

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：52501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580318

研究課題名（和文） 紫外 LED 励起による多点植物蛍光スペクトル計測に基づく植物生育診断

研究課題名（英文） Plant monitoring based on measurement of multipoint fluorescence spectra in leaves induced by ultra-violet LEDs.

研究代表者

福地 健一（FUKUCHI KEN'ICHI）

木更津工業高等専門学校・基礎学系・教授

研究者番号：00218942

研究成果の概要（和文）：植物表皮の透過率を考慮し、主発光が 375nm 及び 400nm である LED と可視発光を吸収する光学フィルターを組み合わせることで植物葉励起用の紫外 LED 光源を作製した。30Wm<sup>-2</sup> 以上の放射照度で励起することで同じ波長のレーザー励起と同等の蛍光スペクトル測定が可能であった。また、マクロレンズとイメージング分光器等を組み合わせることで多点蛍光スペクトル計測装置を開発し、LED 光源により葉全体の蛍光スペクトルを測定した結果、ストレス影響を精度よく評価することができた。

研究成果の概要（英文）：A light source for plant leaf excitation was made by LEDs of 375nm and 400nm with optical filters which absorb visible light, in consideration of the transmittance of the plant epidermis. The fluorescence spectra were able to be measured by the LEDs excitation of more than 30Wm<sup>-2</sup> as well as the laser excitation. The multipoint fluorescence spectra measurement system was developed combined with a macro lens, the imaging spectrometer and so on. The stress influence of leaves was precisely evaluated with this measurement system.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	500,000	150,000	650,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
総計	1,500,000	450,000	1,950,000

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：生体計測，植物診断，蛍光計測，ストレス影響評価

## 1. 研究開始当初の背景

オゾン層破壊に起因する有害紫外線の増加、酸性雨、大気汚染等の広範囲に及ぶ環境変動に起因する森林衰退や農作物減収が深刻な社会問題となっており、植物に対する環境ストレス影響を的確にモニタリングする手法を確立することが急務となっている。

我々は、紫外レーザーを励起光源とした LIF (Laser Induced Fluorescence: レーザ

ー誘起蛍光) 法によって、葉内色素から発せられる蛍光スペクトルの解析を行なうことで、作物葉の紫外線ストレスおよびオゾンストレスに対する影響評価が可能であることを明らかにした。しかし、蛍光励起用の紫外レーザーには消費電力、重量、価格、寿命等の問題があり、本手法を用いる研究グループは国内外を問わず僅かである。

## 2. 研究の目的

(1)本研究では、従来の紫外レーザーの代替として小型、高効率、長寿命の光源として近年注目されている紫外LEDを用いてレーザー励起同等の蛍光計測が可能な励起光源を作製することを第一の目的とする。

(2)さらに、LED光源はレーザーと異なり、均一な面照射が可能であることから、葉全体の蛍光スペクトルを同時に計測できる装置（多点計測システム）の開発を行い、植物生育診断の精度を向上させることを第二の目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1)励起波長の選択

植物葉内の蛍光分布及び表皮の分光透過率の測定を行い、表皮中の色素及び葉肉細胞中のクロロフィルを同時に効率よく励起することが可能な波長を調査する。

### (2)紫外LED光源の作製

市販されている紫外LEDの基本特性（照度分布、発光波長スペクトル、温度特性）の計測から最適な素子を選別し、均一且つ十分な放射強度が得られる面光源の作製を行い、葉の蛍光スペクトルを実測してレーザー励起との比較を行う。

### (3)多点計測システムの開発

作製した紫外LED光源で葉全体を励起し、イメージ分光器を用いて任意のライン上のスペクトルを画像データとして同時計測できる装置及びデータ解析ツールを開発し、ストレスを付加した葉の蛍光スペクトルについて、どの部位にどのような特徴的变化が生ずるかを調査する。

