

令和 2 年 7 月 1 日現在

機関番号：14701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K06460

研究課題名(和文)画像解析と数理モデルによる糖分析の高度化

研究課題名(英文)Accurate Analysis of Carbohydrates via Thin-Layer Chromatography Based on Image Analysis and Color-Magnitude Model

研究代表者

井嶋 博(Ijima, Hiroshi)

和歌山大学・教育学部・教授

研究者番号：90397604

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：糖は様々な場所に存在し、我々と非常に多くの関わりを持つ最も重要な栄養源の一つである。本研究では、糖の分析にも用いられる化学分析手法の一つである薄層クロマトグラフィーに画像解析を用いた、新しい溶液濃度の定量化手法を開発し、定量化の高度化を図った。提案手法では画像として取り込んだ分析用のガラス板の色濃度分布をモデル化することによりデータの欠損を補完できるようにし、精度の高い分析方法を確立した。また複数の糖に対して数値実験を行い開発手法の有効性を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高度な化学分析の手法が開発されている現在であっても、リトマス試験紙のような分析者の目視に委ねられている分析方法が多く用いられている。本研究ではそのような分析手法の一つである薄層クロマトグラフィーに着目し、これまで目視で行っていた分析を自動化する手法を開発した。有効性の検証として、高度な分析手法と知られている高速液体クロマトグラフィーの分析結果と比較したところ、ほぼ同精度の結果を得ることができ、溶液濃度によっては、提案手法が優れていることが確認できた。この結果から本研究による開発手法は他の分析への応用が期待でき、化学分析を用いる様々な分野での利用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Carbohydrates play important roles in numerous physiological processes. In this research, a quantification method of the carbohydrate was proposed for samples of spot tests using the thin-layer chromatography (TLC) based on the scanned image analysis. The color density of image data was modeled by 2-dimensional Gaussian function and parameters in the Gaussian function were estimated by calculating marginal distribution and using least squares (LS) method. Sample image of the spots on the TLC plate were quantified as calculating the volume of Gaussian function. A numerical example was carried out for quantifying several kinds of the carbohydrates.

研究分野：計測工学

キーワード：化学分析 計測工学 画像解析 クロマトグラフィー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

核酸, タンパク質に次ぐ第三の生命鎖として注目される糖鎖は, 医薬品, 食品, 化粧品などの分野を中心に国内外で研究が進められている. この分野での具体的な研究としては, i) 自然界に存在する植物等に含まれる糖鎖の抽出と同定, ii) 糖鎖の機能解明, そしてiii) 糖鎖の合成, が挙げられるが, いずれの研究においても対象となる糖鎖にどのような糖がそれぞれどれだけ合成されているかといった糖の構造分析と計量が重要となる. このような糖鎖を分析するには一般的に各糖成分を分離させるクロマトグラフィーという技法がよく用いられる. しかし, 糖鎖は複雑な構造を持つ糖成分が複数合成されていることからその分析は容易ではなく, 多くの研究者はすでに開発されている様々な高度な分析機器を利用しつつも, 古典的な手法である試験板または試験紙による分析手法を併用している. これらの古典的手法は, 分析したい溶液と試験板または試験紙に含まれる溶媒と反応させ, そのときの発色から実験者が目視で分析する手法であり, その一つとして薄層クロマトグラフィー (Thin-Layer Chromatography, 以下TLCと記述する) がある. この手法はLC板上に展開したマークの位置や色により物質の化学的構造が確認でき, 各マークの大きさや色の濃さ等により各成分の定量を行うことができる. またこの手法は, 簡便な作業で行え, かつ比較的安価な手法であることから, 無機, 有機に関わらず様々な分野で利用されている. しかし, 分析結果はTLC板に現れたマークを実験者が目視によって得るため正確な定量化は困難である. 1970年代には, このような問題を解決するため検液スポットを表出させたTLC板に光を走査させ, その吸光度の違いから自動的に検液スポットの位置や濃度を出力させるといった手法が提案され, その手法を用いた装置も開発された (引用文献1, 2). 近年では, 画像処理や計算機技術の発展に伴い, スキャナやカメラを従来の試験板や試験液による分析に応用する研究が少ないながらも行われるようになった (引用文献3, 4). これらの研究では画像化させた色濃度分布をそのまま数値化し出力させるといったものである. しかし, TLCによる糖の分析においては前述したように複数の糖成分を同じTLC板に表出させ, また複数の検液を同じTLC板に滴下し同じ分析条件で比較させることが多く, このようなTLC板を画像化させた場合, 隣どうしの検液のスポットが重なり合い表出するため, 色濃度分布をそのまま分析結果として用いることはできず, この問題を解決する手法は研究開始当時開発されていなかった.

