

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 27 日現在

機関番号：12401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24651023

研究課題名(和文) 機能的断層画像法による植物の無侵襲環境ストレスモニタ法の開発

研究課題名(英文) Non-invasive monitoring of environmental stress on plant using functional optical coherence tomography

研究代表者

門野 博史 (KADONO, Hirofumi)

埼玉大学・理工学研究科・教授

研究者番号：70204518

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではOCT(Optical Coherence Tomography)と呼ばれる光断層画像法およびバイオスペckルと呼ばれる生体内部の物質の輸送や微細構造の変化を反映する動的な光散乱現象に基づいて新規な機能的断層画像観測システムを構築した。これら2つの技術を統合し、細胞の活性状態を3次元的に高感度に観測可能なシステムを構築し、オゾンなどの環境ストレス下の植物に対して、影響評価手法としての可能性を検討した。信号評価法として、バイオスペckル信号の変動(標準偏差)に基づいた画像化法および、バイオスペckル信号の自己相関関数を求めその相関時間を解析する手法を提案し有効性を検証した。

研究成果の概要(英文)：In this study, a novel and non-invasive monitoring method of biological activities of plant under environmental stress was developed using an optical coherence tomography (OCT) together with a statistical properties of biospeckle. The biospeckle is generated by the dynamic motion of organelles inside a cell, and hence can reflect the biological activities of plant leaf. The proposed functional OCT system experimentally demonstrated to observe three-dimensionally the biological activities of plant under ozone stress. To analyze the biospeckle signal, two types of analysis were proposed and examined. One is based on the magnitude of the fluctuation (standard deviation) of the signal. The other one is to analyze temporal characteristics of the signal, i.e., an autocorrelation function of the signal. As experimental results of ozone exposure, it was revealed that those two methods could immediately detect an independent response about environmental condition.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・環境影響評価・環境政策

キーワード：光断層画像法 オゾンストレス バイオスペckル 植物活性 環境ストレス 環境汚染評価 非破壊検査

### 1. 研究開始当初の背景

近年、特に大都市周辺では、大気汚染など人間を含む動植物を取り巻く環境は著しく悪化している。したがって、環境が生物の成長あるいは内部活性に与える影響を正確に計測する技術の確立が望まれる。例えば、大気汚染物質であるオゾン<sup>1</sup>は、植物の成長において形態だけでなく体内の生理学的状態にも影響を与えることが分かっている。

従来の生理学的な分析法では植物体や一部の組織を採取するなど侵襲型の分析が主としておこなわれてきた。このような手法はその場での迅速な測定や絶滅危惧種などの貴重な植物の計測には適していない。これに代わって、光学的手法は非破壊・無侵襲で植物内部の状態を生きたまま観察可能である。また多くの場合、空間分解能が高いことが特徴である。申請者はこれまでに、OCT(Optical Coherence Tomography)と呼ばれる光断層画像法を用いて、環境影響下の、生きたままの植物の内部構造の観測システムを研究してきた。これにより、環境条件が与える植物内部の解剖学的な構造変化を観測することは出来るが、感度が高くないことが課題となっていた。

### 2. 研究の目的

従来の OCT 技術は対象物体の解剖学的な構造を可視化するだけであったのに対して本研究では、OCT 技術に基づいて、環境影響下の植物体内の生理学的変化を感度良く捉えるためにバイオスペckル<sup>2</sup>の動特性を利用した新規な機能的断層画像観測システムを構築する。生体をレーザー光などで照明すると生体内部の物質の運動に従って時間的に変動する斑点状のランダムなパターンが発生する。これはバイオスペckルと呼ばれており、その運動は内部の物質の輸送や微細構造の変化を反映している。Fig.1 に申請者らが予備実験として植物に対して pH が 2 の強い人工酸性雨を与えた際のバイオスペckルに基づく活性状態の変化を示す。

投与後 3 週間目には葉全体の活性が低下していることがわかる(Fig.1(b))。しかしながら本手法は、光が生体に進入して出射するまでのすべての部位の積分となるため、高感度なセンシングができない。そこで、上述した 2 つの技術を組み合わせることにより、環境条件に敏感に反応する部位を特定し、生理学的・形態的反応を 3 次的に