## 4. 研究成果

### (1)励起波長の選択

#### ①ラッカセイ葉の蛍光葉内分布

波長325nmと375nmの紫外レーザーを励起光源としてラッカセイ葉の蛍光スペクトルを測定したところ、正常葉では325nm励起でクロロフィル蛍光(685nm)がほとんど観察されなかったが、UV-Bストレスを負荷すると、クロロフィル蛍光が増加することが明らかとなった。この原因を調査するために蛍光葉内分布を計測した結果、正常葉では、各波長の蛍光が上面表皮付近で強く観察され、柵状組織では僅かにクロロフィル蛍光のみみられるだけであったが、UV-B処理葉では、上面表皮において450nmの青色蛍光が減少し、クロロフィル蛍光は柵上組織内でも非常に強く観察されることが分かった。

#### ②クロマツ針葉の蛍光葉内分布

375nmの紫外レーザーでクロマツ針葉の蛍光葉内分布を測定した結果、葉の下部と中部では蛍光葉内分布が大きく異なることが明

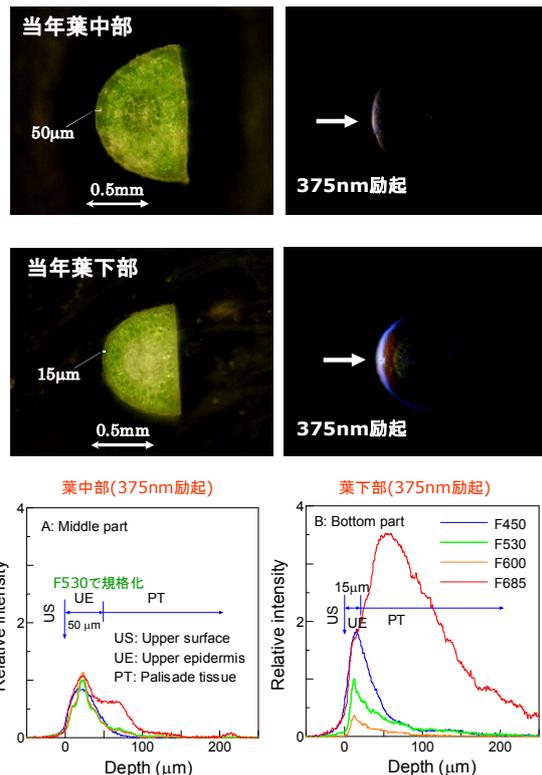


図1 クロマツ針葉の蛍光葉内分布

らかとなった。葉の中部では、表皮細胞内で600nmと530nmの蛍光が同程度の強度で観察され、柵状組織内ではクロロフィル蛍光が僅かしか見られなかったが、葉の下部では表皮細胞内の600nmの蛍光が極めて小さくなり、柵状組織内ではクロロフィル蛍光が大きく観察された(図1)。これらのことから、表皮の状態が植物葉の蛍光スペクトル分布に大きく影響し、発達した表皮では表皮細胞内に多く含まれる紫外線吸収色素によって励起光が吸収されてしまいクロロフィルを多く含む柵状組織まで到達しにくいと推測される。従って、従来のレーザーに対して照射強度が100分の1以下であるLEDを用いて植物葉蛍光を計測する場合、より柵状組織に到達しやすい波長を選択することが必要であることが分かった。

#### ③クロマツ表皮の分光透過率

最適な励起波長を調査するため、クロマツ葉の表皮を薄く剥ぎ取り分光透過率を測定した(図2)。表皮が未発達の葉下部においては、375nmの励起光も十分透過するが、表皮が発達している葉中部付近においては、約400nmより短波長の紫外領域で透過率が急激に減少することが明らかとなった。一方、励起波長が長すぎると波長530nmの蛍光(F530)が測定できず、クロロフィル蛍光(F685)との強度比F685/F530を指標とした活性評価が行えなくなる。さらに、400nmより長波長の光

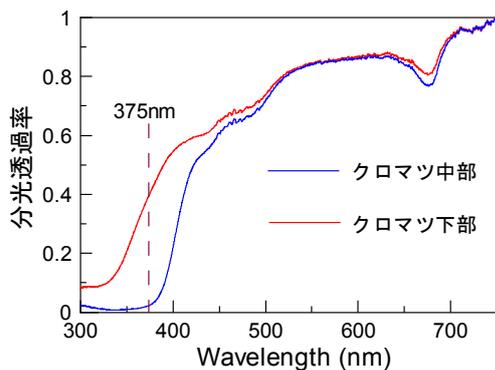


図2 クロマツ針葉の分光透過率

では、クロロフィル以外の葉内色素を十分に励起できないために 420nm 付近の青色蛍光（フェルラ酸、NADPH 等の蛍光）が観察しにくいことも分かった。以上のことから、励起光源に適する波長として 375nm から 400nm 付近での励起が最適であると結論付けられる。

