

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 2 日現在

機関番号：52501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2014～2016

課題番号：26450272

研究課題名（和文）蛍光計測による環境ストレスを受けた海苔の劣化初期段階の診断技術の開発

研究課題名（英文）Diagnosis of initial stage of degradation of Susabi-nori by fluorescence measurements

研究代表者

岡本 保 (Okamoto, Tamotsu)

木更津工業高等専門学校・電気電子工学科・教授

研究者番号：80233378

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,800,000円

研究成果の概要（和文）：環境ストレスを受けた海苔の劣化初期段階の診断技術の確立を目指して、蛍光スペクトル測定、蛍光寿命測定による海苔診断技術の開発を行った。まず、蛍光寿命測定を行い、初期のあかぐされ病においてより感度の高い測定法であることを明らかにした。次に、葉体各部位での蛍光測定を行い、蛍光スペクトルおよび蛍光寿命の海苔葉体内での分布を明らかにした。さらに、励起蛍光マトリックス（EEM）の測定を行い、正常なスサビノリおよびあかぐされ病に感染したスサビノリなどのEEMを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We performed the diagnosis of initial stage of degradation of Susabi-nori by fluorescence measurements. First, fluorescence lifetime of Susabi-nori (*Porphyra yezoensis*) was investigated by time-resolved fluorescence spectroscopy. It was found that the fluorescence lifetime measurement was sensitive method for the diagnosis of Susabi-nori compared with the conventional fluorescence spectroscopy. Furthermore, we measured fluorescence spectra and lifetimes in each part of Susabi-nori, and excitation emission matrix.

研究分野：光計測

キーワード：スサビノリ 海苔 蛍光計測 レーザー誘起蛍光法 蛍光寿命

### 1. 研究開始当初の背景

海苔養殖は海を生産の場とするため、気象、海象の影響が大きく、さらに生態系の生物の相互の関係によっても影響を受ける。また、赤潮や疾病などによる被害も問題となっている。これまでは、海苔養殖の漁業従事者が、これらの影響を目視などの経験則によって状態の判断していた。しかし、より安定な生産を行うためには、疾病や障害を定量的に判断する方法が必要である。我々は、その計測手段として非破壊で簡便かつ迅速に定量的な測定が行える蛍光計測法を提案し、病害の影響や淡水によるストレスにより、蛍光スペクトルが変化することを明らかにしてきた。

一方、可視判断ができる状態以前の早期の段階で診断する手法も求められている。あかぐされ病などの発生の初期に検出が可能となると病害の蔓延の防止が容易になり、海苔の安定生産に大きく貢献できる。

### 2. 研究の目的

本研究では、従来の蛍光計測技術に加えて蛍光寿命測定などの新しい技術を取り入れることにより、環境ストレスを受けた海苔の劣化初期段階の診断技術を確立することを目的としている。

### 3. 研究の方法

環境ストレスを受けた海苔の劣化初期段階の診断技術の確立を目指して、本研究では(1) 蛍光寿命測定技術の確立、(2) 葉体各部位での蛍光スペクトルおよび蛍光寿命測定、(3) 低温での蛍光測定、(4) 励起蛍光マトリックス (EEM) の測定を行った。千葉県水産総合研究センター、金田漁業協同組合、新富津漁業協同組合と連携して研究を進めた。

海苔の光学的評価方法としては、半導体材料の評価装置として保有するマルチチャンネル分光器、蛍光寿命測定装置、紫外可視分光光度計、分光感度測定装置等を利用して行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 蛍光寿命測定技術の確立

蛍光寿命測定には浜松ホトニクス製の小型蛍光寿命測定装置 (Quantaurs-Tau) を使用した。励起光源にパルスレーザ (パルス幅: ~60ps) を用いて蛍光寿命測定を行った。パルスレーザを用いることにより、パルス幅が小さくなり、時間分解能の高い測定が可能となる。励起光の波長はスサビノリの生育診断に適している励起波長であるフィコエリスリンの吸収ピーク波長付近の 470 nm の励起光を用いて蛍光寿命測定を行った。測定した蛍光波長はフィコエリスリンに起因すると思われる蛍光波長の 580 nm、およびクロロフィル a に起因すると思われる蛍光波長の 720 nm とした。得られた蛍光減衰曲線をデコンボリューション処理することにより蛍光寿命を解析した。今回測定した蛍光寿命は 2 成分