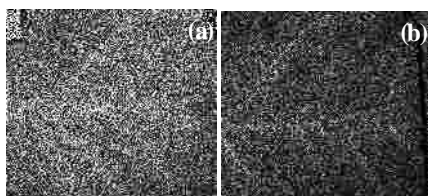


Fig. 1 Observation of leaf damaged with acid rain with pH 2. (a) before exposure to acid rain; (b) 21 days after the exposure

高感度に観測可能なシステムを構築する。このために、バイオスペckル<sup>2</sup>観察に適した OCT システムを設計する。具体的には、新規低コヒーレンス光源を用いて横および深さ方向の分解の向上と深さ方向の観測レンジの拡大を試みる。また、構築したシステムを用いて、オゾンなどの環境ストレス下の植物に対して、実験により本手法の有効性を検証する。この技術は新しい環境評価手法として意義が大きいだけでなく、農業分野での応用では、短時間で効率的な品種改良や、新規なバイオセンサーとしての活用が期待できる。

### 3. 研究の方法

本研究では、環境ストレス下にある植物からのバイオスペckル<sup>2</sup>を利用するため時間的変動(数十 Hz)を分解して 2・3 次元計測計測をおこなう高速なシステムを研究前半で構築した。後半ではその計測システムを用いて、環境ストレス下の植物の応答計測に関する実験的研究をおこなった。環境ストレスとしては大気汚染物質として改善の兆しのない光化学オキシダントの主成分であるオゾンに対する植物の応答計測を主としておこなった。これらの実験と平行して従来法による生化学的な植物の活性状態の評価法である、光合成速度、クロロフィル蛍光反応などと比較測定をおこない有効性を実証した。

#### (1) 機能的断層画像計測システムの構築

現有の断層画像計測システムでは、散乱および吸収の大きな植物に対して観測可能な深さが浅く、またデータ取得速度が遅い欠点がある。本研究では、バイオスペckル<sup>2</sup>を利用するためバイオスペckル<sup>2</sup>の時間的変動を分解して 2・3 次元計測しなければならない。したがって、より高速なシステムを構築する必要がある。

研究の予備段階として構築した OCT システムは時間領域 OCT と呼ばれるシステムであり、機械的可動部分を含むため高速な深さ方向のスキャンができなかった。そこで、この問題を解決するため高速動作が可能なシステムとしてスペクトルドメイン OCT を構築した。本システムは可動部分を持たないため原理的に高速動作に適している。

具体的には以下の点に焦点を絞りシステムの開発をおこなった。観測可能深さの拡大、データ取得の高速化、高速なデータ処理である。

#### (2) 植物の環境ストレスモニタリング

光化学オキシダントは、我が国において環境基準が達成できていないだけでなく、濃度が近年においても上昇し続けている大気汚染物質である。この光化学オキシダントの主成分であるオゾンは、その強い酸化力ゆえに世界的に農作物の成長抑制や収量低下、森林植生に対して潜在的な悪影響を及ぼしていることが指摘されている。開発した計測シス

テムを用いて、植物の環境ストレスに対する応答計測の実験をおこなった。埼玉大学では計測装置の基本性能評価も実施した。このために簡易な植物育成装置を使用した。同時に種々の濃度のオゾン暴露実験をおこない、バイオスペckル断層画像を解析した。さらにオゾンストレスに対して特に強く反応する部位の評価をおこなった。

本実験は埼玉県環境科学国際センターの人工気象室を利用することにより日照・温度・湿度・CO<sub>2</sub>濃度など細かな条件設定をおこない効率的に実行した。人工気象室を用いた屋内実験およびフィールドにおいてオゾンストレス下にある植物の極短時間成長挙動を明らかにし、オゾン濃度との相関関係を定量的に調べた。

最後に、環境に対する植物のストレス応答計測システムとしての有効性を総合的に評価し、植物を通じた環境評価法としての可能性を評価した。

#### 4. 研究成果

##### (1) バイオスペckルOCTシステム

Fig.2 に本研究で構築したスペクトルドメイン OCT システムを示す。光源として中心波長 861nm, スペクトル幅 55.2nm の Super luminescent Diode (SLD)を用いた。光源を出射した光はサーキュレータを通過した後、99:1のカップラーにより物体光と参照光に分割される。物体光側にはガルバノミラーが配置されており、プローブ光は物体上を2次元的にスキャン可能である。物体および参照ミラーから戻ってきた光は再びカップラーにより合波され、サーキュレータを通過した後、回折格子(Grating), レンズ(L5,L6)ライン CCDにより構成されるスペクトロメータに入射する。スペクトル干渉信号はライン CCDカメラにより計算機に取り込まれ、フーリエ変換を行い物体上の各点(x,y)における深さ方向の反射率分布が計算される。ガルバノミラーを走査することにより計算機内で2次元および3次元の断層画像を構成することができる。

