

# 食品・農産物の有害菌・機能の計測技術のマニュアル (平成20年度)

地域イノベーション創出共同体形成事業  
研究開発環境支援事業  
「食品・農産物の有害菌・機能の計測技術の開発」

産業技術総合研究所 九州センター 犬養吉成

産業技術総合研究所 生産計測技術研究センター 松田直樹、綾戸勇輔

福岡県工業技術センター 生物食品研究所 塚谷忠之、末永 光

長崎県工業技術センター 兵頭竜二、下村義昭

宮崎県工業技術センター 小田 誠、肥後一彦

# 目次

1. 全体の背景、目的、概要及び目標 .....	1
2. スラブ光導波路分光分析法を用いる有害菌の迅速検出法のマニュアル（平成20年度） .....	2
2.1. はじめに .....	2
2.2. 測定方法 .....	2
2.3. 実施例 .....	6
2.4. おわりに .....	9
3. 水溶性テトラゾリウム塩を用いた微生物簡易検出法のマニュアル（平成20年度） .....	11
3.1. はじめに .....	11
3.2. 測定方法 .....	11
3.3. 実施例 .....	17
3.4. おわりに .....	22
4. 光を用いた非破壊計測方式による水分ストレス計および糖度計のマニュアル（平成20年度） .....	23
4.1. 植物にかかる水分ストレスの非破壊計測技法 .....	23
4.2. 新方式による果実糖度の非破壊計測装置 .....	32
4.3. まとめ .....	36
5. ミリ波による非破壊型糖度計等のマニュアル（平成20年度） .....	38
5.1. はじめに .....	38
5.2. パッシブ方式非破壊型糖度計 .....	39
5.3. アクティブ方式非破壊検査方法 .....	46
5.4. おわりに .....	50

## 1. 全体の背景、目的、概要及び目標

産業技術総合研究所 九州センター

九州地域において食品・バイオ産業は盛んであるが、醸造・発酵関連を中心としたものであり、イノベーション創出は目立っていないのが実情である。最近、事件が多発している「食品の安全・安心」の問題は、国民の重大な関心事であり、非常に重要な技術的課題ともなっている。また、農産物の高付加価値化は、農業・流通関係者や食品・バイオ産業にとって今や国内・国際競争力を高めるのに必要な課題となっている。

そこで、従来の方法では時間がかかる食品有害菌の検出に関して、光導波路分光分析法や水溶性テトラゾリウム塩を用いる新規な方法により、迅速で高感度な検出技術の開発を行う。また、煩雑な手順の破壊検査が主流であった、栽培現場や流通過程で使用される農作物の水分ストレス状態や糖度といった品質検査に関して、光やミリ波を用いる新規な方法により、簡易で迅速な測定を可能とする非破壊計測技術の開発を行う。

2年計画で技術開発するが、20年度はまず各方法の基本的なマニュアルを作成した。地域イノベーション創出共同体形成事業により形成されるネットワークを生かして、このマニュアルを利用することにより、企業・農業・流通関係者ニーズの効率的な解決を目指す第一歩としたい。

## 2. スラブ光導波路分光分析法を用いる有害菌の迅速検出法のマニュアル（平成20年度）

産業技術総合研究所 生産計測技術研究センター

### 2.1. はじめに

日本の食品業界では世界的なレベルで見ても、「安全・安心」に対する要求レベルが非常に高く、これまでの品質管理から、HACCP（Hazard Analysis Critical Control Point）などを取り入れた工程品質保証へと衛生管理の考え方に大きな変化が起きている。食品流通の広域化及びハイスピード化のトレンドは近年すさまじい勢いがあり、法規制に基づく各種検査に加え、各社独自の自主管理に基づく検査体制の整備が極めて重要になっている。なかでも、食中毒の原因になり得る有害菌類の検出、あるいは製品中への異物混入など食品衛生管理に直結する事項については、消費者の口に入る前に、適切な処理がなされなければならない。ひとたび処理を誤れば、該当の製品に留まらず、その企業の製品全体、あるいは産地全体の問題にまで発展しかねない。