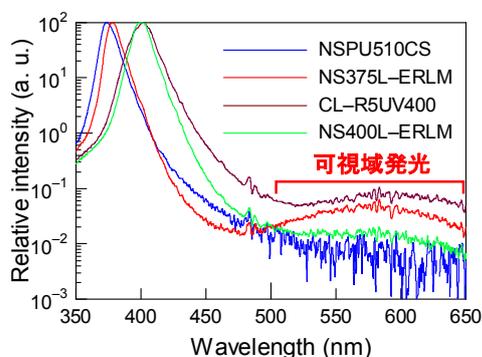


図3 各LEDの発光分布

## (2) 紫外LED光源の作製

### ① 素子の諸特性計測

前述の結果より中心波長が 375nm である NSPU510CS（日亜化学）及び NS375L-ERLM（Nitride Semiconductors）と中心波長が 400nm である CL-R5UV400（Shenzhen Caijing Electronics）及び NS400L-ERLM（Nitride Semiconductors）を供試素子に選び諸特性を計測した。

図3に各素子の発光スペクトルを対数表示で示す。主発光以外に僅かな可視域発光があり、これらは微弱な植物葉蛍光の測定の大きな妨げとなる。そこで、紫外透過フィルター（UV-D35，東芝）及びブルーフィルター（BLF-370B，シグマ光機）を併用した。

図4に各素子単体での放射照度を示す。 $I_f=20\text{mA}$  で点灯直後の距離 5cm における放射照度は、大きい順に CL-R5UV400： $12.7\text{Wm}^{-2}$ ，NS400L-ERLM： $9.70\text{Wm}^{-2}$ ，NS375L-ERLM： $6.44\text{Wm}^{-2}$ ，NSPU510CS： $3.47\text{Wm}^{-2}$ であった。各素子とも距離の自乗則に従って放射照度は減少した。

図5は各素子の素子温度と放射照度（出力）を示したものである。図6には点灯時間

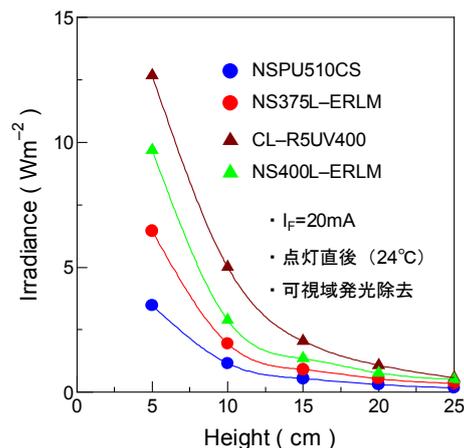


図4 各LEDの放射照度

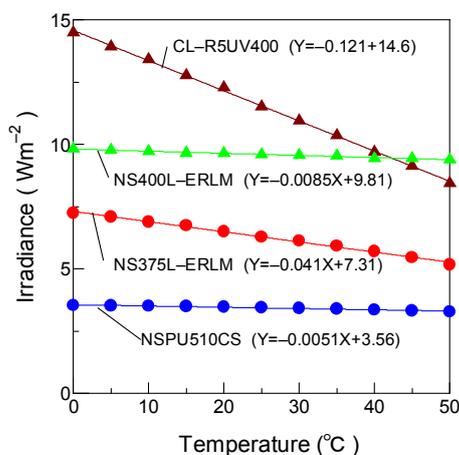


図5 各素子の素子温度と放射照度

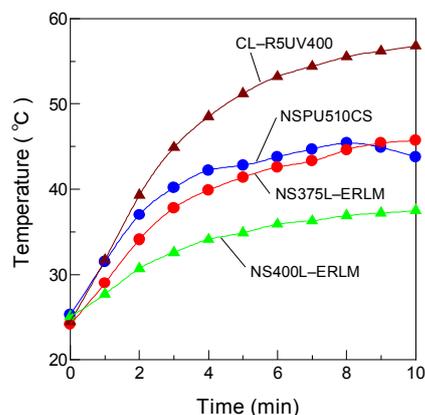


図6 点灯時間と素子温度

と素子温度の関係を示す。これらの結果を総合すると、特に冷却しなくて安定して一定の放射照度を保つことから 375nm 励起の場合は NSPU510CS，400nm 励起の場合は NS400L-ERLM を素子して用い、励起光源の作製を行った。