構築したシステムでは、深さ分解能 6 $\mu$ m, 横方向分解能 22 $\mu$ m が得られた。画像取得速度に関しては 1024 $\times$ 2500pixel の画像に対して 10 frames/sec を実現した。また、画像分解能を下げることにより最大で 100

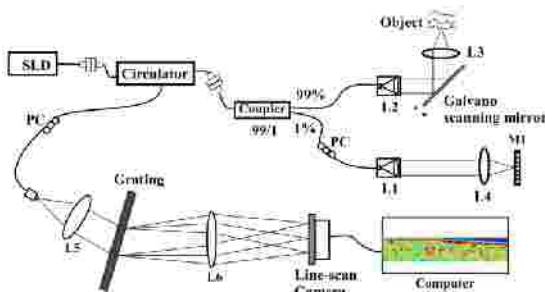


Fig. 2 Experimental system of spectral domain optical coherence tomography system

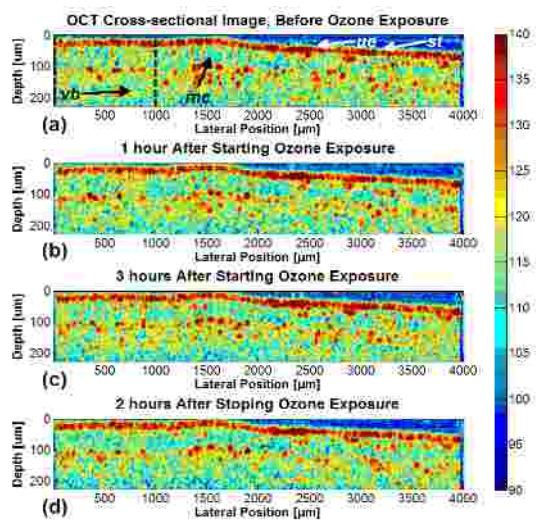


Fig. 3 Obtained conventional structural OCT cross-sectional images. (a) Before exposure of O<sub>3</sub>. (b) 1 hour after starting exposure. (c) 3 hours after starting exposure. (d) 2 hours after stopping exposure (CF air treatment). ue-upper epidermis, mc-mesophyll cell, ve-vesicular bundle, st-stomata.

frames/sec を取得可能である。また、ガルバノミラーを固定することにより、固定点での深さデータは 2,5000 lines/sec が実現された。この早いサンプリング速度はバイオスペckル信号の時間特性を解析するために特に重要である。

##### (2) 植物のオゾンストレス反応の観測

植物としてニラを用いてオゾン曝露を行いオゾンストレス下の反応を構築した機能的 OCT システムを用いて計測した。曝露するオゾン濃度は 80ppb, 120ppb および 240ppb とした。120ppb および 240ppb のオゾン濃度はそれぞれ光化学オキシダント注意報および多くの自治体で警報が発令される濃度である。オゾン濃度モニターからの信号はオゾン発生器にフィードバックされており、曝露実験中濃度は 0.5% の精度で制御された。

実験では、初めに活性炭を用いたフィルター(CF)によりオゾン除去した空気に 3 時間植物試料を置き、その後所定の濃度のオゾンに 3 時間曝露し、さらに曝露終了後 3 時間観測した。

Fig.3 に(a)曝露前, (b)曝露開始後 1 時間, (c) 3 時間, (d)曝露終了後 2 時間の反射光強度を可視化した従来の OCT 断層画像を示す。図から分かるように、表皮組織(ue)および柵状組織(mc)等の構造が確認できるが、オゾン曝露の影響は顕著には確認できない。

##### (3) バイオスペckル信号の標準偏差に基づく可視化

次に, Fig.3 のような断層画像を連続して取得し、各点において時間軸方向にその強度を調べるとランダムに変動していることが分かる。これがバイオスペckル信号であり、その成因から明らかなように、細胞層の構造変化や細胞内の微小器官の動きを反映した変動である。したがって、細胞の活性状態を反映した信号であると解釈できる。本研究で

