

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24380141

研究課題名(和文) 生体物質の分布状態の可視化と定量を狙った蛍光指紋イメージング技術の開発

研究課題名(英文) Development of fluorescence fingerprint imaging technology aiming at visualization and quantification of biological material

研究代表者

杉山 純一 (Sugiyama, Junichi)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・その他部局等・研究員

研究者番号：20353972

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,000,000円

研究成果の概要(和文)：分光イメージングと蛍光指紋を組み合わせ、前処理せずにパン生地中のグルテンと澱粉の分布を可視化する手法を開発した。パン生地、グルテン、澱粉の蛍光指紋を63波長条件の蛍光画像の撮像から再構築し、パン生地の各画素において、グルテンおよび澱粉との蛍光指紋の類似度を計算し、その類似度を各成分の存在確率として擬似カラーでマッピングすることにより、パン生地中のグルテンおよび澱粉の分布を可視化することに成功した。

研究成果の概要(英文)：A novel method integrating hyperspectral imaging and excitation-emission matrix (EEM) data measurement was developed and the distribution of gluten and starch in dough was visualized without any pre-processing. The fluorescence images of thin section samples of gluten, starch and dough were acquired at 63 different excitation and emission wavelength conditions, resulting in a set of data which consists of the EEM data of each pixel. Each pixel in the dough sample image was evaluated by the degree of cosine similarity between the EEM of the pixel and the EEM of gluten and starch. A high value of cosine similarity to gluten or starch would mean that the particular area in dough contained much gluten or starch, respectively. Each pixel was colored according to the similarity value to create a pseudo color image showing the distribution of gluten and starch. The stained image showed roughly the same patterns as the pseudo color EEM image, thereby validating the EEM imaging method.

研究分野：食品工学

キーワード：蛍光指紋 パン生地 グルテン 澱粉 イメージング

1. 研究開始当初の背景

食品は様々な成分あるいは材料から構成され、各成分の分布状態は、物性・食味・形態等に大きく影響する。一例をあげれば、パン生地はミキシングによりグルテンが形成され、その分布状態により、出来上がりのパンは大きく性質が異なる。その分布状態の最適化を確認するためにグルテンの分布の可視化が試みられてきたが、既存の手法は染色による方法しかなく、試料に与えるアーティファクトが大きく、類似物質との判別も困難で、染色ムラのため定量性も低いのが現状である。一方で、食品に限らず生体物質の成分分布を定量可視化する手法としては、分光イメージングによる水分、糖度の可視化(業績20) 蛍光 X 線による無機元素の可視化、MRIによる水分の可視化、赤外分光イメージングによる官能基の可視化等があるが、それ以外の物質に対しての可視化手法は極めて少ないのが現状である。

2. 研究の目的

(1) 様々な生体材料の可視化に対応できるような蛍光指紋イメージング装置の構築とともに、大幅な感度向上と迅速化を図る。

(2) これまでの 2 種類の異質な成分の可視化から、複数(3種類以上)・類似物質の分布を同時に可視化する技術を開発する。

(3) 特定のターゲット物質に関して、定量性を伴った分布の可視化技術を開発する。
試料は、複数・類似物質の分布は加工素材(例えばパン生地等)、定量分布は危害物質(カビ毒、微生物等)を対象とし、生体由来の物質の各分布あるいは存在量を非破壊・非接触で可視化し、その品質あるいは安全性を、空間情報を伴って評価できる手法を確立する。

3. 研究の方法

蛍光指紋の持っている膨大な情報量と感度の良さというメリットを情報技術と組み合わせることにより、物質の同定・判別・定量を画素単位に行い、擬似カラーで彩色することで可視化を実現した。すなわち、画素を蛍光指紋の検出器として使い、画素ごとに蛍光指紋を取得し、画素毎にその特徴を判断し、色に置き換えることにより、これまで見えなかったものの可視化を実現した。

図 1 に試作した蛍光指紋イメージング装置の構成を示す。キセノンランプを光源とした光は、回転フィルタ・ホイールに設置されている励起光用バンドパス・フィルタを透過することで励起光となり、ロッド・レンズにより均一光として試料に照射される。そこで生じた蛍光画像は、対物レンズを通じて回転フ

イルタ・ホイールに設置された蛍光用バンドパス・フィルタにより分光され、蛍光画像としてモノクロの CCD カメラにより記録される。励起光用バンドパス・フィルタと蛍光用バンドパス・フィルタの切り替えは PC により制御され、全ての組み合わせの蛍光画像が自動的に撮影される。分光方式には、モノクロメータを利用した分光も可能であるが、実際に撮像してみると光量が足りず非常に暗い画像となったため、バンドパス方式を採用した。しかし、その場合は、波長数はどうしても限りが出てくる。そのため、最適波長を事前に蛍光分光光度計による実験で調べることにより、最低限必要な波長を選択した。図 1 に構築した蛍光指紋イメージングシステムの概要を示す。

