2 蛍光測定の実理<sup>52), 53)</sup>

#### 5-2-1 ルミネッセンス

2-2-2 項で述べたとおり、近赤外スペクトルは分子が基準振動や倍音振動に相当するエネルギーを吸収し、基底状態  $E_0$  から  $E_1$ 、 $E_2$ ... のエネルギー準位に遷移す

るため観察される。光によってエネルギー準位が遷移するとき、これを励起と呼び、励起を引き起こす光を励起光と呼ぶ。また、 $E_n$  ( $n$  は整数) のエネルギー準位を第  $n$  励起状態と呼ぶ。第  $n$  励起状態は不安定であり、分子はエネルギーを放出して基底状態に戻る。これを失活と呼び、エネルギー放出の形態は熱、回転運動、振動など様々ある。中でも、分子が光を放出して失活するときに観察されるのがルミネッセンスである。

## 5-2-2 蛍光と燐光

ルミネッセンスが生じるとき、分子は第  $n$  励起状態に励起された後(図 5-2①)、失活する前により低い励起状態に遷移する。この遷移を無輻射遷移(図 5-2②)と呼ぶ。無輻射遷移により第 1 励起状態に遷移後、第 1 励起状態から基底状態に失活する際に生じる光を蛍光と呼ぶ(図 5-2b)。第 1 励起状態は非常に不安定であるので、蛍光は励起光が照射されている間のみ観察される。一方、無遷移輻射により三重項状態と呼ばれるエネルギー準位への遷移が生じる場合があり、三重項状態からの失活により生じる光を燐光と呼ぶ(図 5-2c)。三重項状態は第 1 励起状態よりも安定しており、失活するまでに比較的長時間を要する。そのため、燐光は励起光が遮断された後も観察される。なお、無輻射遷移により、蛍光、燐光ともに励起光よりもエネルギーが小さくなり、波長が長くなる。

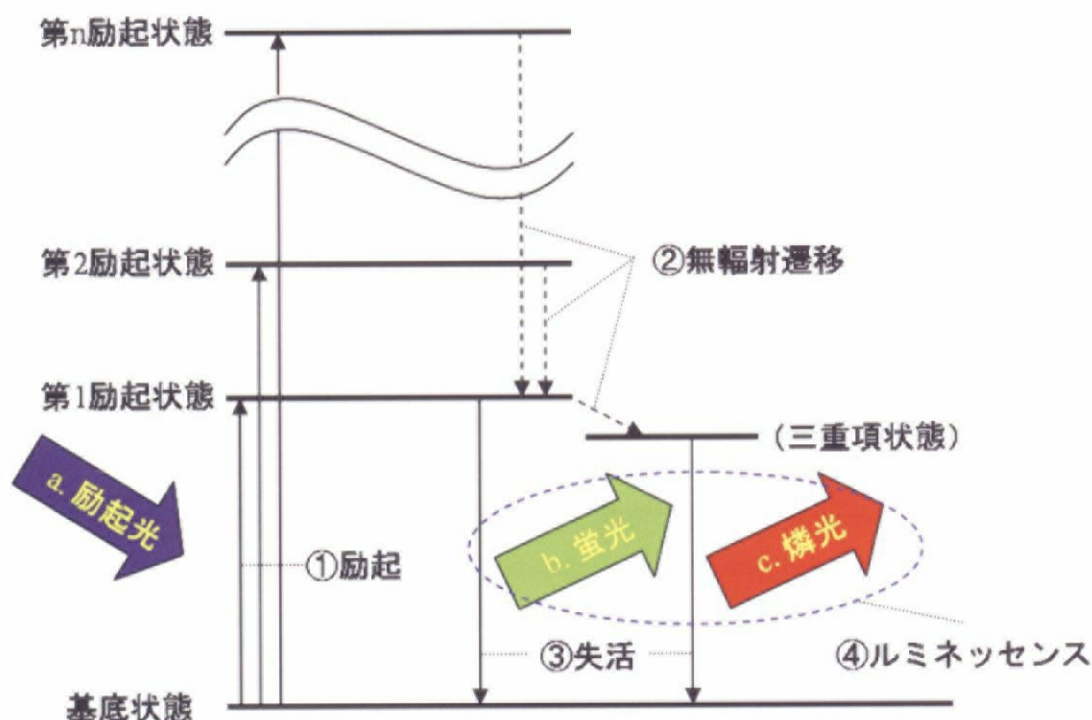


図 5-2 蛍光及び燐光の発生原理

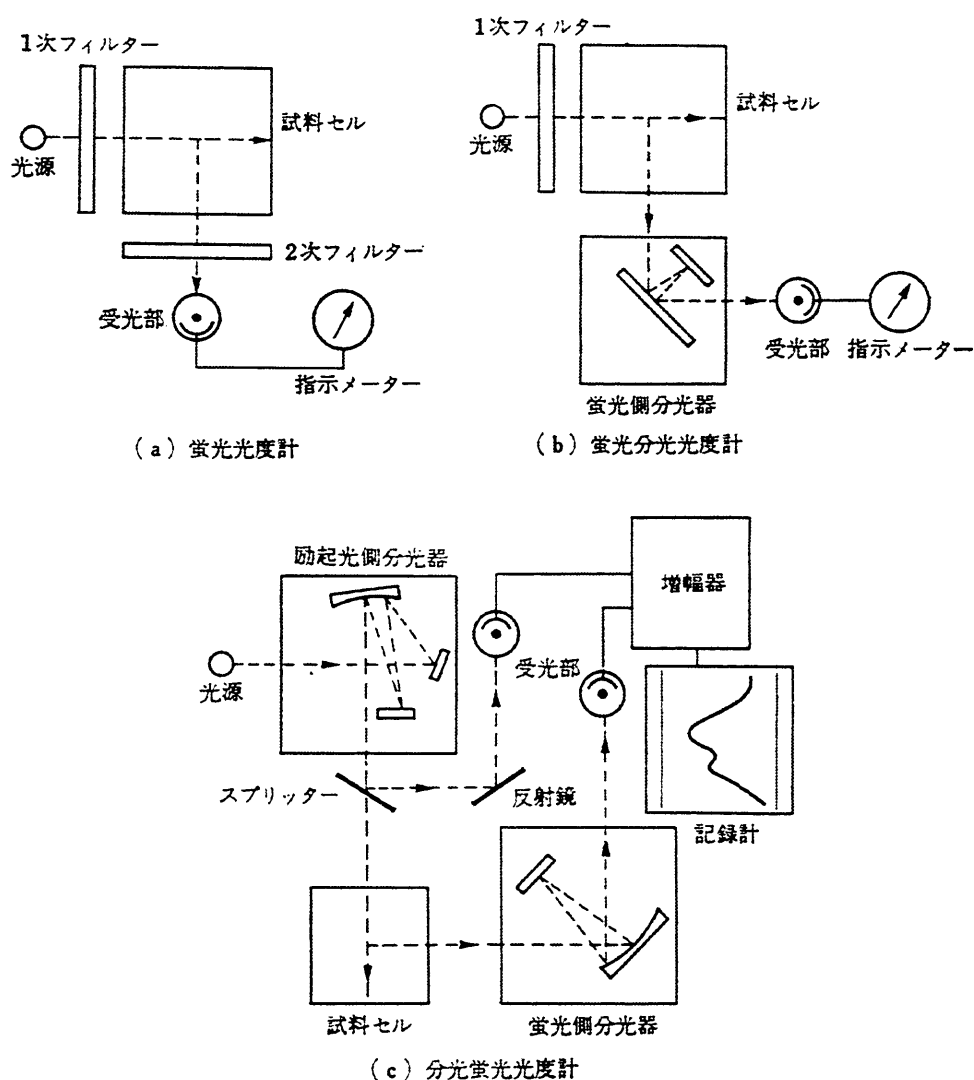


図 5-3 蛍光測定装置の概要<sup>52)</sup>

### 5-2-3 蛍光測定装置

蛍光を測定する装置は蛍光光度計、蛍光分光光度計及び分光蛍光光度計の3種類に分けられる。蛍光光度計は1930年代後半にKlettによって開発された。図5-3

(a)に蛍光光度系の概要を示す。まず、光源から照射された励起光を1次フィルタで分光し、任意の波長で試料セル内の試料を励起する。試料から生じた蛍光は2次フィルタで分光され、任意波長の蛍光を観察することが可能である。しかしながら、様々な励起波長、蛍光波長で観察を行うには、バンドパスフィルタを交換する必要があり、連続した波長で蛍光測定を行うことは困難であった。一方、赤外分光等に用いられる分光計測装置が1940年代に開発され、その発展に伴い、1950年代中頃から分光計測装置の付属品という形で蛍光分光光度計が普及し始め

た。図 5-3 (b) に蛍光分光光度系の概要を示す。光源から試料セルまでの構造は蛍光光度計と同じであるが、生じた蛍光は分光器によって分光されるため、任意の連続した波長で蛍光観察を行うことが可能となった。さらに、1955 年には Bowman の分光蛍光光度計が開発された。図 5-3 (c) に示すように、分光蛍光光度計は励起光側・蛍光側の双方に分光器を備えており、任意の連続した波長で試料を励起し、さらに任意の連続した波長で蛍光観察することが可能である。現在では分光蛍光光度計が普及し、一般的にはこれが蛍光測定に用いられている。