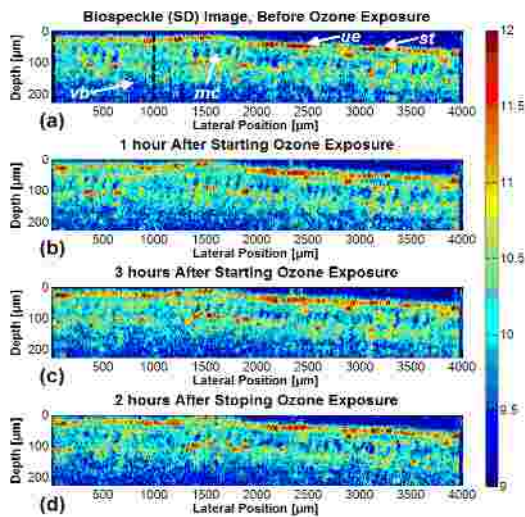


Fig.4 Obtained functional OCT biospeckle images. (a) Before exposure of O<sub>3</sub>. (b) 1 hour after starting exposure. (c) 3 hours after starting exposure. (d) 2 hours after stopping exposure (CF air treatment).

はこのバイオスペckル信号揺らぎの大きさ，具体的には標準偏差(SD)に注目して断層画像を構成した。Fig.3 に対応するバイオスペckル標準偏差断層画像を Fig.4 に示す。バイオスペckル標準偏差断層画像では従来の断層画像に比べて柵状組織の縦に細長い構造がより鮮明に可視化されていることが分かる。また，表皮組織においてオゾンに対する反応がより顕著に表れていることが分かる。

Fig.5 に Fig.4 の断層画像の横位置 1,000 $\mu\text{m}$  から 2,000 $\mu\text{m}$  までの領域を横方向に平均化したバイオスペckル標準偏差信号の深さ分布を示す。図から分かるように，特に表皮組織において特異な変化が認められる。曝露開始後 3 時間で SD が 44% と大きく増加していることが分かる。一方，Fig.4 の従来の断層画像信号では僅か 3.8% の増加であった。このことは，バイオスペckル標準偏差は，葉の組織のオゾンストレス反応をより感度良く検出可能であることを示している。

Fig.6 にニラの葉の(a)裏面と(b)表面に対して得られた SD 値のオゾン曝露による変化を

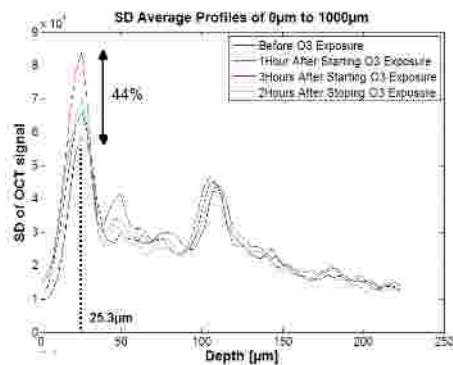
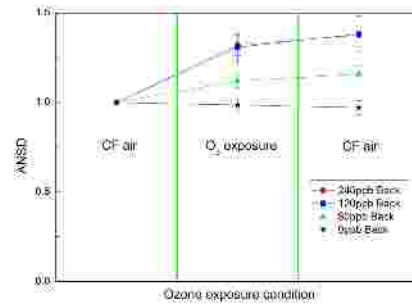
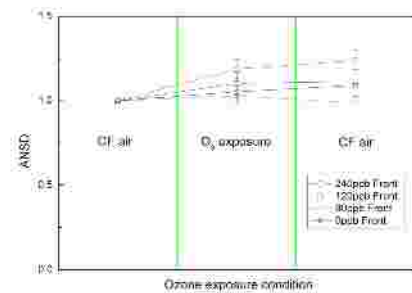


Fig.5 Averaged depth profiles of standard deviation of biospeckle signals at different timing of ozone exposure to Chinese chives. Depth profile was averaged over 1000 $\mu\text{m}$ .



(a)



(b)

Fig. 6 Averaged normalized SDs of biospeckle signal from (a) back surface and (b) back surface of Chinese chive leaves under O<sub>3</sub> exposures of 0, 80, 120, and 240ppb.