と仮定し、下記の式を用いてフィッティングを行い、デコンボリューション処理を行うことにより導いた。

$$G(t) = A_1 \exp(-t/\tau_1) + A_2 \exp(-t/\tau_2)$$

平均寿命は下記の式を用いて導いた。

$$\langle \tau \rangle = (\sum \tau_i^2 A_i) / (\sum \tau_i A_i)$$

図 1 に正常なスサビノリおよびあかぐされ病に感染したスサビノリの蛍光スペクトルを示す。あかぐされ病に感染したスサビノリは正常なスサビノリに比べて 580 nm の蛍光強度が高くなっている。また、あかぐされ病に感染したスサビノリだけに注目してみると 580 nm の蛍光強度に違いが見られる。これは病気の進行につれて 580nm の蛍光強度が強くなるためだと考えられる。そのため今回測定したスサビノリでは (a) → (d) の順に病気が進行していると考えられる。

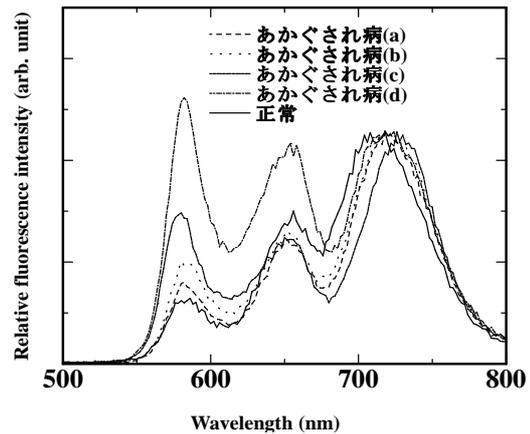


図 1 正常なスサビノリおよびあかぐされ病に感染したスサビノリ (a) ~ (d) の蛍光スペクトル (励起波長: 470 nm)

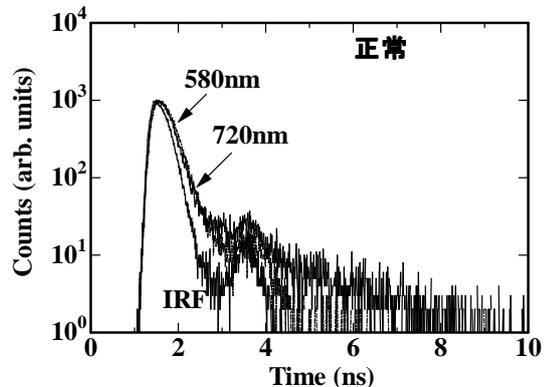


図 2 正常なスサビノリの蛍光減衰曲線

図 2 に正常なスサビノリの蛍光減衰曲線を示す。正常なスサビノリの蛍光寿命は各蛍光ピークでの大きな差は見られなかった。また平均蛍光寿命を算出したところ 580 nm の蛍

光ピークの場合で 0.12 ns · 0.19 ns、660 nm の蛍光ピークの場合で 0.15 ns · 0.17 ns、685 nm の蛍光ピークの場合で 0.21 ns · 0.22 ns、720 nm の蛍光ピークの場合で 0.12 ns · 0.13 ns という値が得られた。

図 3、図 4 にあかぐされ病に感染したスサビノリ (a) および (d) の蛍光減衰曲線を示す。あかぐされ病に感染すると各蛍光ピークの寿命が正常な場合に比べて長くなることがわかる。また、あかぐされ病が進行するにつれて各ピークの蛍光寿命が長くなっていることも確認できる。