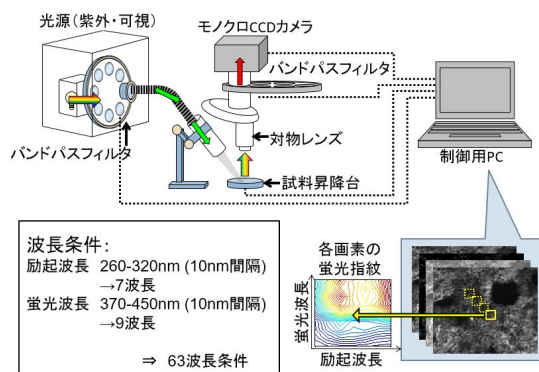


図 1 蛍光指紋イメージングシステム

当該システムにより、画素単位での蛍光指紋の情報が入手可能となり、図 2 のアルゴリズムにより、ターゲット成分の蛍光指紋との類似度を計算し、擬似カラーで表示することで可視化を行った。

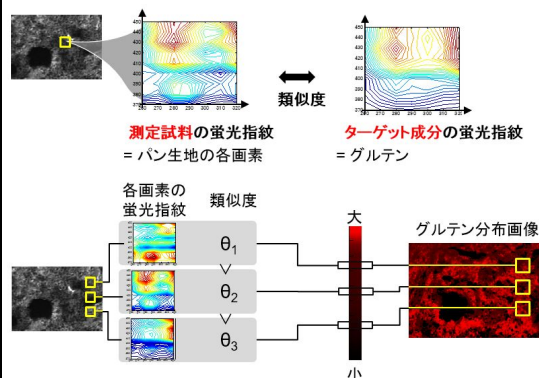


図 2 可視化アルゴリズム

4. 研究成果

図 3 は、蛍光指紋によるグルテンと澱粉の可視化画像と同一試料を 2 重染色して可視化した検証画像である。

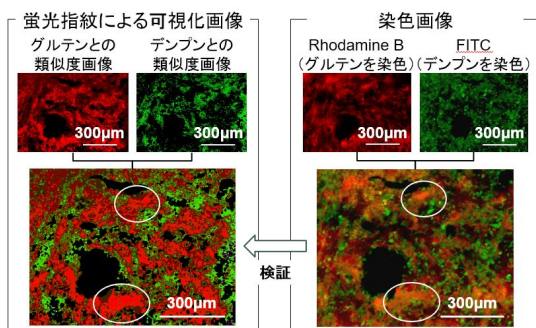


図3 グルテンと澱粉の可視化画像

両者は非常に似ているだけではなく、蛍光指紋イメージングはコントラストがハッキリしていることがわかる。

一般に染色画像は定量性が少ないと言われるが、各画素における、グルテンおよび澱粉の色濃度 (= 各物質の存在比) をプロット (図4) してみると、蛍光指紋イメージングは、両者の和が一定であるような線形性が成立するが、染色画像は、ほとんどランダムに分布し定量性が見いだせないことが明らかになった。すなわち、蛍光指紋イメージングは定量性も合わせ持っていることが明らかになった。

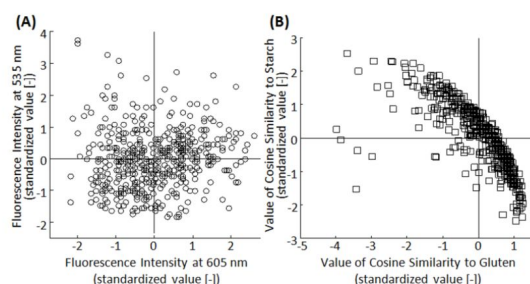


図4 グルテンと澱粉の存在比

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

Mito Kokawa, Naoto Yokoya, Hiroko Ashida, Junichi Sugiyama, Mizuki Tsuta, Masatoshi Yoshimura, Kaori Fujita, Mario Shibata, Visualization of Gluten, Starch, and Butter in Pie Pastry by Fluorescence Fingerprint Imaging, Food and Bioprocess Technology, 8(2), 2015, 409-419, DOI 10.1007/s11947-014-1410-y

M.Yoshimura, J.Sugiyama, M.Tsuta, K.Fujita, M.Shibata, M.Kokawa, S.Ohshita, N.Ohto, Prediction of aerobic plate count on beef surface using fluorescence fingerprint, Food and Bioprocess Technology, 7, 2014, 1496-1504, DOI 10.1007/s11947-013-1167-8

K.Nishino, K.Nakamura, M.Tsuta,

M.Yoshimura, J.Sugiyama, S.Nakauchi, Optimization of excitation-emission band-pass filter for visualization of viable bacteria distribution on the surface of pork meat. Optics Express, 21(10),2013, 12579-12591, DOI:10.1364/OE.21.012579