示す。SD 値は曝露前の値で規格化されており，バーは 18 回の測定に対する標準エラーを示している。図より，オゾン曝露に対して SD 値は増加しておりオゾン濃度が高いほど大きな値を示していることが分かる。また，葉の表面と裏面を比べると 80ppb と 120ppb では裏面で 38% および 16% の増加に対して表面では 12% および 0% の増加であり，裏面の反応の方が大きく現れていることが分かる。また，240ppb では裏面と表面でそれぞれ，38% および 24% の増加であり差は小さくなっている。これは 240ppb の高濃度により反応が飽和し始めたためではないかと思われる。また，表面と裏面の反応の差については，気孔密度の差が考えられたが，顕微鏡による気孔密度の計測の結果(Fig.7)表面と裏面でそれぞれ，11.1 および 12.3 個/ $\text{mm}^2$  であり有意な差は見られなかった。気孔開口度などの差が考えられるがこれは将来の課題となっている。

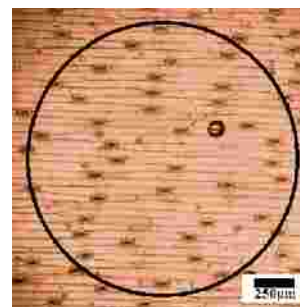


Fig. 7 Observation of strama on Chinese chive leaf using optical microscope

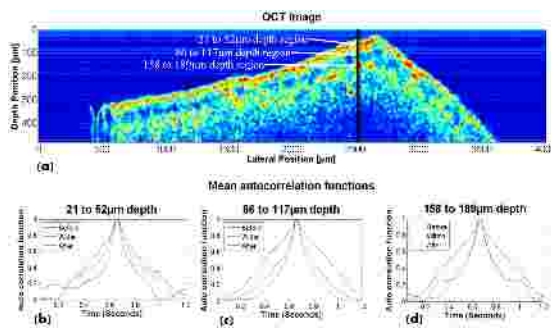


Fig.8 (a) OCT Image of leaf back surface, (b) averaged autocorrelation functions over 21 to 52 $\mu$ m depth layer (epidermal layer), (c) averaged autocorrelation functions over 86 to 117 $\mu$ m depth layer (mesophyll cell layer), and (d) averaged autocorrelation functions over 158 to 189 $\mu$ m depth layer (layer below the mesophyll cells)

#### (4) バイオスペckル信号の時間特性による評価

バイオスペckル信号の揺らぎの大きさ(標準偏差)による方法では、植物組織の大きな吸収により、表面下の深部では明確な反応の差が得られないという欠点がある。そこで、新たな信号解析法として、バイオスペckル信号の時間特性に注目した。ここでは、初めに通常のバイオスペckル SD 画像を取得した後特定の部位でプローブビームを固定し、その1点において深さ信号を高速で(2,500Lines/sec)取得し、各点においてバイオスペckル揺らぎ信号の自己相関関数を計算し、相関時間(CL)を解析した。自己相関関数の定義から明らかなように CL が大きいほど変動は緩やかであり、したがって組織内部の変化は緩やかであると考えられる。

Fig.8(a)にニラの葉の裏面に対する通常の断層画像を示す。図(b)-(d)はそれぞれ深さ位置 21-52 $\mu$ m (表皮組織)、深さ 86-117 $\mu$ m (柵状組織) および深さ 158-189 $\mu$ m (柵状組織下の組織)におけるバイオスペckル信号のオ

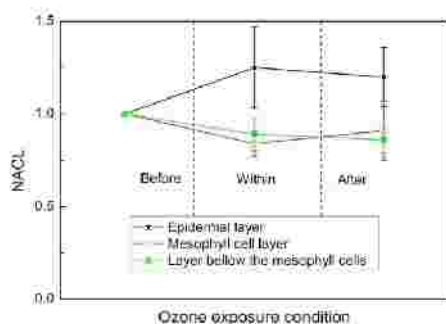


Fig.9 Normalized averaged correlation length (NACLs) of biospeckle signals coming from different layers (from back surface) of Chinese chive leaves under O<sub>3</sub> exposures of 240ppb. Each average value was plotted with standard error for 16 measurements.

