

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20580284

研究課題名(和文) リフラクシオンイメージングによる種子含有成分の粒内分布解析

研究課題名(英文) Visualization of compound distribution in a edible plant seed by means of refraction imaging method

研究代表者

小川 幸春 (OGAWA YUKIHARU)

千葉大学・大学院園芸学研究科・准教授

研究者番号：00373126

研究成果の概要(和文)：

コメ、ダイズ、ゴマなど食用の種子が含有する油脂の粒内分布状態を観察可能な新規可視化法の確立を目指し、ビブラトームでの直接切片化および屈折率差を利用した画像化手法(リフラクシオンイメージング)と組織化学染色法の組み合わせによる可視化手法を検討した。その結果、微分干渉観察法とナイルブルー・トルイジンブルーの二重染色法を適用することで、油脂類の粒内分布状態を確認、解析することが可能となった。開発した技術の応用事例として、加熱加工されたゴマ種子中の油脂分布を観察したところ、オイルボディの大きさが加熱の進行に伴って縮小していく様子が確認された。

研究成果の概要(英文)：

In order to investigate the effect of drying or heating on distribution of oil in a sesame seed, the microscopic technique for differential interference contrast and phase contrast imaging methods was applied to sesame sections which were stained by Nile blue reagent or imaged by unstained refraction imaging method. As a result, the oil distribution could be captured by means of traditional staining technique for the tissue combined with differential interference contrast method. It is found that the oil bodies in a sesame seed became smaller than raw condition during heating.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農業工学・農業情報工学

キーワード：画像処理・画像認識、画像解析

1. 研究開始当初の背景

穀類や豆類をはじめとする食用種子は、貯蔵性向上などのため収穫後に乾燥して水分含有量が調整される。乾燥手段には天日乾燥をはじめ熱風乾燥やテンパリング乾燥などさまざまな乾燥法が適用される。しかし、たとえば天日乾燥したコメはライスセンタで熱風乾

燥したコメに比べて美味しい、のように、乾燥調製の方法や条件によってそれら食用種子の品質が変化することは経験的に知られている。

種子の乾燥調製工程を物質収支の側面から微視的に捉えると『粒の内側から外側に水分の移動を生じさせて蒸発を促す』ことになる。ここで乾燥の対象となる『水分』について考

えた場合、種子に含まれる水分は純粋な『水分』ではなくさまざまな可溶性の成分やコロイド状物質も含んだ『水分』である。すなわち、乾燥調製することで種子内部では「水分の移動に伴って可溶性あるいはコロイド状物質も移動する」ことが考えられる。ただし、可溶性の物質とはいえ水分と共に空气中に拡散するわけではないので、それらは乾燥に伴い『粒の外縁近くに運ばれ、結果的に濃縮される』という仮説が成り立つ。すなわち『乾燥』は水分を移動させるだけではなく、可溶性成分あるいはコロイド状物質の分布変動(分布の偏り)も生じさせる操作であるとも考えられる。

前述の仮説のように、例えば「種子粒内で微細なコロイドとして存在する油脂類が乾燥に伴って外縁部に偏る」という現象があるとすると、それらはより空気に触れる可能性があるため酸化され易くなり、その結果、品質劣化する可能性も高まると推測できる。もし乾燥方法によってそれらの分布が異なれば、乾燥方法と品質の関係を示す一例となる。

一般に、生体組織内の成分分布は顕微鏡技術を利用した組織化学的な方法によって観察、解析される。組織化学的研究の前提は、光学的に透過観察できるようにサンプルを薄切(切片化)することが挙げられる。組織切片を作製する際には、試料を物理的に固定(包埋)するためパラフィンや樹脂などをサンプルに浸透させるが、そのためにはアルコールなどの親油性の溶媒を用いた脱水置換操作が必要となる。しかしながらそうした脱水の過程では、元来サンプルに含まれる油脂類は溶出または移動し、その正確な分布状態を観察することができなくなる。このためサンプルを凍結させて切片化する凍結包埋が行われることもあるが、植物種子のように水分含量が低く機械力学的に硬いサンプルへの適用は極めて困難である。このことから生物学的にきわめて重要な知見であるにもかかわらず、種子内部に存在する油脂類の粒内分布に関しては確実な観察手法がなく、ほとんど解明されていないのが現状である。本研究では脱水操作を適用しない手法による組織切片の作製とともに、可能な限り正確な可視化法の適用による種子内部の油脂類の分布状態解明を目指す。