#### 5-2-4 励起・蛍光スペクトルと EEM

蛍光測定を行う際に、分光蛍光光度計の蛍光側分光器を一定波長に固定し、励起側の波長を連続的に変化させながら蛍光を測定すると、励起波長と蛍光強度からなる連続プロットが得られる。これを励起スペクトルと呼ぶ。励起スペクトルが最大となる励起波長は蛍光強度を最大にするための最適励起波長に相当する。また、蛍光の強度は励起光吸収の強度に比例するので、励起スペクトルと吸光スペクトルはほぼ同じ形状となる。一方、励起側分光器を一定波長に固定し、蛍光側の波長を連続的に変化させながら蛍光を測定すると、蛍光波長と蛍光強度からなる蛍光スペクトルが得られる。蛍光スペクトルが最大となる蛍光波長は蛍光強度が最大となる最適蛍光波長に相当する。したがって、励起スペクトルで最適励起波長を探索し、その波長で蛍光スペクトル測定を行って最適蛍光波長を探索することにより、対象を計測するのに最適な励起波長・蛍光波長の組合せを得ることができる。また、励起波長を連続的に変化させながら蛍光スペクトルを計測し、得られた蛍光スペクトルを励起波長毎に並べると、5-1 節で述べた EEM を得ることができる。

### 5-3 EEM 計測の既往研究

5-2-3 項で述べた通り、分光蛍光光度計が普及したため、現在では様々な試料の EEM を計測することが可能となっている。以下では、EEM 計測の既往研究例について述べる。

#### 5-3-1 ホウレンソウ葉の相対含水率計測<sup>54)</sup>

小西らは葉柄から切離したホウレンソウ葉を水ストレス処理し、相対含水率及び EEM の経時変化を計測した。その結果、励起波長によらず、450 nm、680 nm 及び 725 nm に蛍光極大が観察された。それぞれの波長における蛍光強度を F450、



F680 及び F725 とおくと、蛍光強度比 F450/F680 及び F450/F725 は水ストレス初期において増加し、その後減少することが明らかとなった。したがって、F450/F680 または F450/F725 の経時計測が、ハウレンソウ葉の相対含水率計測に最も適していることが明らかとなった。また、EEMを利用して最適な計測波長条件を選択し、蛍光強度を経時的に計測することにより、植物に対する特定のストレスなど、生理機能の情報を取得できる可能性が示された。

### 5-3-2 古代染色遺物・浮世絵の染料同定<sup>55)、56)、57)、58)、59)、60)</sup>

下山らは、分光蛍光光度計に光ファイバーを取り付け、平面状の試料の EEM を非破壊・非接触で計測できる装置を開発した。この装置により、古代の染色遺物や浮世絵版画等の試料と、様々な染料で彩色した標準試料の EEM が計測された。各標準試料の EEM を解析することにより、それぞれの染料に特徴的な蛍光極大と、それに対応する励起極大波長及び蛍光極大波長が明らかとなった(図 5-4 緑矢印)。さらに、試料と標準試料の EEM における励起極大波長及び蛍光極大波長を比較することにより、それぞれの試料に使用された染料を同定する手法が確立された(図 5-4 赤丸及び黄丸)。この手法により、中国製の古代染色遺物及び浮世絵に使用された染料が同定された。また、この手法は、貴重な古代遺物を非破壊・非接触で計測できる上、肉眼や分光反射スペクトルでは同定が困難な同系色の染料も確実に同定可能な点が評価されている。また、EEM が様々な成分同定に有効である可能性が示された。

### 5-3-3 カーバメイト系農薬の検知<sup>61)</sup>

多環式芳香族炭化水素を含む農薬の励起波長帯及び蛍光波長帯は幅広く、従来の蛍光観察法によって同定・定量することは困難であった。そこで、Jiji らは様々な濃度の 1-ナフトール、カリバリル及びカルボフランのメタノール溶液の EEM を計測した。得られた EEM を Parallel Factor Analysis (PARAFAC)と呼ばれる手法で解析した結果、それぞれを同定した上で、定量測定することが可能となった。また、それぞれの検知限界は 1.1 ppb、6.6 ppb 及び 13 ppb であった。この結果、EEM 計測が従来の蛍光観察法に比べて成分同定に有用であることが示された。また、試料調整と計測に時間を要するクロマトグラフィー法に代わり、EEM 計測による迅速な農薬検知が可能になると考えられた。

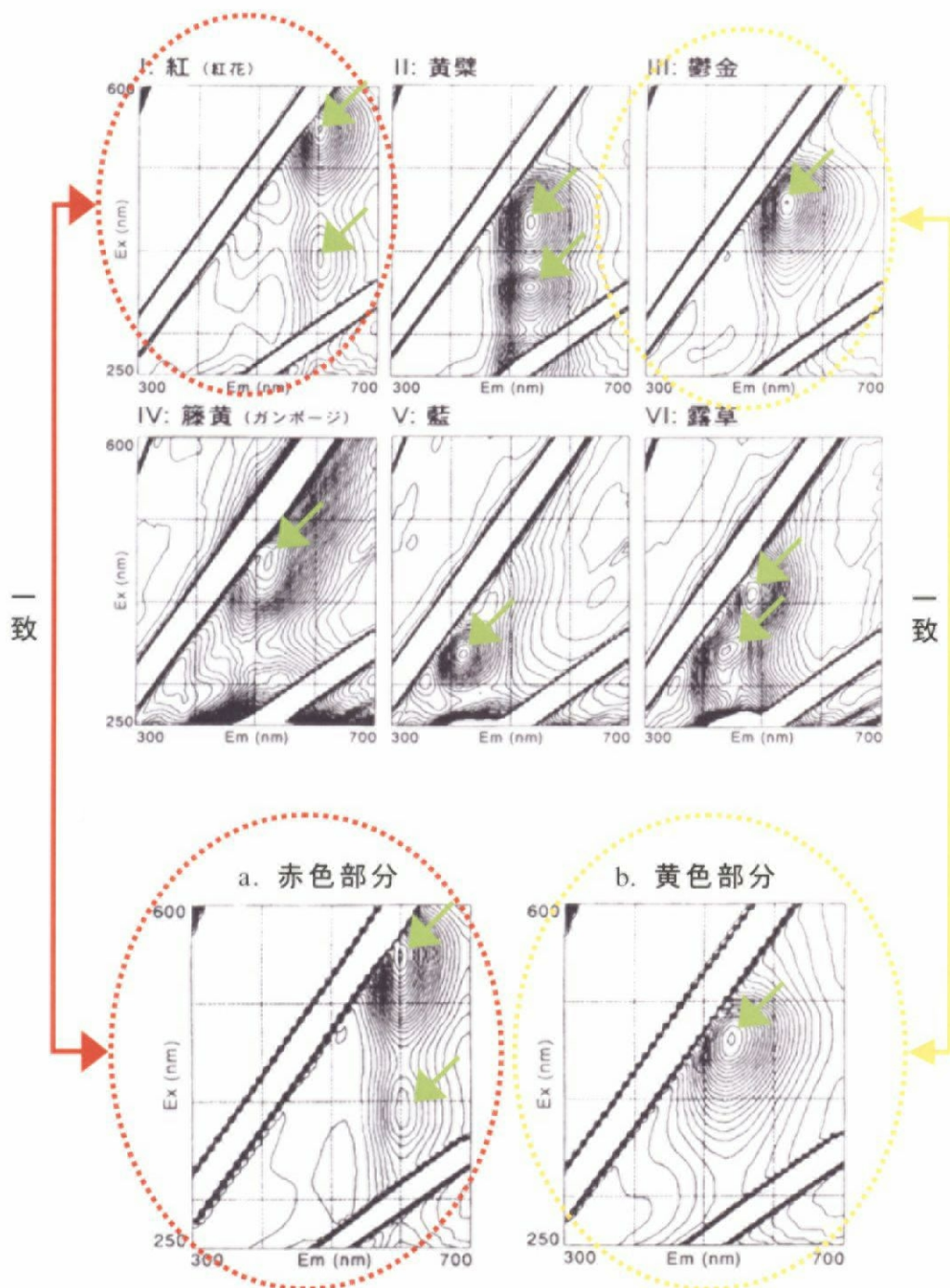


図 5-4 様々な染料の EEM (I ~ VI) と浮世絵の一部の EEM (a、b) <sup>60)</sup>

#### 5-4 新規手法の提案

5-1 節で述べた通り、励起-蛍光マトリックスは分光スペクトルに比べて遥かに情報量が多いので、EEM と位置情報を同時に取得し解析する「EEM イメージング手法」を開発することにより、近赤外分光イメージング手法よりも詳細に成

分分布を可視化できると考えられた。また、既往の EEM 計測に関する研究例から、生理機能の情報取得や成分同定に適しているという EEM の利点が明らかとなった。しかしながら、その課題も明らかとなった。すなわち、

- 1) EEM と位置情報を同時に取得する計測システムを開発した報告例がない。
- 2) EEM は最適計測条件の探索や蛍光極大の比較に用いられることが多く、EEM の膨大な情報量を損なわずに、その特性を解析した研究が数少ない。また、EEM と位置情報を同時に取得して得られる EEM イメージングデータを解析する手法は報告されていない。

という 2 点が挙げられる。そこで本研究では、「3 次元スペクトルイメージングシステム」及び EEM イメージングデータの解析・可視化手法を組み合わせる EEM イメージング手法を開発し、食品試料の計測へ適用することを提案した。