### 2. 研究の目的

本研究では上記の研究開始当初の背景に示したような画像解析を用いたTLCによる糖溶液濃度の分析において, スポットの重なり合いが発生しても精度よく定量化する新たな手法を開発し, 分析手法の高度化を図ることを目的とした. 具体的には, 表出した検液スポットの色濃度分布をモデル化し, そのモデルから導出される結果をもとに溶液濃度を定量化するという手法であり, そのために解決すべき問題としてTLC板上に現れたマークの数理モデルの開発や糖の合成反応過程の分析への応用についても研究目的に含めた.

### 3. 研究の方法

TLCによる糖分析手法の開発方法としては, 溶液の展開過程の物理的なメカニズムから, TLC板に表出するスポットの数理モデルを導き, そのモデルに実際に表出したスポットの色濃度分布をフィッティングさせることで定量化を行うこととした. これにより隣接する別のスポットとの重複の影響を受けることなく定量化が可能となる.

また, 得られた結果を高度な分析装置として知られる高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

の分析結果と比較して、本研究で開発する分析手法の有効性の確認を行こととした。

#### 4. 研究成果

あらかじめ分析によって得られた TLC 板に表出した溶液のスポットをスキャナでコンピュータに取り込み 3 次元グラフによって色濃度分布を表示させると、図 1 のように 2 次元のガウス分布関数に近い形状を示すことが確認された。そこで、実際 TLC による展開において色濃度分布がガウス分布関数に近い形状かどうかを、シミュレーションと実験で確認することとした。

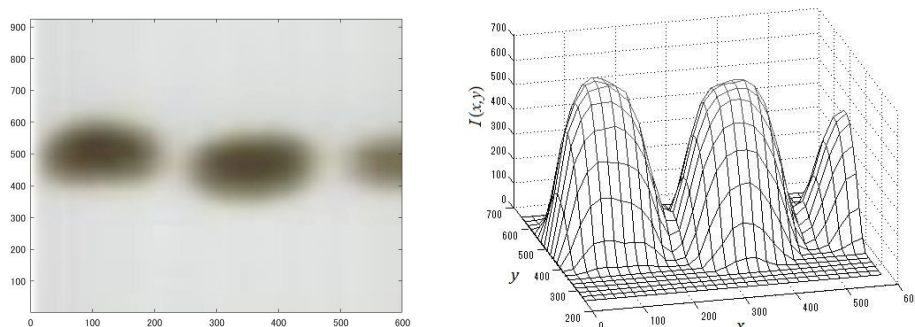


図 1 スキャナで取り込んだ TLC 板上に展開・表出した溶液のスポット（左図）と色濃度分布（右図）

シミュレーションのもとになる溶液の展開モデルは次のように導出した。図 2 に示したように、TLC 板上に滴下した溶液は、毛管現象により TLC 板を浸す展開溶液（Developing Solvent）とともに TLC 板上を移動、拡散する。このようなクロマトグラフィーの展開現象を物理現象として扱った研究としては、ガスクロマトグラフィーのような 1 軸方向に一定流速を持つカラム（充填剤）に対応するモデルとして Giddings が次の 1 次元移流拡散方程式を提案している（引用文献 5）。

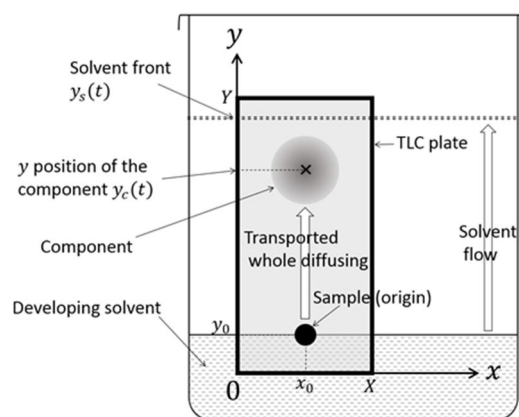


図 2 TLC による溶液の展開のイメージ

$$\frac{\partial c(t, y)}{\partial t} = -R_v \frac{\partial c(t, y)}{\partial y} + D \frac{\partial^2 c(t, y)}{\partial y^2}$$