一般に、液体は光学的な屈折率が異なる(例えば、油脂類:約1.5、水:約1.3)。したがって、油脂類を含んだ透明に近い組織切片の屈折画像を観察すれば、油脂と油脂以外の成分を分類できる可能性がある。本研究では上記目標を達成するため、油脂を可視化する方法として光学的な屈折率の相違を検出する手法(リフラクシオンイメージング)を適用し、種子中における油脂類の分布状態可視化の可能性を検討する。

2. 研究の目的

本研究は、コメ、ダイズ、ゴマなど食用種子が含有する各種成分、特に油脂類の粒内分布状態可視化、および乾燥調製、加熱等の加工操作がそれら油脂の分布状態に及ぼす影響の解明を目的としている。油脂の分布状態を可視化する手法として、油脂および水分の光学的な屈折率差を利用する新たな画像化法(リフラクシオンイメージング)を検討した。

具体的な検討項目を以下に示す。

- (1) 光学的な屈折率の違いを利用して、デジタル画像として油脂類の特徴抽出を行う計測手法(リフラクシオンイメージング)の検討。微分干渉および位相差顕微鏡によって屈折率の異なる複数種類の油脂を観察し、得られた画像の輝度値を比較解析することで屈折画像観察の効果を検討した。本項目では特に、位相差コンデンサおよびノルマルスキ型微分干渉フィルタの条件設定を厳密に設定し、輝度差の有無を検討した。
- (2) コメ、ダイズ、ゴマなどの食用種子が含有する油脂類の粒内分布状態を光学的に顕微鏡観察するための切片化法の検討。特に粘着テープを利用した簡易切片化法およびビプラトームを利用した直接切片化法を詳細に検討した。
- (3) ゴマ種子内部に分布する油脂類の光学的屈折率差を利用した可視化、および組織化学染色による可視化。上記2)で検討する切片厚は定法によって得られる組織切片よりも厚くならざるを得ないことが予想されたため、本項目では通常より厚い組織切片を対象とする観察法の確立を試みた。
- (4) 加熱操作がゴマ種子内部に分布する油脂類の分布変動に及ぼす影響の解明。焙煎操作によってゴマ種子を加熱し、組織構造的な変化に伴う成分分布変動の調査、観察を目指した。

3. 研究の方法

- (1) イオン交換水・油脂混合液、分散系エマルションのモデルサンプル作製、および屈折率差を利用した新たな画像化手法(リフラクシオンイメージング)の検討
イオン交換水および植物性油脂が単一平面上で接触するようスライドガラス上に滴下、静置した上で、位相差検鏡法および偏光検鏡法を用いて観察し、屈折率の差異が輝度差として認識可能であるか否かを検討した。同様の目的で分散系エマルションを作製し、イオン交換水および油脂に相当する部位の輝度差を調査した。供試材料には、油中水滴型エマルション(w/o型)の事例として市販のバター、水中水滴型エマルション(o/w型)の事例として市販の生クリームを用いた。また、生クリームに超音波振動を加えてw/o型に転相(Phase Inversion)させたPIクリームも試

料として用いた。試料の観察には位相差観察用の光学系および微分干渉観察用アナライザ、ポライザプリズムを装備し、微分干渉観察用の対物レンズ (C-APOCHROMAT 40x/1.2 W korr, Zeiss) を装着した顕微鏡 (Axioplan2 imaging, Zeiss) を用いた。観察された画像は顕微鏡にマウントされたデジタルカメラ (AxioCam, Zeiss) によりデジタル化した。位相差検鏡法には通常の位相差コンデンサによる観察法 (Phase Contrast, PC), 偏光検鏡法にはノルマルスキ型微分干渉フィルタによる観察法 (Differential Interference Contrast, DIC) を適用した。なお、各検鏡法における撮像条件は固定し、得られた画像の輝度値も解析した。