ゾン曝露に対する変化の例を示す。Fig.9 はそれぞれの層で得られたバイオスペckル信号の自己相関関数より求めた相関時間を曝露前の相関時間で規格化した値(NACL)を示す。図よりバイオスペckル信号の時間特性は表面の表皮組織と柵状組織以下では全く異なる反応を示していることが分かる。表皮組織では相関時間が増大する傾向があり、このことはスペckル信号の時間変動がオゾン曝露とともに緩やかになることを表している。一方、深部ではオゾン曝露と共に時間変動が早くなっていることがわかる。これはオゾンストレスがかかったことによりオゾンに対する防御機構が活性化されたためではないかと考えられる。

本研究では、環境ストレスや環境汚染が植物に与える影響を非接触かつ無侵襲でモニタしその影響の評価法の開発を目指した。手法として OCT 技術に新たにバイオスペckル信号を利用することにより、従来のように生体試料の単純な解剖学的な情報だけでなく、活性状態をモニタ可能な機能的 OCT システムを開発した。解析法としてバイオスペckル信号の揺らぎの大きさに着目してその標準偏差および時間特性に着目した相関時間に基づく方法を提案した。これら2つの情報は独立な情報として得られ、いずれもオゾン曝露開始後1-2時間後にはその影響のモニタが可能であった。

従来は、褐色状の斑点などの可視被害が生じるまで数日を要していた。また、生化学的な分析ではその場計測ができないこと、無侵襲でなく時間を要するなど多くの問題がある。本手法はこれらの問題に対して利点を持ち従来法を補完する新規な環境ストレスモニタ法として有益であると思われる。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

1. L. K. T. Srimal, H. Kadono, and U. M. Rajagopalan, "Optical coherence tomography biospeckle imaging for fast monitoring varying surface responses of a plant leaf under ozone stress", Proc. of SPIE, 査読有, Vol. 8881, 88810H (2013). doi: 10.1117/12.2031062

〔学会発表〕(計6件)

1. L. K. T. Srimal, H. Kadono, "Functional optical coherence tomography (fOCT) based on biospeckle to monitor environmental stresses on plants", JSAP-OSA Joint Symposia, Hokkaido Univ., Sapporo, 17-20, Sep. (2014).
2. L. K. T. Srimal, H. Kadono, and U. M. Rajagopalan, "Optical Coherence Tomography (OCT) biospeckle signal analysis to investigate response of plant leaves to ozone", 23rd Congress of International Commission for Optics (ICO-23), Santiago de Compostela, Spain, 26-29 Aug. (2014). (Oral presentation will be done)

3. L. K. T. Srimal, H. Kadono, and T. Yonekura, "OCT biospeckle imaging to investigate response of plant leaves to ozone", Optics & Photonics Japan 2013, Nara New Prefectural Public Hall, Nara Kasugano-City, Japan, 12-14 November, 12pA4(2013). (Oral presentation was done)
4. L. K. T. Srimal, H. Kadono, and T. Yonekura, "Ozone stress monitoring of plants based on OCT biospeckle imaging: 2nd report", The 74th Autumn Meeting of The Japan Society of Applied Physics, Kyotanabe Campus, Doshisha Univ., Japan, 16-20 Sep., 17p-C1-6(2013). (Oral presentation was done)
5. L. K. T. Srimal, H. Kadono, and U. M. Rajagopalan, "Optical coherence tomography biospeckle imaging for fast monitoring varying surface responses of a plant leaf under ozone stress", International conference on Sensing Technologies for Biomaterial, Food, and Agriculture 2013 (SPIE SeTBio 2013), Pacifico, Yokohama, Japan, 23-26 Apr., SeTB3-16, (2013). (Oral presentation was done)
6. L. K. T. Srimal, and H. Kadono, "Monitoring plant leaf response under ozone stress based on OCT biospeckle signal", The 60th Spring Meeting of The Japan Society of Applied Physics, Kanagawa Institute of Technology, Japan, 27-30 Mar., 29a-A2-8(2013). (Oral presentation was done)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

門野 博史 (KADONO, Hirofumi)

埼玉大学・大学院理工学研究科・教授

研究者番号：70204518

### (2)研究分担者

米倉 哲志(YONEKURA, Tetsushi)

埼玉県環境科学国際センター・自然環境

担当・研究員

研究者番号：40425658