ここで  $c(t, y)$  は 1 次元軸上の位置  $y$  における濃度の時間変化を表し、 $R_v$  および  $D$  はそれぞれ、移流係数および拡散係数である。このモデルを TLC の展開モデルとして用いることができればよいが、TLC 板上の検液のスポットは 2 次元平面上に移動、拡散する。また展開溶液は毛管力と重力が加わるため、溶液の移動速度は一定とならない。これらのことから著者らは、上記の方程式を拡張し、TLC 板上の時間変化する濃度  $c(t, x, y)$  のモデルとして、次式で表されるような時変な移流係数  $R_v(t)$  を持つ 2 次元の移流拡散方程式を用いることにした。

$$\frac{\partial c(t, x, y)}{\partial t} = -R_v(t) \frac{\partial c(t, x, y)}{\partial y} + D \left( \frac{\partial^2 c(t, x, y)}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 c(t, x, y)}{\partial y^2} \right) \quad (1)$$

この物理モデルに基づいたシミュレーション結果からスポットの濃度分布がガウス関数に近似できるかを検証することとしし実験値との比較を行った。

実験で得られた 6 つの時刻  $t = 300, 600, 1200, 2400, 3600, 4200$  秒の結果とシミュレーション結果を比較したものを図 3 に示す。シミュレーション結果（下図）が、実験結果（上図）をよく再現していることが確認できる。

次にシミュレーション結果より各時刻における溶液濃度の分布がガウス関数に近似できるかを検証した。関数のガウス性の指標としては統計学で用いられる次のモーメント比  $r$  を用いることにした。

$$r = \frac{m_4}{m_2^2}$$

ただし  $m_2$  および  $m_4$  は関数の 2 次および 4 次モーメントを表し、関数がガウス関数のときこの比  $r$  は 3 となる。本研究ではシミュレーションで得られた結果に対し、 $x$  軸および  $y$  軸それぞれの周辺分布からモーメント比  $r_x$  および  $r_y$  を求めモデル関数の妥当性の評価を行った。実験値と比較した結果を図 4 に示す。シミュレーション結果において  $x, y$  どちらの周辺分布も時間とともにモーメント比の値が 3 に漸近していることが確認できる。このことから、TLC により表出した溶液スポットの色濃度分布は 2 次元ガウス分としてモデル化ができることが確認された。