### 5-5 3 次元スペクトルイメージングシステムの開発<sup>62)、63)、64)</sup>

EEM と位置情報を同時に取得する計測システムは、下記の 3 つの特徴を備えている必要があると考えられた。すなわち、

- 1) 任意の波長で対象を励起することが可能。
- 2) 任意の波長で対象の蛍光を観察することが可能。
- 3) 対象の任意の位置を計測可能。

の 3 点である。上記 1)、2) の条件を満たす計測システムとして、3-4-1 項で述べた実体顕微鏡仕様の近赤外高速ハイパースペクトルシステムに、任意の波長で対象を照明する分光照明装置を組み合わせたシステムを構築することとした。図 5-5 に示すように、分光照明装置は 150 W のキセノンランプ光源にグレーティング型分光器を取り付けた装置（相馬光学製特注品）で、照明光の波長を 200～1,000 nm の範囲で任意に設定可能である。また、計測に用いる冷却 CCD カメラは、より高感度かつ高精細であり、IEEE1394 接続により高速なデータ転送が可能な上位機種（浜松ホトニクス製 ORCA-ER-1394）を用いることとした。さらに、上記 3) の条件を満たすために、計測システムとマイクロスライサ（東芝機械製 AST-024s）を組み合わせることとした。図 5-6 に示すように、マイクロスライサはサンプルホルダ、試料を切削する回転型マイクローム及び試料を押し上げるステッピングモータで構成される<sup>65)</sup>。パラフィン等の包埋剤で包埋した試料をサンプルホルダにセットし、その表面をマイクロームで切削する。続いて、ステッピングモータでサンプルを 1～30  $\mu\text{m}$  の任意の高さだけ押し上げる。以上の切削と押し上げを繰り返し行うことにより、試料の任意の深さにおける断面を露出させ

ることが可能である。また、サンプルホルダは、周囲に不凍液を循環させることにより $-15^{\circ}\text{C}$ 程度に冷却でき、凍結試料を観察することも可能である。

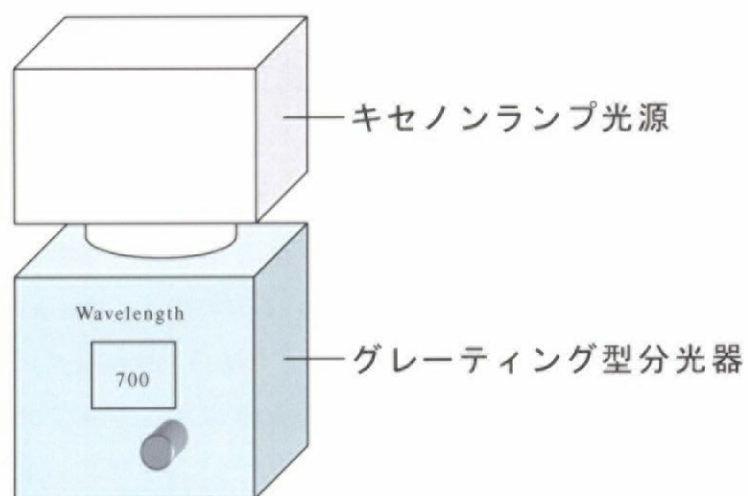


図 5-5 分光照明装置

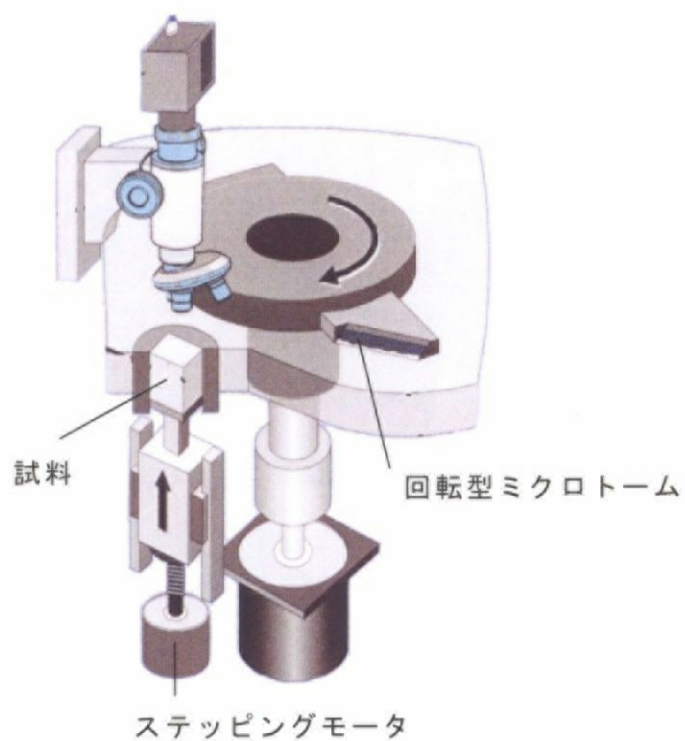


図 5-6 マイクロスライサ



上記で構築したシステムの概要図を図 5-7 に示す。本システムは分光照明部、分光観察部及びマイクロスライサ部からなっており、分光照明部及び分光観察部の制御は Windows2000 搭載のパソコン（EPSON 製 MT-6000）で、マイクロスライサ部の制御は専用のコントロールボックスで行う。また、本システムはマルチスペクトルイメージングにより立体試料中の任意の点に EEM を取得可能であるので、「3次元スペクトルイメージングシステム(Three-Dimensional Spectral Imaging System : 3D-SIS)」と名付けることとした。表 5-1 にその仕様を示す。なお、分光照明部と分光観察部を同期させて計測を行うため、アプリケーション開発ソフトウェア（Microsoft Inc.製 Visual Basic 6.0）を用いて独自の制御アプリケーションを開発した（Appendix を参照のこと）。また、本システムは組み立て式小型暗室内に設置されており、試料からの反射光、蛍光以外の外光が分光観察部に進入しないようになっている。

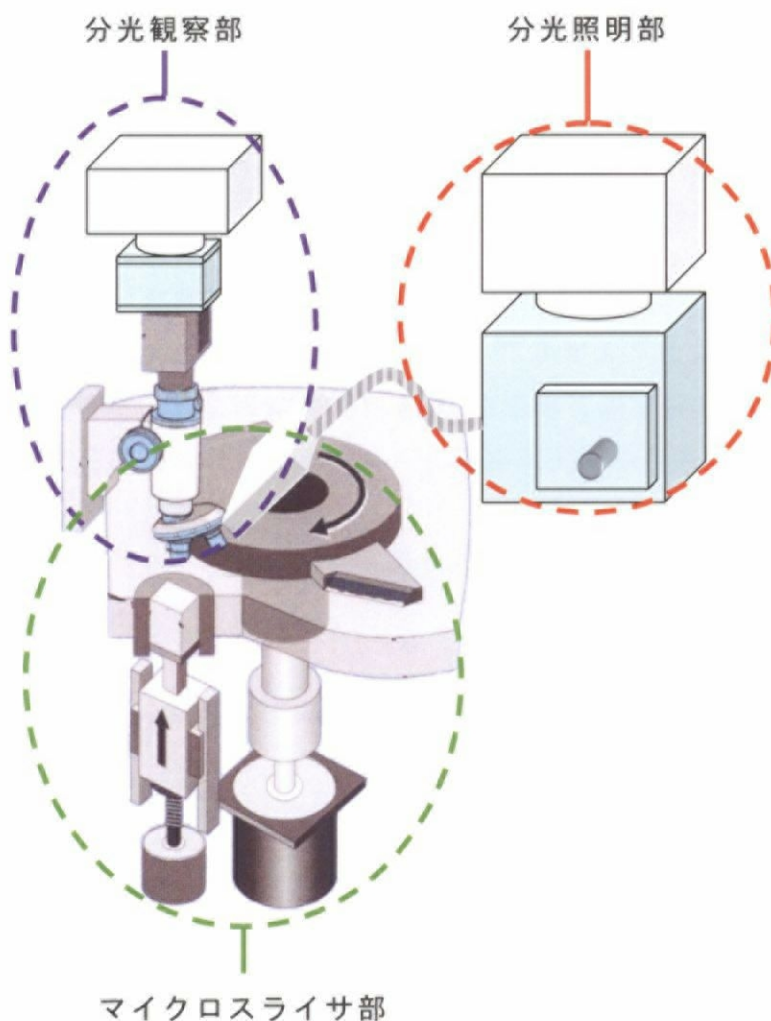


図 5-7 3D-SIS の構成

表 5-1 3D-SIS の仕様

分光照明部	波長範囲: 200～1,000 nm
	半値幅: 10 nm
	波長誤差: 1 nm
分光観察部	画素数: 1,344×1,024
	階調度: 12 bit (4,096段階)
	波長範囲: 400～1,100 nm
	半値幅: 10 nm
	波長誤差: 1.25 nm
マイクロスライサ部	切削厚さ: 1～30 $\mu\text{m}$
	切削速度: 最大90回/分

#### 5-6 EEM イメージングデータの解析・可視化法 <sup>62)、63)、64)、66)、67)</sup>

3D-SIS を用いると、立体試料の様々な深さにおける断面について、蛍光画像を様々な計測条件で取得することにより、図 5-8 に示すような立体試料の縦、横、深さ方向の位置情報と、各位置における EEM を取得可能である。EEM の計測条件は励起波長と蛍光波長の組合せで決まり、数百に上ることもあるため、3D-SIS を用いて得られるデータ量は膨大である。そこで、情報をなるべく損失することなく解析し、さらに EEM 特性の違いを視覚的に把握することができるよう、以下の解析法を提案した。