### ② 作製したLED光源の特性

同一基板上に NSPU510CS（中心波長 375nm）

16個とNS400L-ERLM（中心波長400nm）25個を10mm間隔で取り付け、375nmのみ点灯（以下LED375と言う）／400nmのみ点灯（以下LED400と言う）／両方点灯の状態をスイッチで即座に切り替えることが可能なパネルを作製した（図7）。

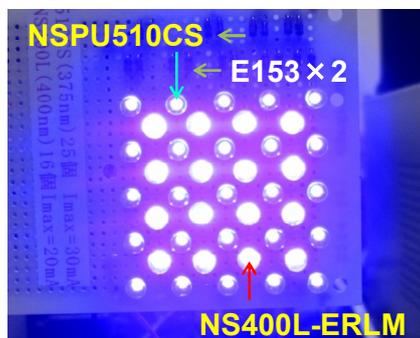


図7 作成した紫外LED光源

1素子あたりの駆動電流を約20mAとした場合のLED375及びLED400のそれぞれの放射照射距離依存性はほぼ等しく、距離7.5cmの場合は約 $47\text{Wm}^{-2}$ 、距離15cmの場合は約 $17\text{Wm}^{-2}$ であった（図8）。

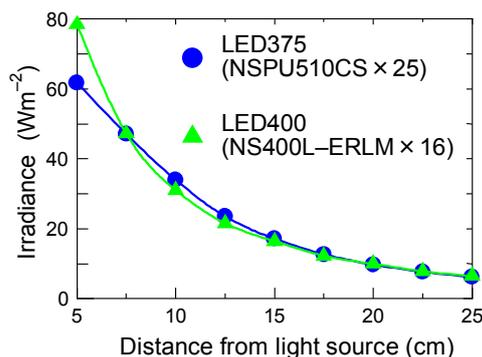


図8 LED光源の放射強度

図9にLED375の照度分布を示す。距離7.5cmに設置した場合は、直径60mmの範囲で $30\text{Wm}^{-2}$ 以上となり、ラッカセイ (*Arachis hypogaea* L.)、ポトス (*Scindapsus aureus*)、シラカシ (*Quercus mhuysinaefolia*)、クス (*Cinnamomum camphora*) 等、我々が計測対象としている植物葉全体を十分な照度で励起することが可能であることが分かった。尚、LED400も同様な照度分布となった。

図10に素子電流及び電池の出力電圧と点灯を始めてからの時間の関係を示す。比較的電流容量の大きい充電式単3型乾電池EVOLTA (HHR-3MVA, 1950mAh, Panasonic) を16個直列に接続した場合、約25時間にわたり素子電流を一定値に保ちながら点灯することができた。