本研究開発環境支援事業では、九州地域で盛んな食品製造プロセスにおける有害菌の検出技術として、産総研の持つ計測技術シーズのスラブ光導波路（slab optical waveguide：以下、SOWG と略す。）分光法を適用して、製造現場からの最もニーズの大きい大腸菌などの有害菌の迅速・高効率な検出方法の確立を目指す。

大腸菌の検出は、大腸菌に含まれる酵素である  $\beta$ -グルクロニダーゼの活性を利用する。そこで、20年度は、SOWG 分光法を用いた酵素活性測定法の開発を行った。酵素は代表的な生体物質の一つであり、酸化還元や物質変換等の独自の機能を有している。従来からこれらの機能を利用したセンサーやバイオエレクトロニクス等の研究開発は広く行われており、デバイスにも組み込まれ、利用されている。これらのデバイスにおいて、通常は酵素を界面に固定化して用いられており、酵素のような複雑な分子では構造と機能が密接に関連していると考えられている。その際、界面に吸着・固定化されると立体構造が変化して配向制御が行えない等の理由で、本来持っている機能が発現しない場合も多いため、デバイス開発の妨げになっている。本マニュアルでは、吸収スペクトルの変化から酵素機能の簡便なその場測定が可能な SOWG 分光法酵素活性測定について、基本原理、測定手順、実施例等をまとめた。

### 2.2. 測定方法

#### 2.2.1. SOWG 分光法の原理

図2-1にSOWG分光法の原理の概略を示す。通常、物質の吸収スペクトル測定では、試料を溶媒に溶かして測定セルに入れ、波長毎に光を透過させたときの入射光の減少度合いを測定する。一方、界面に存在する物質を測定する場合、一般に反射法が用いられる。金属表面を利用する場合、金属に比較して屈折率が小さい空気や溶液側から光を入射する外部反射法が用いられる。ガラスや高分子等の透明な物質では、空気や水に比べて屈折率が大きいガラス等から光を入射させる内部反射法を用いる。内部反射法では、光の全反射に伴い界面で生じるエバネッセント波と呼ばれる電場（近接場）を利用する。SOWG分光法は内部反射法であり、屈折率が比較的高いコア層と相対的に低いクラッド層を組み合わせ、光を遠方まで伝搬させる光ファイバーに類似した構造になっている。

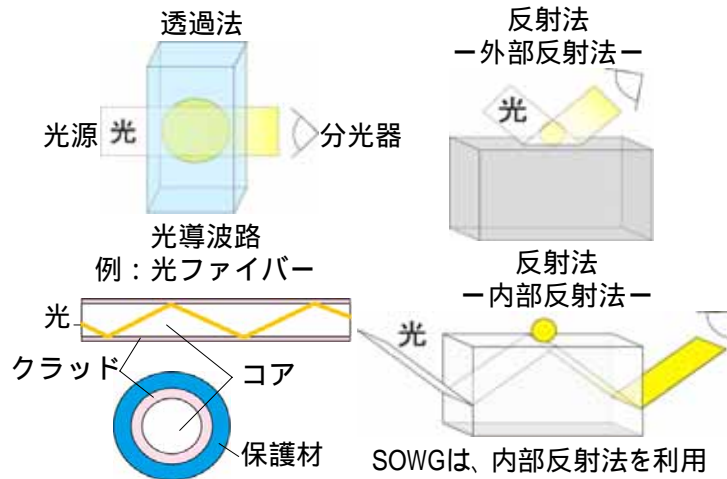


図 2 - 1 スラブ光導波路分光法の原理の模式図

より詳細な説明を行うため、内部反射法における界面と光の全反射を描いた模式図を図 2 - 2 に示す。界面を形成する二つの層の屈折率比にも依存するが、エバネッセント波は界面からの減衰距離が波長の数分の一程度と考えられており、可視光を用いている場合は 100nm 程度と考えられるため、SOWG 分光法は界面近傍に特異的で表面選択性の高い測定方法と言える。ただ表面プラズモンや局在プラズモンを用いる表面プラズモン共鳴法や表面増強ラマン散乱法では界面からの減衰距離が数～10nm 程度とエバネッセント波より小さいため、より表面選択性が高い。