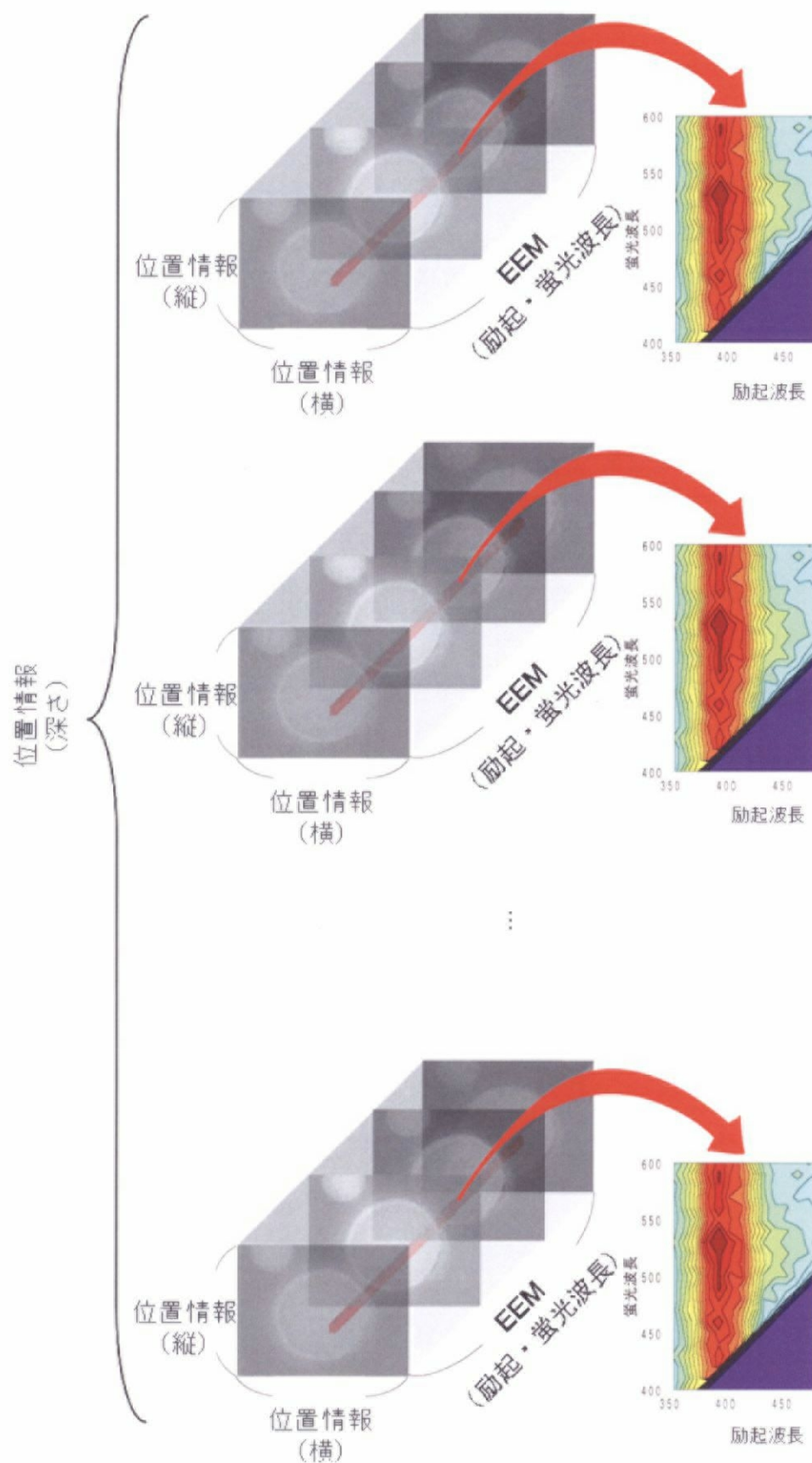


図 5-8 3D-SIS により計測可能なデータ

### 5-6-1 EEM データの圧縮

EEM は数百に上る次元を持つデータであり、その違いを視覚的に把握することは不可能である。そこで、EEM の次元数を圧縮することとした。次元圧縮の手法としては、自己組織化マップ、多次元尺度法、主成分分析など様々あるが、本論では近赤外分光法の分野などで幅広く利用されている主成分分析を用いることとした。主成分分析は多次元データの分散を最大限保ちながらデータの次元を圧縮する手法である。具体的には、図 5-9 に示すように、データの分散が最大となる新たな座標軸 ( $Z_1$ ) を導出し、次いで、 $Z_1$  に直交し、かつ  $Z_1$  の次にデータの分散が最大となる座標軸 ( $Z_2$ ) を導出する。これを、[データが分布する空間の次元数-1] 回繰り返し、分散の大きさの順番に新たな座標軸を導出して、元の空間と同じ次元を持つ空間を新たに構築する。この時、 $i$  番目の新しい座標軸  $Z_i$  を第  $i$  主成分座標軸、主成分座標系におけるデータの  $i$  番目の座標を第  $i$  主成分と呼ぶ。ここで、 $Z_1$ 、 $Z_2$ 、 $Z_3$  の 3 軸のみを用いると、データの分散が最大限保たれ、しかも視覚的に把握可能な 3 次元の座標系を新たに構築することができる。本論では、この座標系におけるデータの分布図を主成分プロットと呼ぶこととする。以上の手法を 3D-SIS で得られるデータに適用することにより、立体試料中の各点における EEM 特性の違いを、主成分プロットにおける位置の違いとして把握することが可能となる。

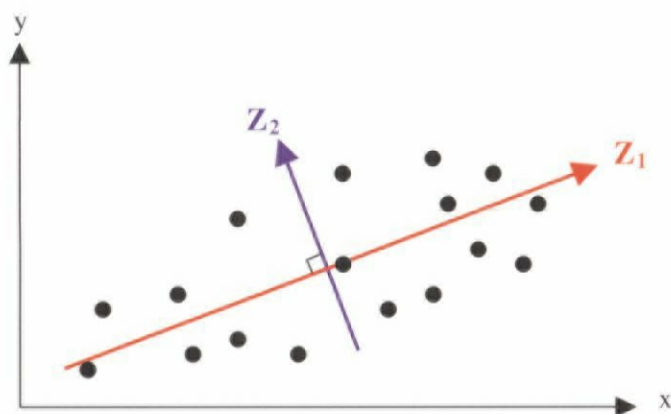


図 5-9 主成分分析における新たな座標軸の導出

### 5-6-2 色空間への変換

立体試料中の成分分布や構造を可視化するには、各点における EEM 特性の違いを視覚的に把握できる必要がある。そこで、主成分分析で得た主成分プロットの座標系を、色空間に変換することとした。色空間とは、色相、彩度、明度等の



色の要素を座標軸とする 1~4 次元の空間であり、色は色空間内の点として与えられる。色空間には RGB、CMYK、 $L^*a^*b^*$ 、 $L+u+v$  等があるが、本研究では、人間の知覚による色差と、空間内における距離が一致するように定められた  $L^*a^*b^*$  色空間を採用することとした<sup>68), 69)</sup>。 $L^*a^*b^*$  色空間は  $L^*$  軸（明度）、 $a^*$  軸（赤－緑の色度）及び  $b^*$  軸（青－黄の色度）の互いに直交する 3 軸から成り立っている。図 5・10 は  $L^*a^*b^*$  色空間における等明度面を示す。図 5・10 において、点 A と点 C の距離は、点 A と点 B の距離の 2 倍である。この時、それぞれの点に対応する実際の色を色 A、B、C とすると、 $L^*a^*b^*$  色空間の性質により、人間が知覚する色 A と色 C の差は、色 A と色 B の差の 2 倍となる。したがって、主成分プロットを  $L^*a^*b^*$  色空間に変換することにより、EEM 特性の違いを、人間が正確に知覚できる形で可視化することが可能となる。なお、本研究では、第 1 主成分を  $L^*$  軸、第 2 主成分を  $a^*$  軸、第 3 主成分を  $b^*$  軸に変換することとした。

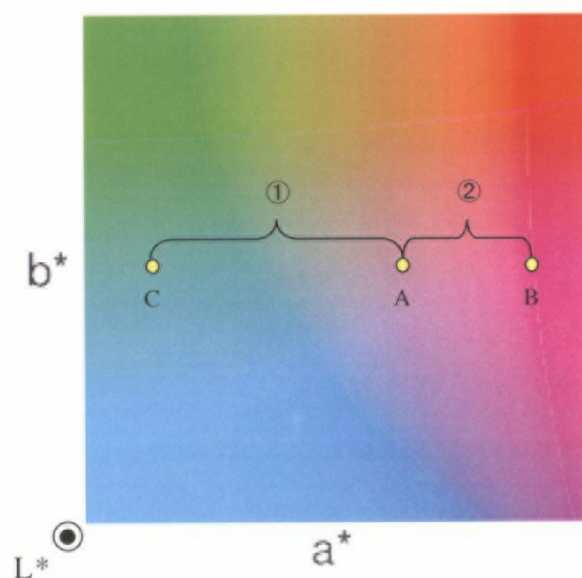


図 5・10  $L^*a^*b^*$  色空間における等明度面

### 5-6-3 成分分布・内部構造の可視化

主成分分析と  $L^*a^*b^*$  色空間への変換を通じ、立体試料の各点はそれぞれの EEM 特性に応じて  $L^*a^*b^*$  色空間に分布することとなる。各点の位置情報は計測により取得済みであるので、 $L^*a^*b^*$  色空間に対応して各点を彩色することにより、立体試料における EEM 特性の分布図が得られる。EEM 特性は成分の構成分子やその構造に基づく吸収・発光特性の違いを反映しているので、成分分布や内部構造の可視化も同時に可視化されることが考えられる。

## 5-7 大豆の内部構造可視化への応用<sup>70)、71)、72)、73)</sup>

小川ら<sup>74)、75)</sup>は大豆種子を連続して切片化し、それらの蛍光画像を取得したのち、コンピュータ内で得られた画像を仮想的に立体に再構築した。その結果、アリュールン層に自家蛍光があることや、大豆種子内に自家蛍光を発する葉脈状の構造が存在することが明らかとなった。しかしながら、切片化に備えて試料をパラフィンになじませるため、24時間を掛けて試料を脱水置換する必要があること、立体再構築に際して切片画像の位置を手動で合わせる必要があること、さらに、撮影条件が励起波長 425 nm、観察波長 475 nm の 1 つであったため、可視化画像が自家蛍光の有無のみを反映した白黒画像であり、詳細な解析ができないことなどの課題がある。そこで、本研究で開発した 3D-SIS を大豆の内部構造可視化に応用し、本システムの有用性を検証することとした。