### ③LED励起とレーザー励起の比較

マルチチャンネル分光測光システム

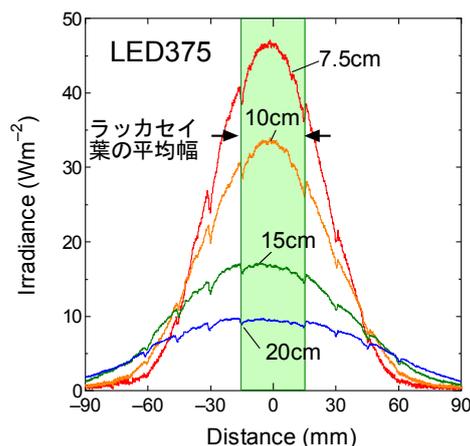


図9 LED光源の照度分布

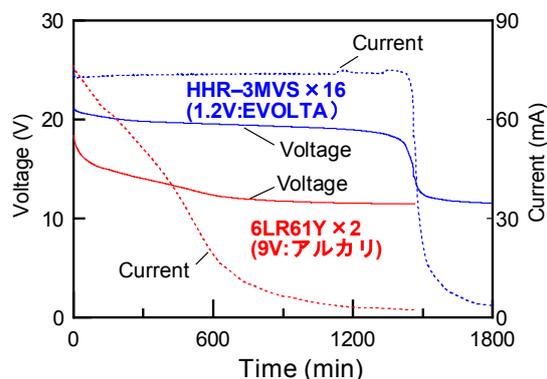


図10 LED光源を電池で駆動

(PMA-50, ハマホト) を用いて GM 値 (クロロフィル濃度の目安) が異なる斑入りのポトス葉を用い、LED 励起とレーザー励起によって得られる蛍光スペクトルの比較を行った。各励起光の強度は、375nm のレーザーダイオード (LD375) :  $64 \times 10^3\text{Wm}^{-2}$ 、405nm のレーザーダイオード (LD405) :  $57 \times 10^3\text{Wm}^{-2}$ 、LED375 :  $48\text{Wm}^{-2}$ 、LED400 :  $48\text{Wm}^{-2}$  であり、葉に対する照射面積はレーザーが約  $0.8\text{mm}^2$  (約  $\phi 1\text{mm}$  の円面積に相当)、LED が  $113\text{mm}^2$  ( $\phi 12\text{mm}$  の円面積に相当) であった。

図11にGM値がそれぞれ10.8, 20.0, 35.3であるポトス葉の蛍光スペクトルを示す。縦軸は530nmの蛍光強度 (F530) で規格化しており、相対的強度の小さい短波長側は、縦軸を20倍にしたものも表示した。青緑色蛍光は、LED375とLD375でほぼ同じスペクトルを示し、GM値による大きな相違も見られなかった。クロロフィル蛍光についてはGM=10.8では、LED400とLD405及びLED375とLD375がそれぞれほぼ同等のスペクトルを示した。F685の値は、400nm付近での励起の方が1.7倍程度大きく観察されたが、これは表皮における励起光の透過率に関係すると考えられる。GM=20では、LED375とLD375はほぼ同等のスペクトルを示したが、LED400とLD405では差がみられ、F685の大きさはLD405励起

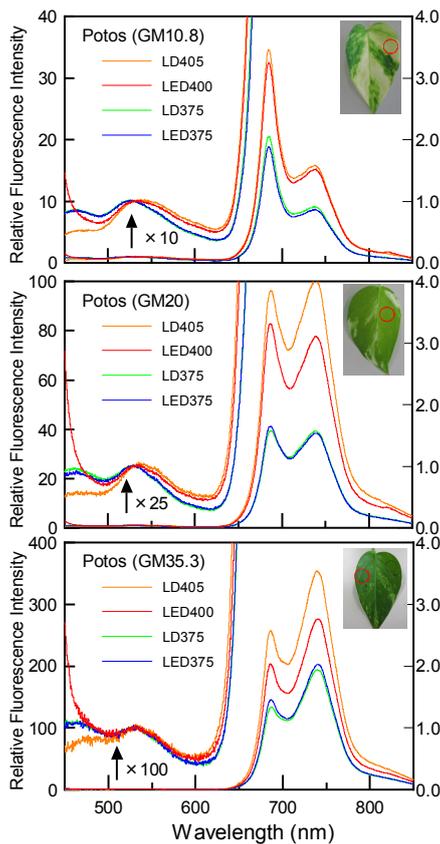


図 11 ポトス葉の蛍光スペクトル

の方が 1.15 倍大きかった。GM=35.3 では、LED375 と LD375 は、ほぼ同等のスペクトルを示したが、LED400 と LD405 では差がみられ、F685 の大きさは LD405 励起の方が 1.27 倍大きかった。GM 値が大きくなるほど、F685 の値に LED400 と LD405 の差が出ることは、表皮における透過率が 405nm の方が大きく、クロロフィル濃度が高い葉ではより多くの蛍光放射が行われるためであると考えられる。また、クロロフィル蛍光の強度比 F685/F740 は、GM 値に対して直線的に増加し、その傾きは励起光の種類によらずほぼ一定であった。これは、F685 が葉内で再吸収率がクロロフィル濃度に依存する為であると考えられる。