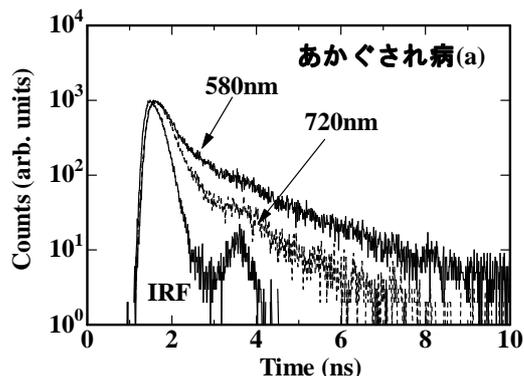


図 3 あかぐされ病に感染したスサビノリ (a) の蛍光減衰曲線

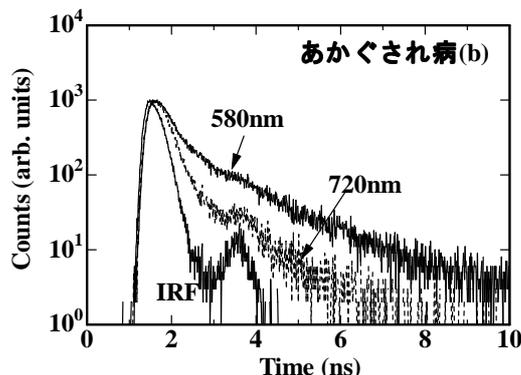


図 4 あかぐされ病に感染したスサビノリ (d) の蛍光減衰曲線

得られた結果より、あかぐされ病の指標となるフィコエリスリンに起因すると考えられる 580 nm 付近のピーク強度  $I_{580}$  とクロロフィル a に起因すると考えられる 720 nm 付近のピーク強度  $I_{720}$  の強度比  $I_{580}/I_{720}$  と 580 nm のピークおよび 720 nm のピークの平均蛍光寿命の関係を図 5 に示す。これまでの研究で、あかぐされ病に感染すると 580 nm 付近のピーク強度  $I_{580}$  が相対的に増加することがわかっている。すなわち、あかぐされ病が進行すると蛍光ピークの強度比  $I_{580}/I_{720}$  が大きくなる。580 nm の蛍光寿命に着目すると、蛍光ピークの強度比  $I_{580}/I_{720}$  が増加するにつれて平均蛍光寿命が長くなっている。このことより、蛍光寿命測定によりあかぐされ病の診断が可能であることがわかる。また、強度比  $I_{580}/I_{720}$  ではほとんど変化が見られない軽度のあかぐされ病の場合でも、580 nm の平均蛍

光寿命は大きく変化している。このことより、蛍光寿命測定は初期のあかぐされ病においてより感度の高い測定法であるといえる。

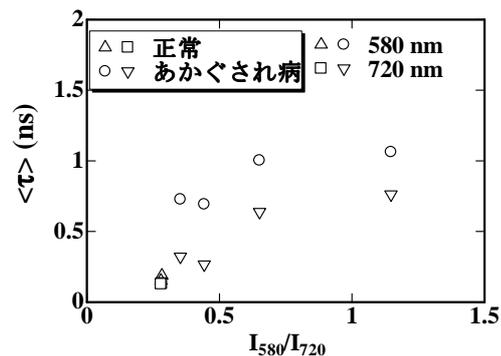


図 5 蛍光ピーク強度比と蛍光寿命の関係

また、580 nm の平均蛍光寿命が、強度比  $I_{580}/I_{720}$  が 0.5 以下の範囲で急激に増加しているのに対して、720 nm の平均蛍光寿命は強度比  $I_{580}/I_{720}$  にほぼ比例して増加している。この結果は、色素間でのエネルギー移動に関連していると考えられる。励起光に用いた波長 470 nm の光は主としてフィコエリスリンで吸収される。フィコエリスリンで吸収された光のエネルギーは様々な過程を介して光合成反応中心であるクロロフィル a へとエネルギー移動する。そのため、フィコエリスリンに起因すると考えられる 580 nm の蛍光とクロロフィル a に起因すると考えられる 685 nm および 720 nm の蛍光の両方が観測される。正常なスサビノリの場合には、フィコエリスリンで吸収された光のエネルギーはスムーズにエネルギー移動され、クロロフィル a に移動されたエネルギーはスムーズに光合成に利用される。そのため、フィコエリスリンに起因すると考えられる 580 nm の蛍光およびクロロフィル a に起因すると考えられる 685 nm および 720 nm の蛍光の寿命は 0.1 ns · 0.2 ns 程度と短くなると考えられる。一方、あかぐされ病に感染すると、初期の段階ではまずフィコエリスリンで吸収されたエネルギーのクロロフィル a への移動が阻害されるため、580 nm の蛍光寿命が長くなると考えられる。さらにあかぐされ病が進行すると、クロロフィル a に移動されたエネルギーの光合成への利用も阻害されるようになるため、720 nm の蛍光寿命が長くなると考えられる。これらのことより、蛍光寿命測定によりあかぐされ病の診断が可能であることがわかる。

## (2) 葉体各部位での蛍光測定

次に、正常なスサビノリの葉体各部位での蛍光スペクトルおよび蛍光寿命を測定した。図 6 に葉内の異なる部位の蛍光スペクトルを示す。この図では、基部 (根元の緑がかった部分) および基部から葉状体の中央部に向けて 5 cm 離れた部分の蛍光スペクトルを示している。励起光源には、波長 488 nm の LD