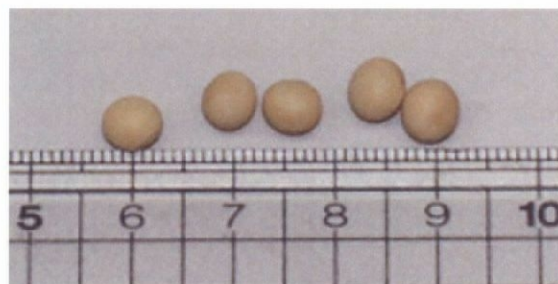


図 5-11 納豆小粒

### 5-7-1 実験手順

#### 1) 試料

供試材料として図 5-11 に示す茨城産極小粒品種の大豆種子（納豆小粒）を用いた。凍結包埋剤（サクラ精機製 Tissue-Tek 4583）を試料包埋用鋳型に流し込み、その中に試料を浸漬した。試料を鋳型ごと  $-80^{\circ}\text{C}$  に設定した冷凍庫に入れて 2 時間凍結し、鋳型から取りだして計測に供した。

#### 2) 実験装置

小川らの既往研究で用いられた波長条件を含む波長範囲で計測を行うため、3D-SIS の分光観察部の液晶チューナブルフィルタには、3-4-1 項で述べた可視領域に対応した機種を用いた。また、凍結試料を計測するため、実験開始 2 時間前から  $-30^{\circ}\text{C}$  に冷却した不凍液を循環させ、サンプルホルダの温度を  $0^{\circ}\text{C}$  以下に保った。

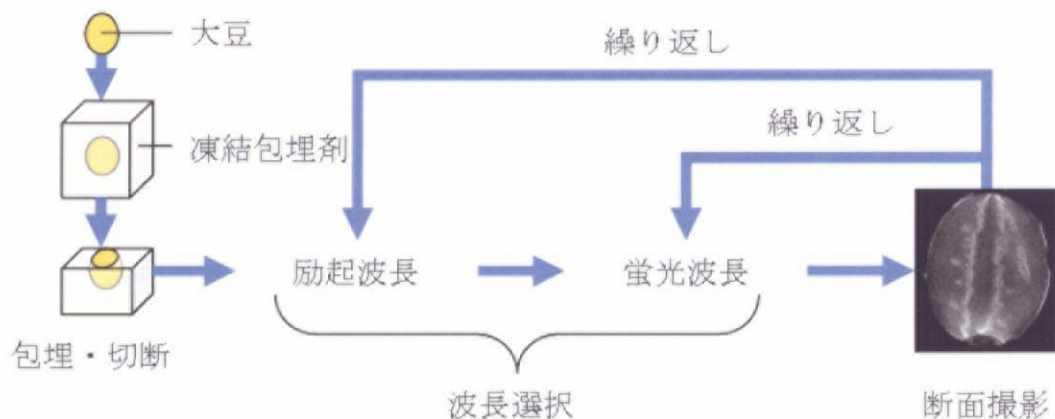


図 5-12 蛍光画像の取得手順

### 3) 蛍光画像の取得

図 5-12 に蛍光画像の取得手順を示す。凍結した供試材料をマイクロスライサ部のサンプルホルダにセットし、大豆種子の中心付近が露出するまで切削を繰り返した。次に、励起波長を 350～570 nm、観察波長を 400～600 nm の範囲で波長間隔 10 nm で走査しながら、露出した断面を観察した。この時、励起光の反射光など、試料からの蛍光以外の光による悪影響を防ぐため、観察波長と励起波長の差が 30 nm 以下にならないようにしたため、撮影した蛍光画像の総数は 273 枚となった（図 5-13 (a)）。

### 4) 可視化画像の作成

得られた蛍光画像の各画素について、各励起波長・蛍光波長における輝度値、すなわち蛍光強度をプロットすることにより、図 5-13 (b) に示すように、各画素における EEM を算出した。次に、蛍光画像から大豆部分のみを選択し、選択部分の各画素の EEM に対して、5-6-1 項で述べた主成分分析を適用して、図 5-13 (c) に示す主成分プロットを得た。また、5-6-2 項で述べた手法で主成分プロットを  $L^*a^*b^*$  色空間に変換した（図 5-13 (d)）。最後に、5-6-3 項で述べた手法で蛍光画像の各画素を彩色し、EEM 特性の分布を可視化した画像を得た（図 5-13 (e)）。なお、大量のデータを扱うために高速のパソコン（Dell 製 Dimension 4400、2GHz プロセッサ及び 1GB メモリ搭載）を用意し、EEM の算出から彩色に至る画像処理には、数値解析ソフト（The MathWorks Inc. 製 MatLab 6.1）を用いて開発した独自のアプリケーションを用いた。

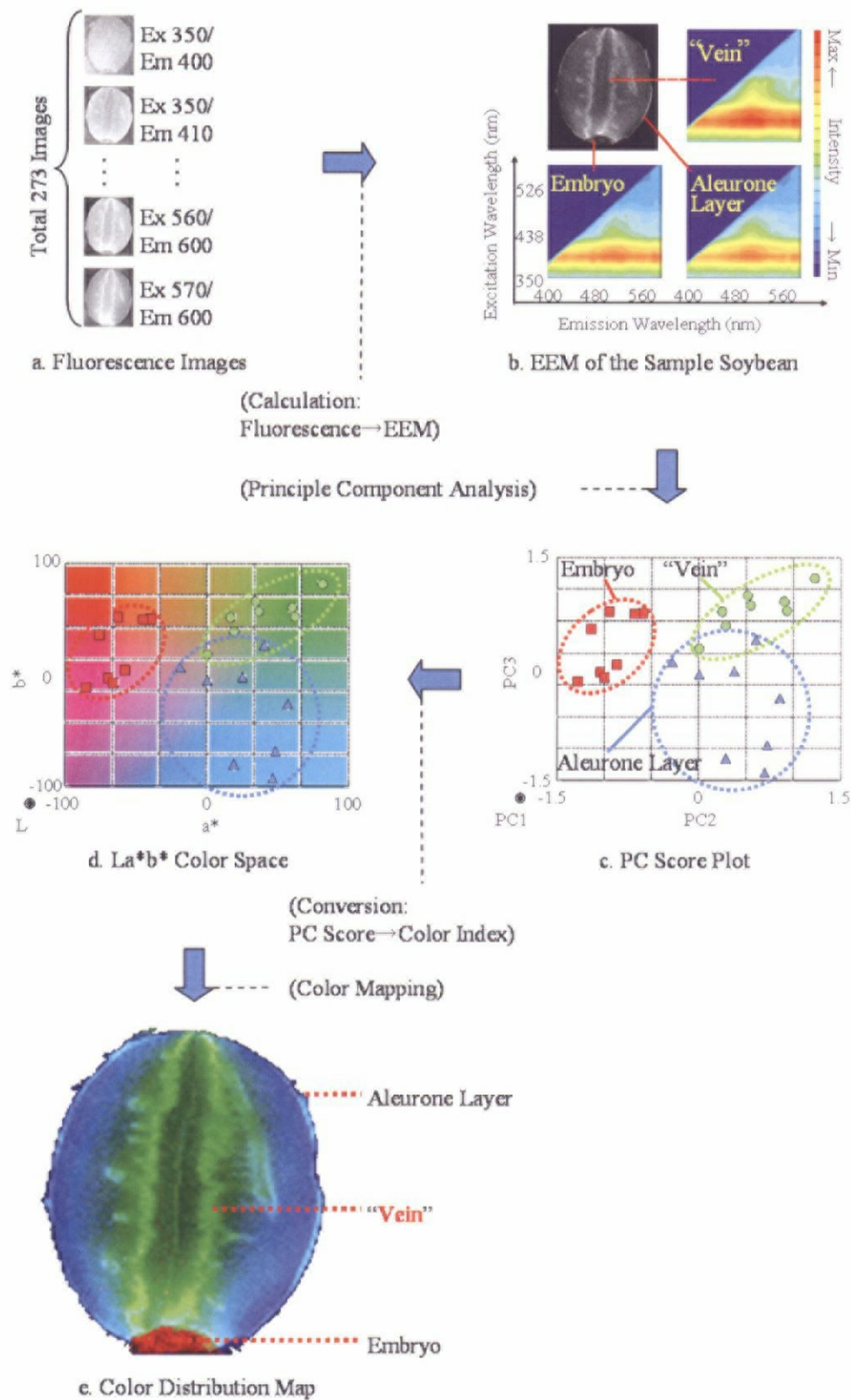


図 5-13 可視化画像の作成手順



### 5-7-2 結果及び考察

表 5-2 に、得られた EEM イメージングデータの主成分分析結果を示す。第 3 主成分までの累積寄与率は 0.85 を超えており、主成分分析により、EEM イメージングデータの情報量をほぼ損なうことなく、その次元を圧縮できたことが明らかとなった。また、図 5-14 (左) に、小川らの研究<sup>74), 75)</sup>とほぼ同じ励起波長 420 nm、観察波長 470 nm で撮影した蛍光画像を示す。小川らの報告と同様に、アリューロン層及び葉脈状の構造に自家蛍光があることが確認された。一方、図 5-14 (右) は、本研究の手法で作成した EEM 特性分布の可視化画像である。両者を比較することにより、可視化画像において、自家蛍光の強度が明るさに反映されており、特にアリューロン層と葉脈状構造は明るく可視化されていることが分かった。さらに、両者はそれぞれ青及び緑に彩色されており、同じ自家蛍光を持つ部位でも、EEM 特性が全く異なることが明らかとなった。EEM 特性が成分特性を反映していることから、アリューロン層と葉脈状構造においては異なる自家蛍光物質が分布していると考えられた。