Mito Kokawa, Junichi Sugiyama, Mizuki Tsuta, Masatoshi Yoshimura, Kaori Fjita, Mario Shibata, Tetsuya Araki, Hiroshi Nabetani, Fluorescence fingerprint imaging of gluten and starch in wheat flour dough with consideration of total constituent ratio. Food Science and Technology Research, 19(6), 2013, 933-938, DOI:10.3136/fstr.19.933

Mito Kokawa, Junichi Sugiyama, Mizuki Tsuta, Masatoshi Yoshimura, Kaori Fjita, Mario Shibata, Tetsuya Araki, Hiroshi Nabetani, Development of a quantitative visualization technique for gluten in dough using fluorescence fingerprint imaging. Food and Bioprocess Technology, 5, 2012, DOI 10.1007/s11947-012-0982-7

〔学会発表〕(計10件)

吉村正俊, 中村円亮, 粉川美踏, Dheni Mita Mala, 川崎晋, 蔦瑞樹, 杉山純一, 中内茂樹, 蛍光指紋イメージングによる牛肉表面の生菌数可視化, 農業環境工学関連5学会2015年合同大会, 2015.9.14~9.18, 岩手大学(岩手県盛岡市)

Kokawa M, Ikegami S, Chiba A, Koishihara H, Sugiyama J, Tsuta M, Fujita K, Measuring cheese maturation by integrated use of fluorescence fingerprint and near infrared spectroscopy, International congress on engineering and food(ICEF12), 2015.6.14~6.18, ケベックシティ(カナダ)

N.Yokoya, M.Kokawa, J.Sugiyama, Spectral unmixing of fluorescence fingerprint imagery for visualization of constituents in pie pastry, IEEE International Conference on Image Processing(ICIP2014), 2014.10.28, Paris(France)

粉川美踏, 横矢直人, 芦田祐子, 杉山純一, 蔦瑞樹, 吉村正俊, 藤田かおり, 柴田真理朗, 蛍光指紋イメージングおよびスペクトル分解によるパイ生地中グルテン・澱粉・バターの可視化, 第73回農業食料工学会年次大会, 2014.5.18, 琉球大学(沖縄県中頭郡)

Junichi Sugiyama, Kaori Fujita, Masatoshi Yoshimura, Mizuki Tsuta, Mario Shibata, Mito Kokawa, Fluorescence Fingerprint Technology for Food Safety, The 12th Tunisian-Japanese Symposium on Society, Science and Technology, 2013.11.15 ~ 11.17, Hammamet(Tunisia)

Mito Kokawa, Junichi Sugiyama, Mizuki Tsuta, Kaori Fujita, Masatoshi Yoshimura, Mario Shibata, Tetsuya Araki, Hiroshi Nabetani, Visualization of gluten, starch, and butter in pie pastry by fluorescence fingerprint imaging, AACC International Annual Meeting, 2013.10.2, Albuquerque(USA)

Mito Kokawa, Junichi Sugiyama, Mizuki Tsuta, Kaori Fujita, Masatoshi Yoshimura, Mario Shibata, Tetsuya Araki, Hiroshi Nabetani, Visualization of multiple constituents in dough and pastry by fluorescence fingerprint imaging, 13th Conference on Methods and Applications of Fluorescence, 2013.9.12, Genova(Italy)

Mito Kokawa, Mizuki Tsuta, Junichi Sugiyama, Masatoshi Yoshimura, Kaori Fujita, Mario Shibata, Tetsuya Araki, Hiroshi Nabetani, Quantitative visualization of the distribution of gluten and starch in model dough with fluorescence fingerprint imaging, International Conference of Agricultural Engineering CIGR-AgEng2012, 2012.7.10, ヴァレンシア会議場(スペイン)

藤田かおり, 吉村正俊, 蔦瑞樹, 杉山純一, 粉川美踏, 柴田真理朗, 蛍光指紋計測による小麦粒赤かび毒のイメージング検出手法の開発, 日本食品科学工学会第 59 回(2012 年度)大会, 2012.8.30, 藤女子大学(北海道)

粉川美踏, 蔦瑞樹, 杉山純一, 藤田かおり, 吉村正俊, 柴田真理朗, 荒木徹也, 鍋谷浩志, パン生地の蛍光指紋イメージング: 成分存在比を考慮したカラーマッピング法, 日本食品科学工学会第 59 回(2012 年度)大会, 2012.8.30, 藤女子大学(北海道)

[図書](計1件)

杉山純一 他, 農林統計出版, スマート農業, 2014, 231-233

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉山 純一 (SUGIYAMA, Junichi)
食品研究部門・食品加工流通研究領域・上
席研究員
研究者番号: 20353972

(2) 研究分担者

蔦 瑞樹 (TSUTA, Mizuki)
食品研究部門・食品加工流通研究領域・主
任研究員
研究者番号: 80425553

荒木 徹也 (ARAKI, Tetsuya)
東京大学・農学生命科学研究科・准教授
研究者番号: 40420228