励起固体レーザー (30 mW, 85BCD030, Melles Griot) を用いた。この図によると、基部から 5 cm 離れた部分の蛍光スペクトルはこれまでに報告した正常なスペクトルと同様であるが、基部では 720 nm のクロロフィル蛍光の強度が他のピークに比べ相対的に強いことがわかる。

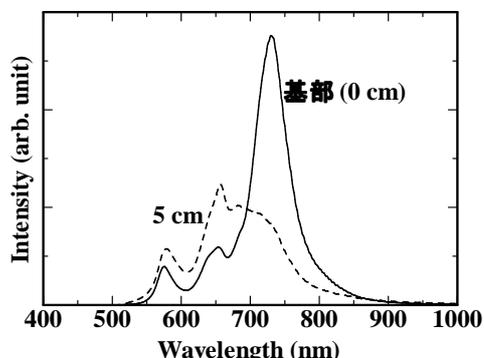


図6 葉内の異なる部位の蛍光スペクトル

図7に葉内各部位の平均蛍光寿命を示す。蛍光寿命測定の際には波長 483 nm のパルスレーザーを用いた。横軸は基部を 0 cm として、基部から葉状体の中央部方向への距離を示している。縦軸は測定した蛍光減衰曲線を用いて、2成分の蛍光寿命を仮定してフィッティングして算出した平均蛍光寿命を示している。基部 (0 cm) では、580 nm および 720 nm の平均寿命は 0.8~1.0 ns 程度であり、これまでに報告した通常の正常なスサビノリの蛍光寿命 (0.1~0.2 ns 程度) より長くなっている。中央部に近づくにつれて平均寿命は減少し、基部からの距離が 4 cm 程度以上になると通常の正常なスサビノリの平均蛍光寿命と同程度になった。

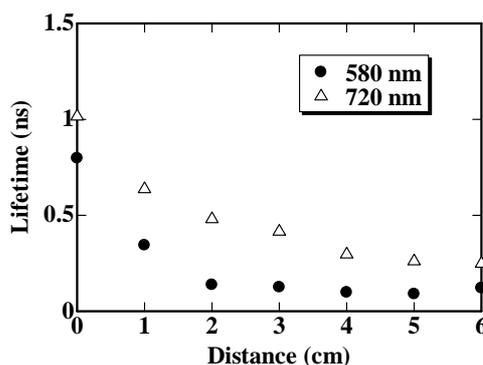


図7 葉内各部位の平均蛍光寿命

### (3) 低温での蛍光計測および蛍光寿命測定

次に、低温でのスサビノリの蛍光スペクトルおよび蛍光寿命を測定した。図8に蛍光波長 720 nm の場合の室温および液体窒素温度で計測した蛍光減衰曲線を示す。クロロフィル a に起因する蛍光波長 720 nm の場合には、平均蛍光寿命は室温で約 0.32 ns、液体窒素温度 (77 K) で約 1.7 ns となった。一方、フィコエリスリンに起因する蛍光波長 580 nm の場合には、室温で約 0.18 ns、77 K で約 0.51

ns であった。この結果より、液体窒素温度にすると蛍光寿命が室温に比べて長くなり、特に 720 nm の蛍光寿命が大幅に長くなることが明らかとなった。図9に室温および液体窒素温度で計測した蛍光スペクトルを示す。蛍光スペクトルでは、720 nm の蛍光ピークの強度が非常に強くなり、580 nm の蛍光ピークなどの強度は相対的に非常に小さくなった。このメカニズムは次のようであると考えられる。今回用いた励起光 (483~488 nm) は主としてフィコエリスリンに吸収される。フィコエリスリンで吸収された光エネルギーは様々な過程を介して光合成反応中心であるクロロフィル a へ移動し、光化学反応が起こるが、一部は蛍光として放出される。液体窒素温度に冷却すると、励起エネルギー移動や光化学反応が妨げられ、光合成で使われるはずのエネルギーが蛍光として放出されるため、蛍光強度が増すとともに蛍光寿命が長くなるが、特にクロロフィル a での励起エネルギー移動や光化学反応への影響が大きいため 720 nm の蛍光強度が増し、蛍光寿命が長くなったと考えられる。