また、SOWG 分光法は多重反射を用いているため、高感度である。反射回数も SOWG の厚み、屈折率比、入射角度等に依存するが、10mm 当たり数百回程度の反射を繰り返す。このため SOWG

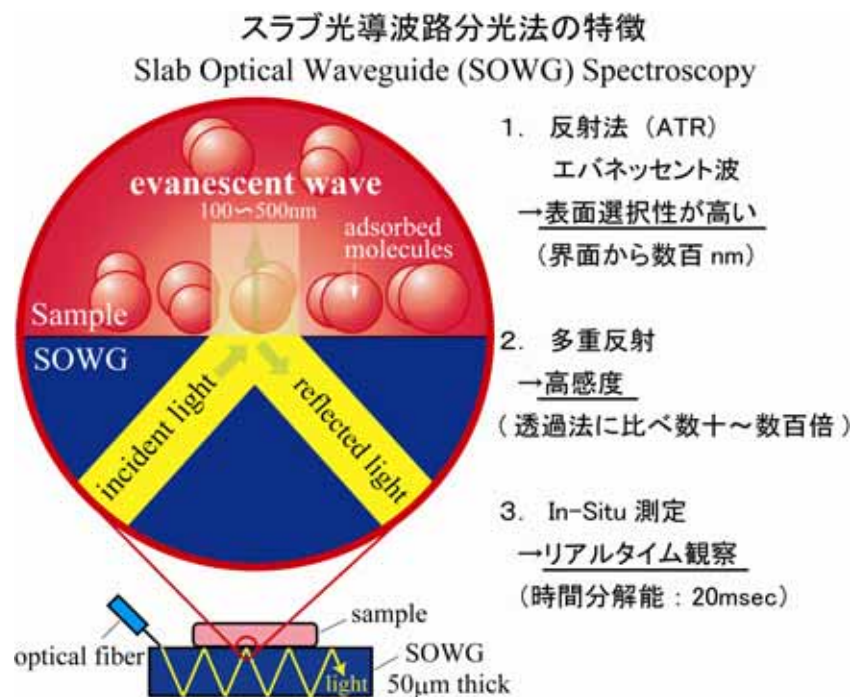


図 2 - 2 内部反射法の界面の模式図

分光法は通常の透過法による吸収スペクトル測定に比べて数百倍程度高感度である。表面プラズモン共鳴法や表面増強ラマン散乱法では 10<sup>6</sup>~8 程度増強されることもあるため、これらの測定法の方が SOWG 分光法に比べて原理的に、より高感度である。しかし SOWG 分光法ではガラスや高分子で構成されている界面で用いることが可能であるため、その用途はより広い。