表 5-2 主成分分析の寄与率と累積寄与率 (大豆)

	寄与率	累積寄与率
第1主成分	0.6987	0.6987
第2主成分	0.1512	0.8499
第3主成分	0.0127	0.8626

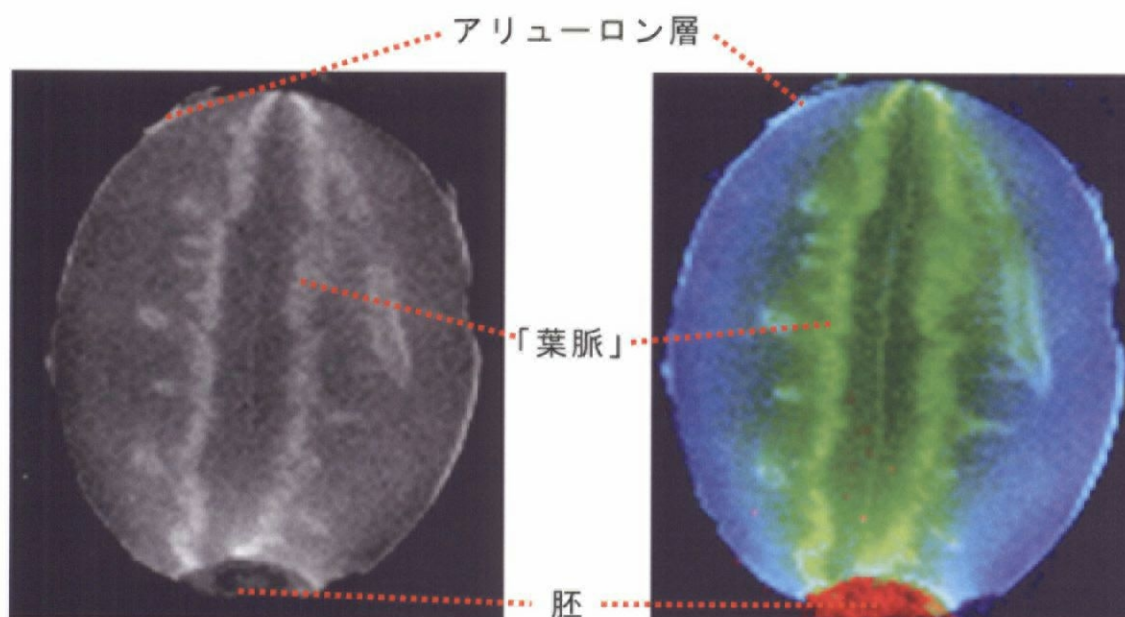


図 5-14 試料断面の蛍光画像 (上) と EEM 特性分布の可視化画像 (下)

### 5-7-3 計測条件の簡略化

大豆の断面における構造を可視化することができたので、その立体的な内部構造を明らかにすることが期待された。しかしながら、大豆の様々な深さの断面において 273 に上る条件で計測することは、膨大な時間を要し現実的ではない。そこで、計測条件を簡略化することとした。簡略化に際しては、主成分分析において主成分と同時に算出された固有ベクトルに着目した。下記式 5-1 に示すとおり、固有ベクトルは主成分の算出に直接関わる重要な係数ベクトルである。

$$\mathbf{Z} = \mathbf{XA} \quad \dots(5-1)$$

$$\mathbf{Z} = \begin{bmatrix} z_{11} & z_{21} & \cdots & z_{p1} \\ z_{12} & z_{22} & \cdots & z_{p2} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ z_{1n} & z_{2n} & \cdots & z_{pn} \end{bmatrix} \quad \mathbf{X} = \begin{bmatrix} x_{11} & x_{21} & \cdots & x_{p1} \\ x_{12} & x_{22} & \cdots & x_{p2} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ x_{1n} & x_{2n} & \cdots & x_{pn} \end{bmatrix} \quad \mathbf{A} = \begin{bmatrix} a_{11} & a_{21} & \cdots & a_{p1} \\ a_{12} & a_{22} & \cdots & a_{p2} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ a_{1p} & a_{2p} & \cdots & a_{pp} \end{bmatrix}$$

$$\text{ただし、} \sum_{k=1}^p a_{ik}^2 = 1$$

( $\mathbf{Z}$ : 主成分ベクトル  $\mathbf{X}$ : 蛍光強度ベクトル  $\mathbf{A}$ : 固有ベクトル

$z_{ij}$ : 第 $j$ 画素の第 $i$ 主成分  $x_{ij}$ : 第 $j$ 画素の第 $i$ 番目の計測波長における蛍光強度

$a_{ij}$ : 第 $i$ 主成分の第 $j$ 係数  $n$ : 総画素数  $p$ : データの次元数)

すなわち、各画素の各計測条件における蛍光強度の列ベクトルを縦に並べた蛍光強度ベクトル  $\mathbf{X}$  と、データの次元数の正方行列である固有ベクトル  $\mathbf{P}$  を乗じることにより主成分行列  $\mathbf{Z}$  が求められ、第  $i$  主成分は下記式 5-2 で算出される。

$$z_{ij} = \sum_{k=0}^p x_{kj} a_{ik} \quad \dots (5-2)$$

したがって、係数  $a$  の絶対値が最大となる計測条件の蛍光強度は、主成分の算出に最も大きく寄与している。よって、第 1～第 3 主成分の固有ベクトルを解析し、計測を行った波長帯において、係数  $a$  が正の場合と負の場合のそれぞれについて、その絶対値が最大となる計測条件を求めることにより、情報の損失を極力抑えながら計測の大幅な簡略化が可能になると考えられた。図 5-15 に第 1～第 3 主成分の固有ベクトルを、表 5-3 にそれぞれの固有ベクトルにおいて係数の絶対値が最大となる計測条件を示した。第 1 主成分の固有ベクトルにおいては係数が 0 未満にならないこと、第 2・第 3 主成分の固有ベクトル最大係数の計測条件がほぼ等しいことから、

表 5-4 に示す 4 つを簡略化計測条件とした。

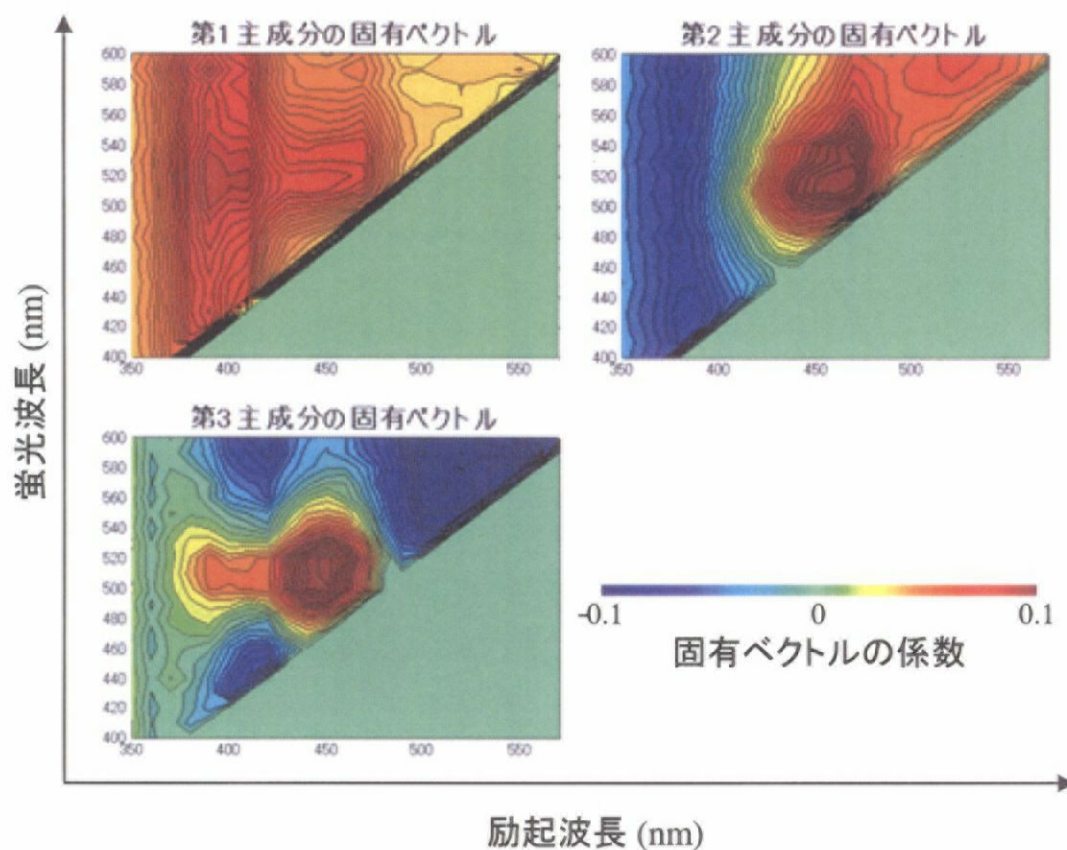


図 5-15 各主成分の固有ベクトル

表 5-3 固有ベクトルの係数の絶対値が最大となる計測条件

	係数の絶対値の最大値	励起波長 (nm)	蛍光波長 (nm)
第1主成分	正の場合:	0.0293	390
	負の場合:	—	—
第2主成分	正の場合:	0.1298	460
	負の場合:	0.0796	380
第3主成分	正の場合:	0.1588	450
	負の場合:	0.1182	500