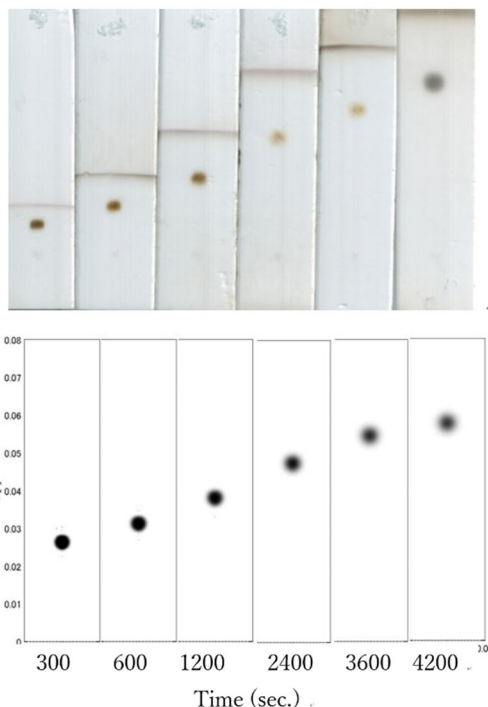


図 3 展開時間の違いによる溶液スポット

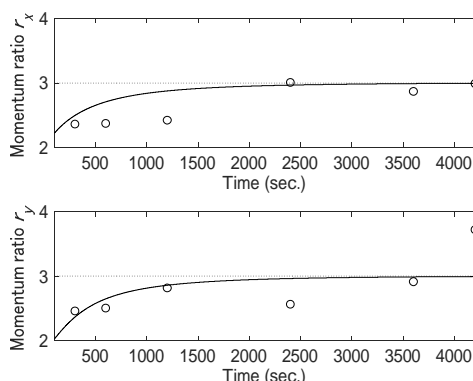


図 4 色濃度分布の  $x$  軸および  $y$  軸方向のモーメント比

開発した糖濃度の定量化手法は次の通りである。

図 5 に示すように画像の各スポット領域を分離すると画像データの欠損が生じる。そこで本研究では色濃度分布そのものから定量化を行うのではなく、スポットに対応する分布を 2 次元

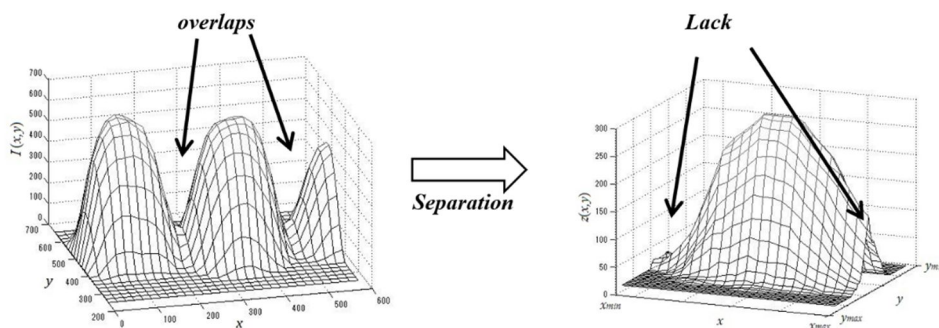


図 5 色濃度分布の各溶液スポットへの分離とデータの欠損

## ガウス関数

$$g(x, y) = Ae^{-(\alpha(x-\mu_x)^2 + \beta(y-\mu_y)^2)}, \quad (2)$$

でモデル化し、そのモデル関数と  $xy$  平面一般で囲まれた領域の体積

$$V = \iint_{-\infty}^{\infty} g(x, y) dx dy. \quad (3)$$

を定量化値として用いる。例として、単糖であるグルコースおよびラクトースの定量化の結果を示す。分析のために用いた溶液としては、グルコースまたはラクトース、それぞれを蒸留水で希釈し、1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128 wt. %の異なる濃度の溶液に対する定量化の結果を図6左図に示す。実際には、この結果をもとにした校正曲線を導出し、未知の濃度を持つ溶液に対して、その曲線より定量化を行うことになる。相関係数はグルコース、ラクトースそれぞれ 0.956, 0.928 と得られたことから、濃度と定量化値の関係を線形とみなすこともできるが、この図から濃度に対して定量化値は比例していないことが確認できる。そこで、結果を平方根関数  $y = \alpha + \beta\sqrt{x}$  に近似することとした。図6右図は溶液濃度の平方根に対する定量化値を示している。実線はグルコースおよびラクトースそれぞれの糖に対する近似直線であり相関係数はそれぞれ 0.997, 0.984 と得られた。