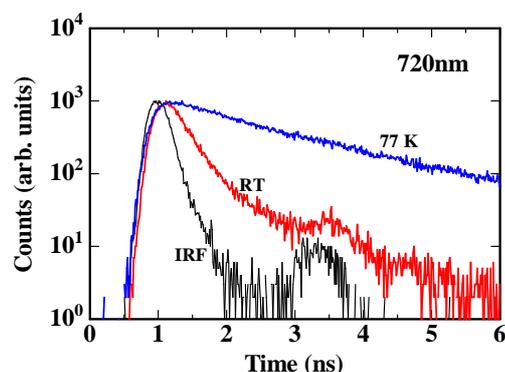


図8 蛍光波長 720 nm の蛍光減衰曲線

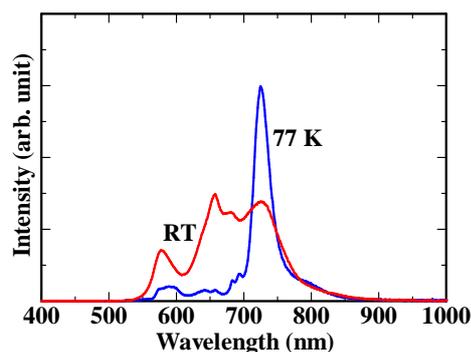


図9 室温および 77 K で計測した蛍光スペクトル

また、蛍光スペクトルの温度特性を測定した。結果を図10に示す。比較のために乾海苔についても測定した。乾海苔では室温の状態から液体窒素に浸した際に一度強度比が低下したのち、徐々に上昇しているのに対し、生海苔では一度低下したのち上昇し、その後乾海苔の強度比とは反対に温度の低下と共に急激に強度比も低下していることがわかる。

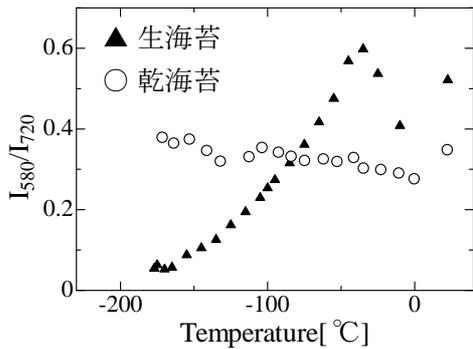


図 10 生海苔および乾海苔の蛍光ピークの強度比

(4) 励起蛍光マトリックス (EEM) の測定

スサビノリの劣化初期段階の診断に有効な測定方法の確立を目的として、励起蛍光マトリックス (EEM: Excitation Emission Matrix) 測定を行った。EEM とは、X 軸：蛍光波長、Y 軸：励起波長、Z 軸：蛍光強度で表される 3 次元表示のスペクトルのことで、蛍光指紋ともよばれる。励起光の波長を変化させると、光吸収する光合成色素が変化し、結果としてエネルギー移動の過程が変化することになる。そのため、EEM には多くの情報が含まれ、海苔の劣化初期段階の診断に有効であると考えられる。

スサビノリに分光感度測定装置 (BQE-100、分光計器) を用いて励起光を照射し、得られた蛍光を光ファイバーを通してマルチチャンネル分光器 (PMA-12、浜松ホトニクス) に取り込んだ。励起波長は 350 nm から 500 nm まで 5 nm 刻みで変化させ、露光時間を 1000 ms とした。

図 11 に正常なスサビノリ、図 12 にあかぐされ病のスサビノリを EEM 測定した結果である。正常なスサビノリでは、励起波長 450 nm 以上で蛍光波長 660 nm、685 nm 付近に強いピークが見られるが、あかぐされ病のものでは、蛍光波長 580 nm 付近に強いピークが見られた。これは、ストレス下にあるスサビノリでは、波長 580 nm の発光起源であるフィコエリスリンからのエネルギー移動が阻害されたためと考えられる。