表 5-4 簡略化計測条件

励起波長 (nm)	蛍光波長 (nm)
380	430
390	510
460	520
500	590

#### 5-7-4 大豆の立体計測及び内部構造の立体再構築

##### 1) 蛍光画像の立体計測

5-7-1 項で述べた方法と同様に供試材料を用意し、3D-SIS にセットした。包埋した大豆が見えるようになるまで包埋剤を切削し、露出した断面を前項で述べた4つの簡略化計測条件で計測した。次に、試料を 60  $\mu\text{m}$  切削し、再び露出断面を同条件で計測した。以上の切削及び計測を繰り返し行い、図 5-16 (a) に示すように、92 断面についてそれぞれ 4 枚の蛍光画像、合計で 368 枚を取得した。

##### 2) 画像処理

得られた蛍光画像から大豆部分を選択し、選択範囲にある画素の蛍光強度を式 5-1 の行列  $X$  と同様に並べ替え、各断面・各画素の蛍光強度を統合した蛍光強度ベクトルを作成した (図 5-16 (b))。次に、作成した行列に対して 5-7-1 項と同様にして主成分分析、 $L^*a^*b^*$  色座標への変換、各画素の彩色を順次行い、各断面における EEM 特性の分布画像を作成した (図 5-16 (c))。さらに、各分布画像をボリュームレンダリング法で重ね合わせるにより、図 5-16 (d) に示す EEM 特性の立体分布可視化画像を構築した<sup>65)</sup>。なお、ボリュームレンダリングには、画像処理ソフト (東芝機械製 Voxel Viewer) を使用した。

##### 3) 結果及び考察

図 5-17 における 6 つの画像は立体可視化画像を 60° ずつ回転させたものであり、アリューロン層 (青)、胚 (赤) 及び葉脈状構造 (緑) の存在部位が明確に観察可能である。特に、葉脈状構造については、胚軸の左右に枝状に展開していること、中央部に空隙があることが確認された。したがって、5-7-3 項で述べた簡略化計測条件によっても、大豆の内部構造が可視化可能であることが明らかとなった。以上のことから、本研究で開発した 3D-SIS 及び EEM イメージングデータの解析・可視化法は、様々な食品の内部構造可視化に有用であると考えられた。





a. 蛍光画像



範囲選択

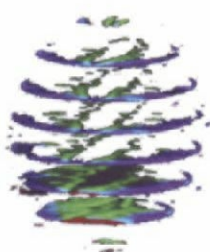
$$\begin{bmatrix} x_{11}(1) & x_{21}(1) & x_{31}(1) & x_{41}(1) \\ x_{12}(1) & x_{22}(1) & x_{32}(1) & x_{42}(1) \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ x_{11}(k) & x_{21}(k) & x_{31}(k) & x_{41}(k) \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ x_{11}(92) & x_{21}(92) & x_{31}(92) & x_{41}(92) \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \end{bmatrix}$$

( $x_{ij}(k)$ : 第 $k$ 断面の第 $j$ 画素の第 $i$ 計測条件における蛍光強度)

b. 蛍光強度ベクトル



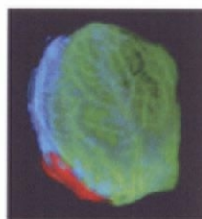
主成分分析/L\*a\*b\*色座標変換/彩色



c. EEM特性分布画像



ボリュームレンダリング



d. 立体可視化画像

図 5-16 立体可視化画像の作成手順

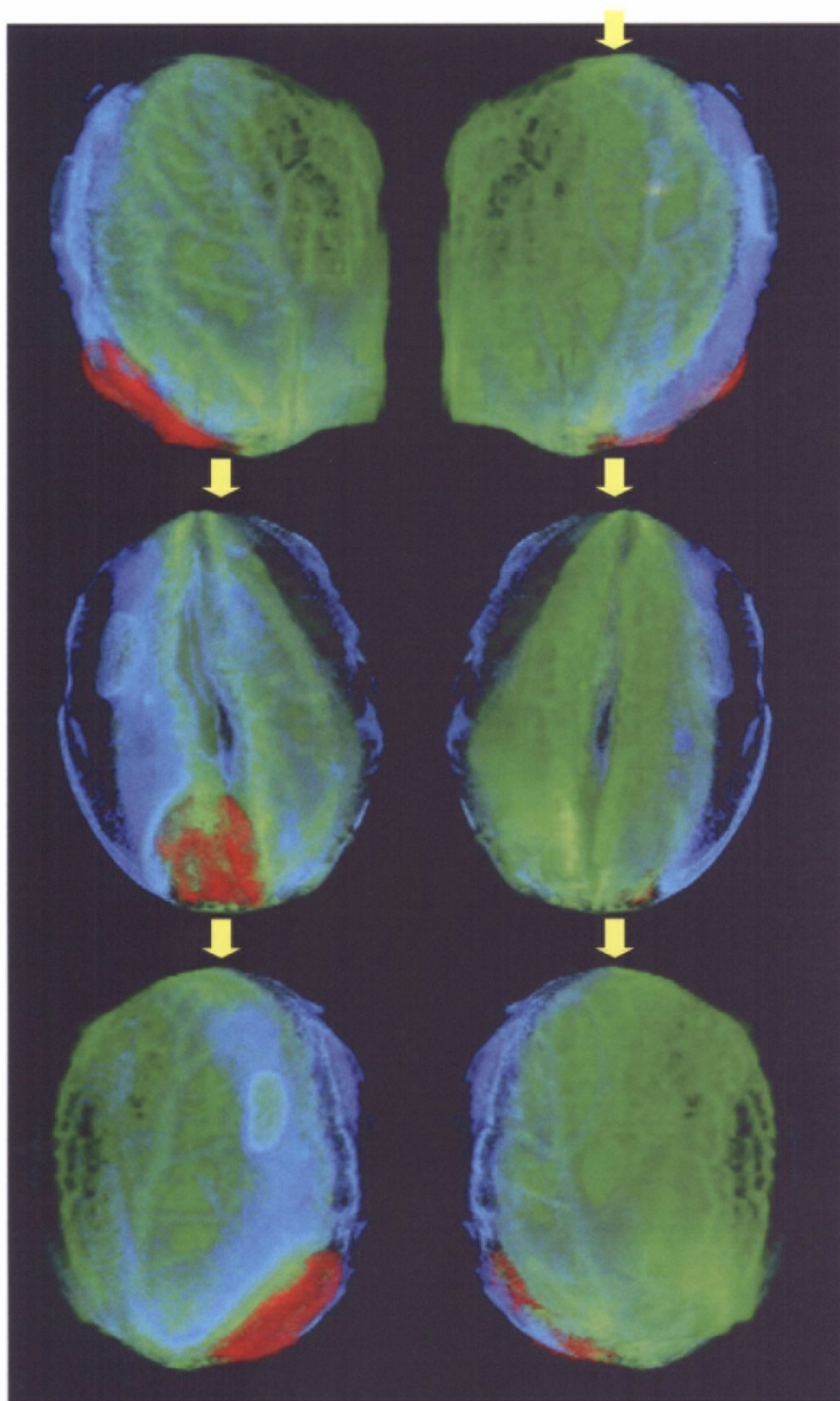


図 5・17 様々な角度から見た立体可視化画像

## 5-8 コショウにおける $\gamma$ 線照射処理の検知への応用

日本は香辛料のほぼ全量を輸入に頼っている。1999 年度には 34,466 トンを輸入しており、輸入元の上位 5 カ国はマレーシア、中国、インド、インドネシア及びタイである<sup>76)</sup>。香辛料は微生物汚染がひどく、殺菌処理が必要不可欠であり、近年では香辛料独特のフレーバーや色の保持に優れる放射線殺菌の利用が急速に増えている。実際に、上記で述べた日本の主な香辛料輸入元のうち、マレーシア、中国及びタイでは香辛料に対する放射線殺菌が実用化されており<sup>77)</sup>、日本にも放射線殺菌処理済みの香辛料が輸入されている可能性は十分に考えられる。しかしながら、日本においては放射線に対する消費者の嫌悪感が強く、食品に対する放射線の利用は、馬鈴薯の芽止めにのみ認められているのが現状である。したがって、輸入香辛料に対する放射線殺菌処理の有無を把握し、早急に対策をとる必要があると考えられるが、最も普及している放射線照射の検知手法は、作物に付着したミネラル分を対象にした熱蛍光測定法 (TL 法) である<sup>78)</sup>。TL 法はミネラル分の抽出に時間と手間を要する上、作物自体を対象としていないことから、大量に輸入される香辛料の検査に用いるのは現実的ではない。一方、コショウに対して  $\gamma$  線照射処理を行うと、香味とデンプン質の物性が変化するという報告がある<sup>79)、80)、81)</sup>。したがって、 $\gamma$  線照射処理によってコショウの含有成分に変化が起きることが推察され、この成分変化を光学的手法で捉えることができれば、簡便かつ大量に  $\gamma$  線照射処理を検知する手法が開発可能であると考えられた。そこで本研究では、大豆の内部構造可視化に用いた EEM イメージング手法を応用し、EEM イメージング手法のコショウの  $\gamma$  線照射処理検知への適用可能性を明らかにすることとした。