(2) 種子サンプルの切片化

粘着テープを利用した簡易切片化法を適用して種子サンプルの切片化を検討した。供試材料には黒ゴマの生種子を用い、前処理を行わずに直接融解パラフィンに浸漬した。試料は浸漬後すぐに冷蔵庫内に移すことで低温処理し、パラフィンを固化、試料固定を行った。得られたパラフィンブロックは通常の滑走式ミクロトームを用いて 30 μ m 厚の切片として回収した。なお、切片の回収には有機溶媒に耐性のある特殊粘着テープ (東芝機械) を用いた。

同様に、ビブラトーム (VT1000S, Leica) を用いてサンプルの物理的な単純固定による直接切片化法も検討した。試料は一部を瞬間接着剤で台座に固定後、直接切片化してコーティング処理済みのスライドガラス上に回収した。

以上の方法を適用することで作製された組織切片を顕微鏡観察時に評価し、各切片化法の良否を比較、検討した。

(3) 組織化学染色による油脂分布の可視化

光学的な工夫とは別に、定法の組織化学染色法を適用して組織切片中に含有される油脂の分布状態可視化を検討した。

油脂の染色には、水溶性試薬であるナイルブルーを用いた。サンプルの組織切片はホルマリン固定の後、0.01%ナイルブルー溶液を切片上に滴下することで染色した。予備実験の結果、染色時間は3分に設定した。

サンプルの顕微鏡観察レベルでの細胞形状を明確にするため、ナイルブルー染色とともにトルイジンブルーによる染色も組み合わせることで二重染色法を検討した。トルイジンブルーは主に細胞壁を染色することで顕微鏡観察時のコントラストを強調することができる。トルイジンブルーはイオン交換水によって0.5%に調製し、上記同様、組織切片に滴下した。染色時間は3分に設定した。

(4) ゴマ種子の加熱および油脂分布可視化
試料の一部は、ガス加熱によって熱したフライパン上で加熱した。フライパンの表面温度は約 200 $^{\circ}$ C に設定し、加熱時間を1分および3分とした。それぞれの加熱試料を上述の方法で切片化、組織化学染色することで、油脂の分布状態、存在形態を確認、検討した。なお、フライパン以外にも陶器製焙煎容器を用いた加熱も検討した。焙煎時間はフライパン同様、1分および3分とした。

4. 研究成果

(1) 屈折率が異なるサンプルの可視化および微分干渉法によるエマルションの観察
種子内部の油脂は、普通はスフェロソームなどの顆粒状態として存在する。油脂と水は光学的な屈折率が異なるため、油脂の顆粒と水分の多い他の部分では光学的な光路差が生じると予想される。光学顕微鏡による微分干渉観察 (DIC) あるいは位相差観察 (PC) は、光路差をコントラストの差異として画像化する可視化法である。このうち DIC はある程度厚みのある測定対象にも適用可能とされている。そこで屈折率が異なる条件の一例として、互いに混ざり合わない2液相間で一方が他方の相に微細粒子状に分散している系のエマルションを対象に可視化を試みた。

図1にバター、生クリーム、PIクリームのDIC画像を示す。図中、水の部位をa、油脂の部位をbとし、aおよびbから無作為に選択した3点の平均輝度を図中の表に示す。いずれの画像においてもa、b間に明確な輝度差が確認された。なおバターの画像では微粒子が確認されていないが、これは観察前にバターを加熱融解させた際、エマルションが融合、凝固したためと考えられる。エマルションタイプを考慮すると、輝度値の大きいbが油脂、小さいaが水となる。特にPIクリームでは比較的大きさの揃った粒が観察されたが、これは超音波振動により粒径が均質化されたためと考えられる。これら予備実験の結果から、DICによる油脂と水分の輝度差の判別は可能であることが示された。