次に LED 励起における各波長の蛍光強度比の強度依存について測定結果を図 12 に示す。F740/F685 については、励起波長による差も強度依存も全くないことが分かった。また、葉の活性指標となる F685/F530 については、葉の深部に入りやすい 400nm 励起ではクロロフィル蛍光が強く観察されることから高い値を示したが、両励起波長ともに  $30\text{Wm}^{-2}$  以上では強度依存を示さないことが分かった。

### ③クロロフィル蛍光の誘導期現象の測定

暗処理を施した葉では、Kautsky 効果によってクロロフィルの蛍光強度に特徴的な時間変化が生じる。これは、クロロフィル蛍光の誘導期現象とも呼ばれ、葉の活性指標の一

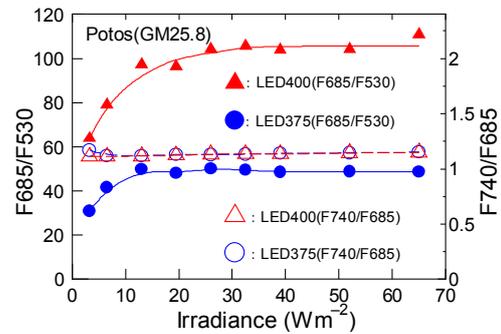


図 12 LED 励起時の強度依存

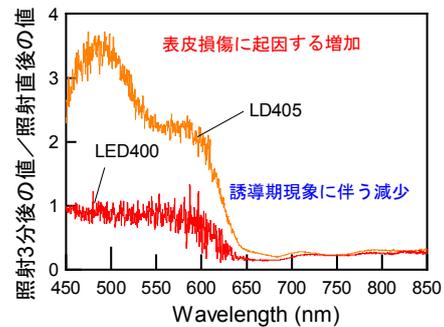


図 13 クロロフィル蛍光の誘導期現象

つとなる。LED400 ( $76\text{Wm}^{-2}$ ) を光源として、ラッカセイ (GM=43) のクロロフィル誘導期現象を測定し、LD405 ( $127 \times 10^3\text{Wm}^{-2}$ ) 励起との比較を行った。蛍光測定をした全波長領域について、波長毎に照射 3 分後と照射直後の蛍光強度比を求めたところ、LED400 励起では、450-600nm の領域で ratio=1 と変化がみられず、それ以上の波長領域ではクロロフィル誘導期現象により ratio<1 となっている。一方、LD405 励起では、450-600nm の領域で ratio>2 となり F530 に限らず、青緑色領域全てで光照射によって蛍光強度が増加することが分かった (図 13)。ラッカセイ以外の植物葉を用いて同様の測定を行ったところ、サツマイモ、ニガウリ等の表皮が未発達の葉ではラッカセイ同様に F530 が増加したが、クス、クロマツ等表皮が発達した葉では観察されなかった。以上のことから、LD405 の場合、励起光が強すぎて葉表皮が損傷し励起光が FAD 等の色素に到達しやすくなったため、それらの色素からの蛍光強度が時間と共に増加したものと考えら、誘導期現象の測定においては、レーザー励起より LED 励起の方が適している」と結論付けられる。

### (3) 多点計測システムの開発

#### ①装置

シャープカットフィルターL41 を装着したマクロレンズ (Ai Zoom Nikkor 28~85mm, F3.5~4.5S), イメージング分光器 (ImSpector V8, デルフトハイテック), モノクロチルド CCD (C5985-02, ハマホト) を組み合わせて葉面任意直線上の蛍光スペクトルを同時計測可能な多点計測システムを

作成した(図14)。スペクトルデータは、CCDカメラコントロールユニットを介してパソコンにイメージ分光画像として取り込み、自作の画像解析ソフト(F-image)によって解析した。