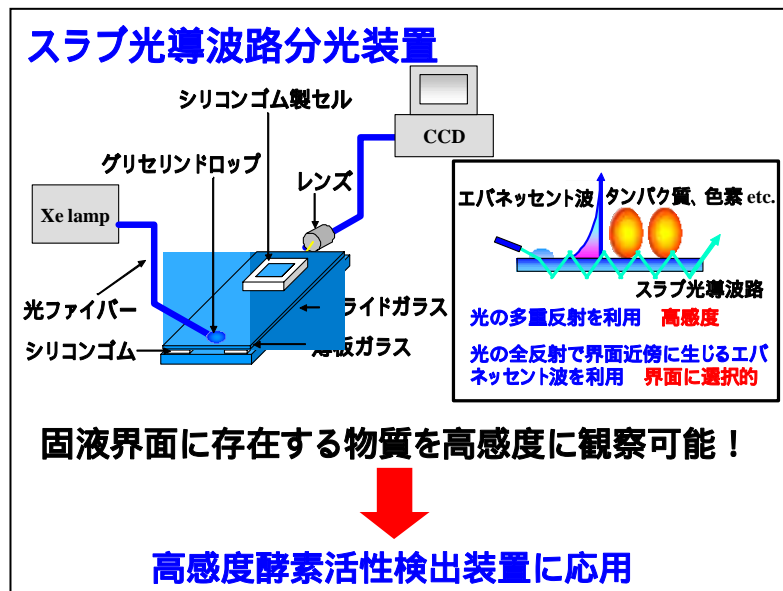
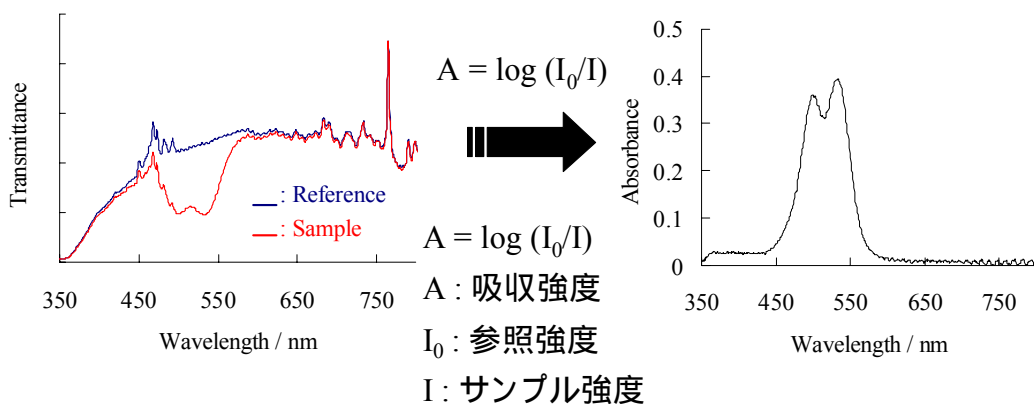


図 2 - 3 SOWG 分光装置の構成

SOWG 分光法の測定装置の構成を図 2 - 3 に示す。装置は、光源 (Xe ランプ)、光学系部品、SOWG、CCD 検出器、パーソナルコンピュータ、ソフトウェアから構成されている。本装置は、入射された光の全反射により界面に生じたエバネッセント波を利用し、界面に吸着あるいは界面近傍に存在する極微量のサンプルを非破壊、かつ高感度にその場測定可能である。



吸収スペクトルはランバート・ベール則に従って得られる。  
簡単に吸収スペクトルが得られる。

図 2 - 4 吸収スペクトルの測定方法

図 2 - 4 に実際の吸収スペクトルの測定方法を示す。SOWG 分光法では、左側の図に Reference と Sample と示した様に、二回、光透過スペクトルを測定する。それぞれ試料が SOWG 上に載っている場合と載っていない場合の測定結果である。透過光強度がそれぞれ  $I_0$  と  $I$  であり、波長毎にランバート・ベールの式に代入し、吸光強度  $A$  を得る。

#### 2.2.2. 酵素活性検出装置

分子は固有の吸収スペクトルを有しているが、例えば酵素の酸化体と還元体、あるいは単純な分子が配位した場合としない場合では、紫外可視域の吸収スペクトルが異なる。この事実を利用して、酵素が界面に固定化された際も機能を保持しているかどうかをその場測定する。このため、機能を観察する実験では、酵素を SOWG 上に固定化して行う。更に電子移動反応に関する活性を観察する際、酵素は SOWG 上に形成したインジウム - スズ酸化物（以下、ITO と略す。）電極上に固定化し、電気化学的に反応を制御しながら吸収スペクトルをその場測定する。