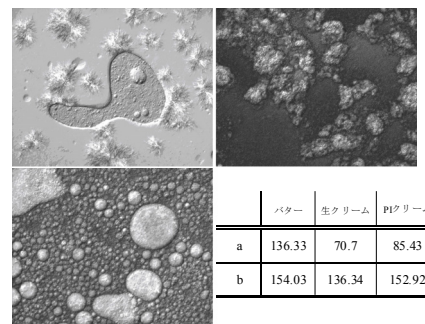


図1 バター (左上), 生クリーム (右上), PIクリーム (左下) それぞれのDIC画像。表は各画像各部位の平均輝度を示す。

図2は連続相（水，乳化剤）と油脂の重量比を9:1としたエマルジョンのDIC画像である．乳化剤として0.1% tween20を用いた．いずれの画像においても連続相の輝度値は一樣であった．これは連続相の光学的な厚みが一樣であることを示している．一方，油滴は球として存在するため連続層との界面が曲面となっている．このため界面付近で屈折率が大きく異なり比較的大きな輝度差となる．油脂は前述のように種子中においても顆粒状で存在することから，それらについても同様の現象が生じると考えられる．

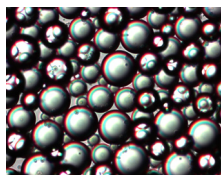


図2 エマルジョンのDIC画像．

以上の結果は，同一観察画面内での相対的な比較を前提としている．このため水と油脂が別個となるようプレパラート上に設置した場合には，光路長に関係する透過厚などが異なれば絶対的な輝度を評価することが困難となる．また，屈折率の差異をより精密に評価するためには顕微鏡の光学系自体を改良する必要がある．これらのことから，屈折率の差異を利用して油脂の分布を可視化する手法には大きな可能性が確認されたものの，研究計画を進めるためには通常の染色法を種子切片上の油脂分布観察手法として適用し実験を進めることとした．

(2) ゴマ種子の切片化

これまでコメ粒やダイズ粒の組織切片を回収するために用いられてきた粘着テープによる簡易切片化法を適用して高品質の組織切片が作成可能であることを確認した．ただし，本手法では切片の観察時にテープ自体の光学的な性質も画像情報として包含することが判明したため，ビブラトームを用いた直接切片化を検討することとした．

図3はビブラトームによって得られたゴマ種子の組織切片の一例である．不慣れた状況での予備実験であっても顕微鏡観察に耐え得る品質の切片を回収することができたため，以降の組織切片作製にはビブラトームによる直接切片化法を適用することとした．



図3 ビブラトームによって直接切片化されたゴマ種子の組織切片．

(3) ゴマ種子切片の微分干渉観察および組織化学染色を組み合わせた油脂分布の可視化
位相差観察法およびノルマルスキ型微分干渉フィルタによる偏光検鏡法を適用して，ゴマ種子中の油脂分布可視化を検討した．その結果，切片上には図4に示されたような顆粒状の凹凸が多数確認された．特に微分干渉フィルタによる観察法は，これまでに報告されているオイルボディの形状と類似する特徴を示していた．

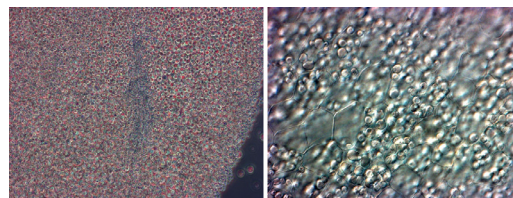


図4 生ゴマ種子切片の切断面（非染色）．PH観察（左），DIC観察（右）．

組織化学染色法の定法であるニールブルー試薬で油脂を染色処理したところ，青く染色された顆粒状の凹凸が多数確認された（図5参照）．それらはオイルボディとして種子中に含有することが既知であり，かつ偏光観察の結果と同様の状態であった．このこととエマルジョン画像の検討結果から，屈折率の差異による油脂の分布状態観察は可能であると推察された．ただし，本研究で用いた現有の機器では観察時における屈折率の設定範囲を自由に調整できないため，以降の実験では微分干渉観察とともに通常の染色法も組み合わせ適用することとした．その結果，ゴマ種子の細胞内部に分布するオイルボディが細胞壁に囲まれて分布している状態を確認することができたため，続けて加熱による影響を検討した．