以上のことから、定量化において濃度の平方根と定量化値の近似直線を校正曲線として用いることにより、簡便な定量化が行えることが確認できる。

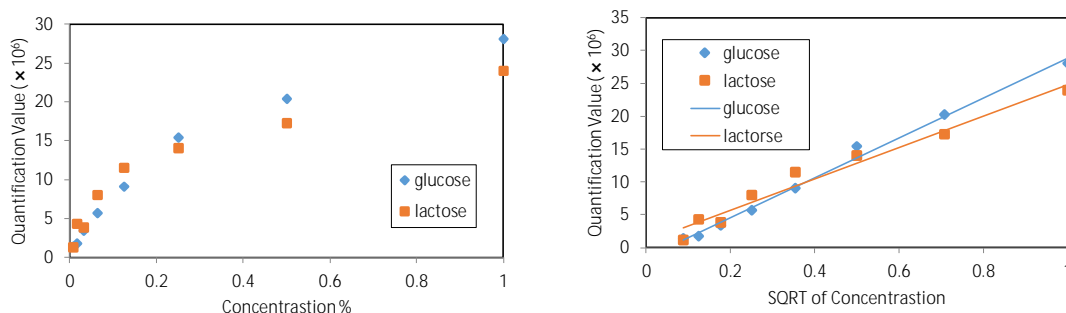


図6 定量化の結果（左図）と平方根関数を校正曲線として用いて線形化した結果（右図）

## 引用文献

- [1] 山本裕志, 栗田昂, 鈴木十五郎, 平陸男, 真壁英樹: 二波長・ジグザグスキャンニング方式による薄層クロマトスポットの直接定量, 分析化学, Vol. 23, No. 2, pp.133-142, (1974).
- [2] 山本裕志, 栗田昂, 鈴木十五郎, 平陸男, 中野清和, 真壁英樹: 二波長・ジグザグスキャンニング方式の薄層デンストメトリーにおける検量線の直線化, 分析化学, Vol. 23, No. 9, pp.1016-1027 (1974).
- [3] S. Paciornik, A. V. Yallouz, R. C. Campos and D. Gannerman: Scanner Image Analysis in the Quantification of Mercury using Spot-Tests, *J. of Brazilian Chemistry Society*, Vol. 17, No. 1, pp.156-161 (2006).
- [4] J. Anwar, Waheed - uz - Zaman, M. U. Shafique and M. Salman: Computational Quantification of Spot Tests by Image Scanning - A New Analytical Technique for Micro Samples, *Analytical Letters*, Vol. 43, Issue 2, pp.367-371 (2010).
- [5] Giddings J.C: *Dynamics of Chromatography – Principles and Theory*, Marcel Dekker, New York (1965).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ijima, H., Yamaguchi, M., Nakasuji, H., and Yamano, A.	4. 巻 1
2. 論文標題 Verification of 2D Gaussian Model of Concentration on TLC Plate for Image-Based Quantification of Carbohydrates	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Proc. of 2nd International Conference on Applied Physics, System Science and Computers	6. 最初と最後の頁 331-336
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 井嶋博、山口真範、山野彰夫、中筋隼都	4. 巻 1
2. 論文標題 スキャニング画像の色濃度モデルに基づいた薄層クロマトグラフィーによる糖分析の高精度化	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 第62回自動制御連合講演会論文集	6. 最初と最後の頁 5ページ
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 井嶋博、山口真範、山野彰夫、中筋隼都
2. 発表標題 スキャニング画像の色濃度モデルに基づいた薄層クロマトグラフィーによる糖分析の高精度化
3. 学会等名 第62回自動制御連合講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 M. Yamaguchi and H. Ijima
2. 発表標題 Quantification of Carbohydrate Based on Scan Image Analysis for TLC Technique Compensating Lack of Spot Overlaps: Some New Results
3. 学会等名 International Congress on Industrial and Applied Mathematics (ICIAM2019)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 H. Ijima and M. Yamaguchi
2. 発表標題 Modeling and Simulation Studies on Development of Solutions on TLC for Verifying the Evolution of Components Based on the Scanned-Image Analysis
3. 学会等名 International Congress on Industrial and Applied Mathematics (ICIAM2019)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中筋 隼都 , 井嶋 博 , 山口 真範 , 山野 彰夫
2. 発表標題 薄層クロマトグラフィーの画像データ解析におけるガウスモデル近似の妥当性
3. 学会等名 日本生化学会第91回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroshi Ijima, Masanori Yamaguchi, Hayato Nakasuji and Akio Yamano
2. 発表標題 Motion Modeling of Solutions on the TLC Plate for Analyzing Carbohydrates by Using Image Capturing and Analysis
3. 学会等名 SIAM Conference on Image Science (IS18)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ijima, H., Yamaguchi, M., Nakasuji, H., and Yamano, A.
2. 発表標題 Verification of 2D Gaussian Model of Concentration on TLC Plate for Image-Based Quantification of Carbohydrates
3. 学会等名 2nd International Conference on Applied Physics, System Science and Computers (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中筋隼都、井嶋博、山口真範
2. 発表標題 オーバーラップを考慮した画像解析に基づく TLC による糖溶液濃度の定量化
3. 学会等名 第36回日本糖質学会年会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	山口 真範 (Yamaguchi Masanori)  (20400129)	和歌山大学・教育学部・准教授  (14701)	