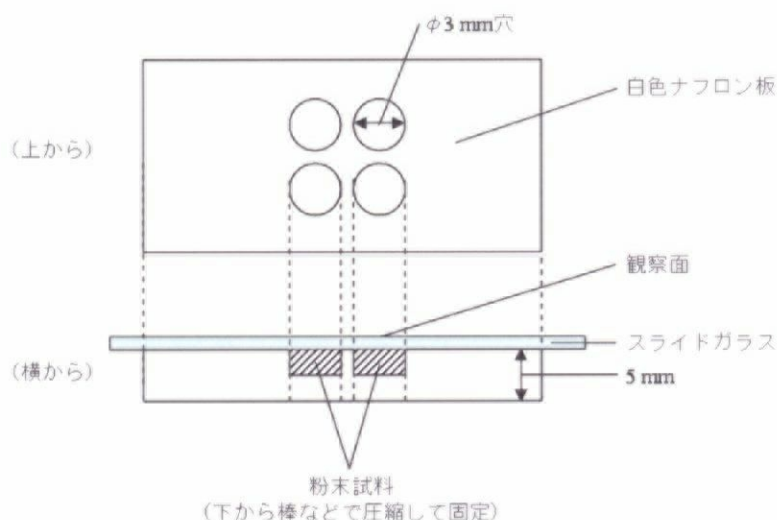


図 5-18 粉末試料計測用サンプルホルダ

### 5-8-1 実験手順

#### 1) 試料

放射線殺菌処理を含むどんな殺菌処理も行っていない粒コショウを、10g ずつ 4 つのバイアル瓶に入れ、1 つをコントロール試料とした。残りの 3 つを  $\gamma$  線照射装置 (AECL 製 Gammacell 220) に入れ、それぞれに対して 10kGy、20kGy 及び 30kGy の  $\gamma$  線を照射した。次に、4 つのバイアル瓶から粒コショウを取り出し、粉碎器にて粉碎した。さらに、300  $\mu$ m メッシュのふるい (筒井理化学器械製) を用いてふるいにかけて、粉末コショウし、その粒径をそろえた。最後に、図 5-18 に示す自作のサンプルホルダに詰め、計測に供した。

#### 2) 実験装置

5-7-1 項と同様、計測には 3D-SIS を用いた。試料が粉末であり、切削が不要であることから、マイクロスライサ部のサンプルホルダは使用せず、その上に自作のサンプルホルダを置いて計測を行った。

#### 3) 計測と可視化画像の作成

5-7-1 項と同様の方法で、蛍光画像の撮影と画像処理、及び EEM 特性分布の可視化画像を行った。励起波長範囲は 350~550 nm、蛍光波長範囲は 400~600 nm、波長間隔はそれぞれ 10 nm とした。

表 5-5 主成分分析の寄与率と累積寄与率 (コショウ)

	寄与率	累積寄与率
第1主成分	0.8085	0.8085
第2主成分	0.1102	0.9187
第3主成分	0.0537	0.9724

### 5-8-2 結果及び考察

表 5-5 に、得られた EEM イメージングデータの主成分分析結果を示す。第 3 主成分までの累積寄与率は 0.9 を超えており、主成分分析により、EEM イメージングデータの情報量をほぼ損なうことなく、その次元を圧縮できたことが明らかとなった。また、図 5-19 に、試料のカラー画像 (左) 及び EEM 特性分布の可視化画像 (右) を示す。カラー画像においては、 $\gamma$  線照射による色の変化等は観察されず、照射されているかどうかを判別することは難しい。一方、可視化画像に



においては、 $\gamma$  線の照射線量が大きくなるにつれて、試料の色がピンク色から水色に変化し、 $\gamma$  線照射によって EEM 特性が変化することが明らかとなった。EEM 特性の変化は含有成分の変質を反映していると考えられ、EEM イメージング手法による食品に対する  $\gamma$  線照射処理検知の可能性が示された。以上のことから、EEM イメージングにより、農産物や食品の流通・処理・加工などの過程における成分やその分布の変質を定量的にモニタリングすることが可能であると考えられ、食品の安全性評価に EEM イメージング手法を応用することが期待される。

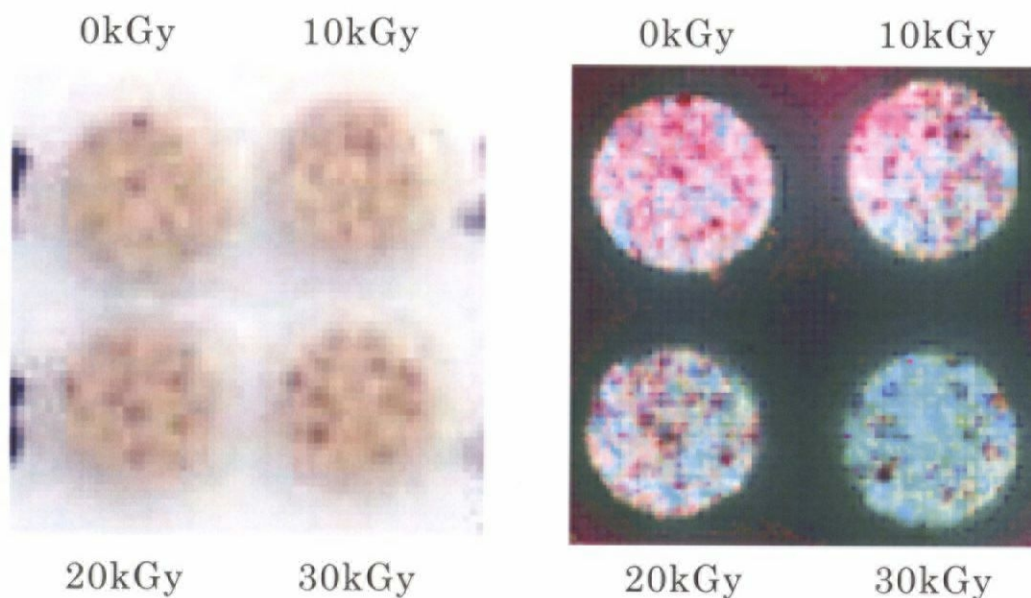


図 5-19 粉末コショウ試料のカラー画像（左）及び EEM 特性分布の可視化画像（右）

#### 5-9 まとめ

- 1) 分子が失活過程で放出するルミネッセンスのうち、第 1 励起状態からの失活で放出されるのが蛍光である。
- 2) 励起・蛍光マトリックス (Excitation-Emission Matrix: EEM) は、対象の蛍光強度を、励起波長及び蛍光波長を独立して走査しながら計測して得られる等高線状のグラフである。
- 3) EEM は 3 次元のデータであり、吸収・発光の二過程を観察して得られるデ

ータなので、2次元データである吸光スペクトルと比較するとその情報量は膨大である。

- 4) EEM 計測によるハウレンソウ葉の相対含水率計測を試みた研究、古代染色遺物・浮世絵の染料同定を行った研究、及び農薬の検知を行った報告等がなされており、EEM が生理機能の情報取得や成分同定に有効であることが明らかとなった。
- 5) 既往の研究例から、下記 2 点の EEM イメージング手法の課題が明らかとなった。
  - (1) EEM と位置情報を同時に取得する計測システムがないこと。
  - (2) EEM の膨大な情報量を損なうことなく、その特性を解析する手法の報告例は少ない上、EEM と位置情報を同時に取得して得られる EEM イメージングデータを解析する手法は報告されていないこと。
- 6) 上記の課題を解決するため、「3 次元スペクトルイメージングシステム (3D-SIS)」及び EEM イメージングデータの解析・可視化手法の開発と、食品を対象とした EEM イメージング手法への適用を提案した。
- 7) 3D-SIS は分光照明部、分光観察部及びマイクロスライサ部より構成され、下記 3 点の特徴を備える。
  - (1) 200~1,000 nm の任意の波長で対象を励起することが可能。
  - (2) 400~1,100 nm の任意の波長で対象の蛍光を観察することが可能。
  - (3) 対象の任意の位置を計測可能。
- 8) 3D-SIS を用いて得られる位置情報と EEM のデータは膨大であるので、情報をなるべく損失することなく解析し、さらに EEM 特性の違いを視覚的に把握することができるよう、下記の 3 段階よりなる新たな解析・可視化法を開発した。
  - (1) EEM データを主成分分析によって 3 次元に圧縮し、主成分プロットを作成して、EEM 特性の違いを 3 次元空間における位置の違いに変換する。
  - (2) 主成分プロットを  $L^*a^*b^*$  色空間に変換し、EEM 特性の違いを色の違いに変換する。
  - (3) 立体試料の計測データの各点を、 $L^*a^*b^*$  色空間における位置に対応した色に彩色することにより、立体試料における EEM 特性の分布図を得る。

- 9) EEM 特性は成分や構造の違いを反映しているので、EEM イメージングデータの解析・可視化と同時に、成分分布や内部構造の可視化も可視化されることが考えられる。
- 10) 3D-SIS 及び EEM イメージングデータの解析・可視化手法を応用し、大豆の立体的な内部構造を可視化した。その結果、アリューロン層、胚及び葉脈状構造の存在部位が観察可能となり、それぞれが全く異なる EEM 特性を持っていることが明らかとなった。特に、葉脈状構造の特徴的な分布形態が明確に観察でき、本研究で開発した 3D-SIS 及び EEM イメージングデータの解析・可視化法は、様々な食品の内部構造可視化に有用であると考えられた。
- 11) 3D-SIS 及び EEM イメージングデータの解析・可視化手法を応用し、コシヨウにおける  $\gamma$  線照射処理の検知可能性を検討した。その結果、 $\gamma$  線照射の線量が増加するにつれて EEM 特性が変化していくことが明らかとなった。したがって、EEM イメージングによって食品成分の変質を検知することが可能であると考えられ、食品の安全性評価に EEM イメージング手法を応用することが期待される。