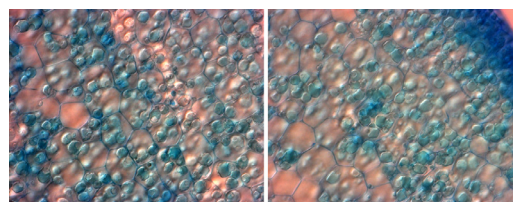


図5 微分干渉観察法および組織化学染色法を適用した生ゴマ種子中の油脂分布（オイルボディ分布）．

(4) 加熱されたゴマ種子中の油脂分布

ゴマ種子を加熱したのちビブラトームによって切片化，組織化学染色の後，微分干渉観察法によって油脂分布を観察，画像化した．図6は生ゴマ種子と加熱処理したゴマ種子それぞれの組織切片を示す．トルイジンブルー染色によって細胞壁も可視化されていることが確認できる．細胞壁の物理的な損傷は確認されなかったことから，本結果から類推する限り加熱処理が細胞構造自体に影響を及すこ

とはないと思われる。しかしながら、加熱処理によってオイルボディの大きさが縮小している様子が確認された。これらの結果から、油脂は加熱処理によって顕微構造的なレベルでの形態変化を生じ、その結果、粒内における分布状態にも何らかの差異が生じるものと推察された。

今後、加熱時間の経過に伴う構造変化と油脂分布の変化について詳細に解析する必要がある。

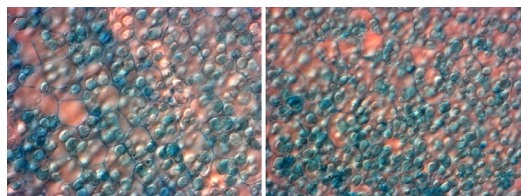


図 6 生ゴマ種子(左)および加熱処理した種子(右)中に分布するオイルボディの比較。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ①小川幸春, 田口聡, 山本奈美, 田川彰男, 納豆作製工程におけるダイズ粒の力学物性と顕微構造の変化, 日本食品工学会誌, 査読有, 9(3), 151-156, 2008.
- ②小川幸春, 田口聡, 山本奈美, 田川彰男, 力学的な圧縮による納豆粒の構造変化, 美味技術研究会誌, 査読有, 13, 46-50, 2009.
- ③小川幸春, 炊飯時の組織構造変化を利用した改質米飯作製の可能性, New Food Industry, 査読無, 52(10), 28-32, 2010.
- ④松浦元樹, 田川彰男, 小川幸春, 画像計測を利用した食品素材の弾性的特性値評価ー煮熟されたダイコンおよびニンジンのポアソン比計測ー, 食と緑の科学, 査読有, 65, 55-59, 2011.
- ⑤Yukiharu Ogawa, Satoshi Taguchi and Nami Yamamoto, Uniaxial compression and structural deformation of fermented soybean seed, Journal of Texture Studies, 査読有, doi:10.1111/j.1745-4603.2011.00304.x, 2011.

[学会発表] (計 5 件)

- ①小川幸春, 田口聡, 田川彰男, 力学的な圧縮による納豆粒の構造変化, 美味技術研究会第 8 回例会資料集, 13-14, 2008.
- ②小川幸春, 宮澤暁子, 田川彰男, エリンギ子実体の食感と組織構造特性, 美味技術研究会第 9 回例会資料集, 15-16, 2009.
- ③小川幸春, 田村匡嗣, 田川彰男, 調理・加工工程での組織構造変化を利用した食材の改質操作, FOOMA JAPAN 2010 アカデミックプラザ研究発表要旨集, Vol. 17, 88-91,

2010.

- ④Yukiharu Ogawa, Motoki Matsuura, Nami Yamamoto and Akio Tagawa, A Simple Method for Measurement of Poisson's Ratio for Tissue of Agricultural Products, XVIIth World Congress of the International Commission of Agricultural and Biosystems Engineering, CSBE100580, 2010.
- ⑤宝楽日其其格, 田川彰男, 小川幸春, 浸漬溶液の種類や濃度が蒸煮ダイズの硬さに及ぼす影響, 日本食品科学工学会第 57 回大会講演集, 79, 2010.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川 幸春 (OGAWA YUKIHARU)

千葉大学・大学院園芸学研究所・准教授

研究者番号: 00373126

(2) 研究分担者

山本 奈美 (YAMAMOTO NAMI)

和歌山大学・教育学部・講師

研究者番号: 20351934

(H21-H22: 連携研究者)