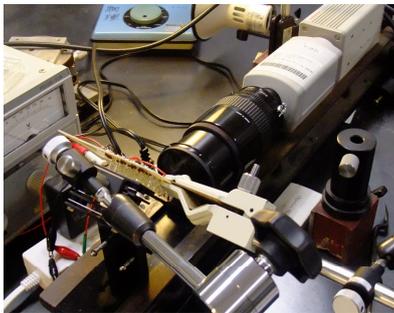


図14 多点計測システム

②UB-V 処理を施したラッカセイ葉の蛍光スペクトル測定

試料ホルダー(図15)にラッカセイ葉(GM=45)を固定し、前述のLED375(約40W/m<sup>2</sup>)を励起光源として図の白色ライン上の多点スペクトル同時測定を行った。

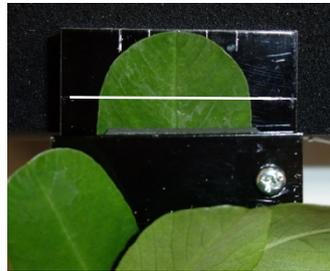


図15 試料ホルダー

葉の左半分はUV-B(30Wm<sup>-2</sup>×4h=432Jm<sup>-2</sup>)処理を施し、右側の未処理部分の蛍光スペクトルとの比較を行った。

図16はUV-B処理を施してから68時間後の蛍光イメージ分光画像である。図の下半分がUV-B処理部であるが、F685~F740にかけてのクロロフィル蛍光が未処理部位に

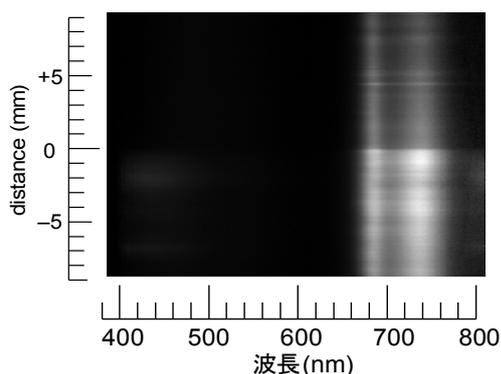


図16 イメージ分光画像

対して大きく観察されている。また、処理部においてF430が部分的に増加している。

図17はイメージ分光画像より解析した蛍光スペクトルをUV-B処理前、処理直後、処理68時間後で比較したものである。処理直後にF685が減少したが、前述の通り処理

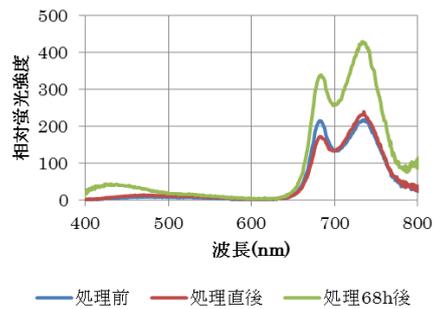


図17 UV-B処理部の蛍光スペクトル

68時間後には処理前よりF685, F740ともに2倍近く増加するといった新たな現象が観察できた。本装置を用いることで葉一枚の多点蛍光スペクトルを同時測定でき、ストレスとスペクトル変化の詳細な分析からその影響評価を精度よく調査できる可能性があることが明らかとなった。

## 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2件)

① 福地健一, 嘉数祐子, 高橋邦夫, 紫外LED励起による植物葉の蛍光スペクトル計測, 木更津工業高等専門学校紀要, 査読無, 第45巻, 2012, 33-43,

<http://ci.nii.ac.jp/naid/110008894907>

② 嘉数祐子, 福地健一, 高橋邦夫, 2種のUV励起光によるラッカセイ生葉のLIFスペクトル変化及び蛍光葉内分布, 植物環境工学, 査読有, 第22巻, 2010, 100-106,

<http://dx.doi.org/10.2525/shita.22.100>

〔学会発表〕(計2件)

① 福地健一, 紫外LED励起による植物葉の蛍光スペクトル計測, 日本生物環境工学会2011年札幌大会, 2011年9月7日, 北海道大学.

② 福地健一, クロマツ針葉の蛍光スペクトル, 日本生物環境工学会2009年福岡大会, 2009年9月7日, 九州大学.

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

福地 健一 (FUKUCHI KEN-ICHI)

木更津工業高等専門学校・基礎学系・教授  
研究者番号: 00218942

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

嘉数 祐子 (KAKAZU YUKO)

木更津工業高等専門学校・基礎学系・講師  
研究者番号: 30455117