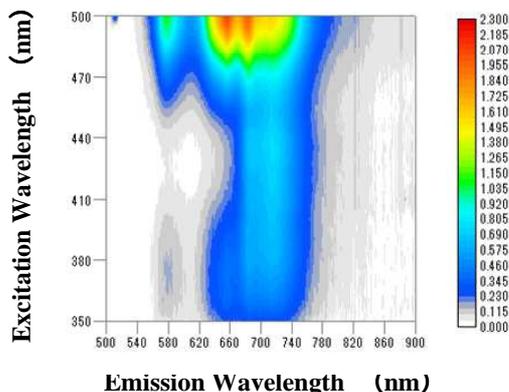


図 11 正常なスサビノリの EEM

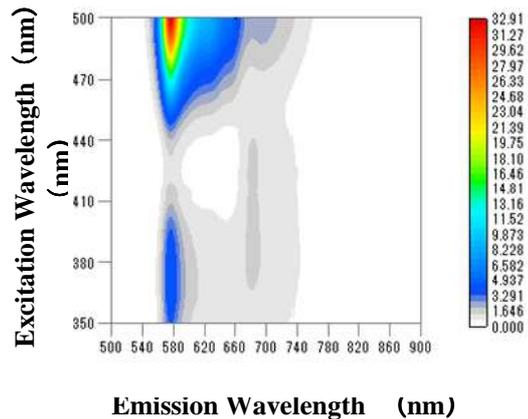


図 12 あかぐされ病に感染したスサビノリの EEM

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 0 件)

[学会発表] (計 9 件)

- 1) 岡本保, 高橋邦夫, 「蛍光計測による海苔の生育診断技術の開発」, 応用物理学会フォトニクス分科会 第 1 回フォトニクス研究会「光の境界を開拓する!!」, 2016 年 12 月 2 日~3 日, P-1, 沖縄県青年会館 (沖縄県那覇市).
- 2) 平戸滉己, 菊池真梨恵, 増田和也, 椎名和由, 岡本保, 高橋邦夫, 「スサビノリの低温蛍光スペクトル測定」, 2016 年 (第 12 回) 電気学会東京支部千葉支所研究発表会, 2016 年 10 月 8 日~9 日, 2-4, 日本大学理工学部八海山セミナーハウス (新潟県南魚沼市).
- 3) 渡辺大智, 多喜萌, 猪狩朋也, 村田歩紀, 岡本保, 高橋邦夫, 「励起蛍光マトリックス (EEM) 計測によるスサビノリの生育診断」, 2016 年 (第 12 回) 電気学会東京支部千葉支所研究発表会, 2016 年 10 月 8 日~9 日, 2-5, 日本大学理工学部八海山セミナーハウス (新潟県南魚沼市). (優秀論文発表賞受賞)
- 4) 増田和也, 菊池真梨恵, 多喜萌, 岡本保, 高橋邦夫, 「スサビノリの低温における蛍光寿命測定」, 2015 年 (第 11 回) 電気学会東京支部千葉支所研究発表会, 2015 年 10 月 31 日~11 月 1 日, 2-6, 山中共同研修所 (山梨県南都留郡).
- 5) 菊池真梨恵, 多喜萌, 増田和也, 岡本保, 高橋邦夫, 「スサビノリの蛍光スペクトルの温度特性」, 2015 年 (第 11 回) 電気学会東京支部千葉支所研究発表会, 2015 年 10 月 31 日~11 月 1 日, 2-7, 山中共同研修所 (山梨県南都留郡).
- 6) 多喜萌, 菊池真梨恵, 増田和也, 岡本保,

高橋邦夫, 「スサビノリの励起蛍光マトリックス (EEM) 計測」, 2015 年 (第 11 回) 電気学会東京支部千葉支所研究発表会, 2015 年 10 月 31 日～11 月 1 日, 2-8, 山中共同研修所 (山梨県南都留郡).

- 7) 菊池真梨恵, 増田和也, 多喜萌, 加藤芳弘, 角田賢人, 岡本保, 高橋邦夫, 「スサビノリの低温における蛍光スペクトルおよび蛍光寿命測定」, 平成 27 年度 (第 48 回) 照明学会全国大会, 0903, 2015 年 8 月 27 日～29 日, 福井大学 文京キャンパス (福井県福井市).
- 8) 角田賢人, 加藤芳弘, 岡本保, 高橋邦夫 「スサビノリの低温での蛍光スペクトルおよび蛍光寿命測定」, 2014 年 (第 10 回) 電気学会東京支部千葉支所研究発表会, 2014 年 11 月 8 日～9 日, 2-5, 日本大学理工学部八海山セミナーハウス (新潟県南魚沼市).
- 9) 加藤芳弘, 角田賢人, 岡本保, 高橋邦夫, 林俊裕, 島田裕至, 小杉知佳, 「スサビノリの葉体各部位での蛍光スペクトルおよび蛍光寿命測定」, 平成 26 年度 (第 47 回) 照明学会全国大会, 13-6, 2014 年 9 月 4 日～6 日, 埼玉大学 (埼玉県さいたま市).

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岡本 保 (OKAMOTO Tamotsu)

木更津工業高等専門学校

・電気電子工学科・教授

研究者番号 : 80233378

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者 なし