図 2 - 5 酵素活性検出装置の全体の写真

酵素活性検出装置のうち、光源の Xe ランプはシステムインストルメント社製を、CCD 検出器は浜松フォトニクス社製 C-10 を使用した。装置の写真は図 2 - 5 に示したが、装置の詳細は参考文献に掲載済みである。

電気化学計測はポテンショスタット (ALS/CHI Model720C) を用いて行っている。

#### 2.2.4. 試料

SOWG は、 $50 \times 20 \times 0.05$  mm のガラスあるいは石英の板を光学研磨したものをを用いる。ITO 電極は、 $50 \times 20$  mm の片面に、 $20 \times 20$  mm の大きさと  $20$  nm の厚さで、真空蒸着法を用いて形成する。SOWG 及び ITO 電極は、アセトン、エタノール、超純水の順番に数分間浸漬し、その表面を洗浄している。

酵素としてチトクローム *c* やヘモグロビン等のタンパク質を試薬会社から購入し、精製せずに使用している。溶液として、pH が7 付近のリン酸緩衝液を用いている。

## 2.2.5. 測定手順

### 1) 試料溶液の調整

対象とする酵素を中性のリン酸緩衝液で希釈し、例えば10 $\mu$ l 程度の適切な濃度に調整する。

### 2) 電子移動反応に関わる酵素機能検査を行う場合

ITO-SOWG 上にシリコンラバー製のセルを置き、参照電極と対極を配置する。ポテンシオスタットのリード線と電極を接続する。リン酸緩衝溶液を入れ、SOWG のバックグラウンド用の透過スペクトルを測定する。

リン酸緩衝溶液をセルから排出し、代わりに酵素を含む試料溶液をセル内に入れ、同時に SOWG のサンプル用の透過スペクトルを測定する。その際、ソフトウェア上に表示される SOWG 吸収スペクトルのピーク位置と強度から酵素の吸着状態と吸着量を確認しながら、固定化を進める。

固定化を確認後にセル内の試料溶液を捨て、リン酸緩衝溶液をセルに入れ、ITO 電極上に吸着した酵素だけを残す。ITO 電極の電位を変化させながら吸収スペクトルを測定し、酸化体と還元体の吸収スペクトルになるか観察する。

### 3) ガスの配位に関わる酵素機能検査を行う場合

SOWG の吸収スペクトルのその場観察結果を用いて SOWG 表面に対する酵素の固定化を確認するところまでは、上記の電子移動反応に関わる酵素機能検査の測定手順と同じである。

酵素にガスを配位させる場合、固定化した後で SOWG 表面をガスにさらして吹きかける、あるいは対象とするガスでリン酸緩衝液をバブリングし、溶存しているガスの量を飽和状態にした後でその溶液を SOWG 表面に置き、酵素とガスを折衝させる。

## 2.3. 実施例

### 2.3.1. チトクローム *c* の電子移動反応の確認

酵素としてチトクローム *c* を用い、ITO 電極上に固定化したチトクローム *c* の電子移動反応を確認した結果を以下に簡潔に記す。

#### 1) 実験条件設定

パーソナルコンピュータを立ち上げてソフトウェアを起動させ、CCD 検出器の露光時間や積算回数等の実験条件を入力する。SOWG を装置にセットし、その上にセルを乗せ、Xe ランプの電源を入れて SOWG 内に光を導入し、しばらく待ってから SOWG 透過光のドリフトの有無を確認する。ドリフトが大きい場合はドリフトが収斂するまで待つか、あるいはもう一度 SOWG やセルをセットし直し、あらためてドリフトを測定する。チトクローム *c* を単分子層程度の量で固定化した場合、408nm 付近に現れるチトクローム *c* のソーレ帯の最終的な吸光度は概ね 0.1~0.2 程度であるため、ドリフトやノイズはこの 10%を目安にすると吸光度に換算した時に 0.01~0.02 程度以下にする必要がある。



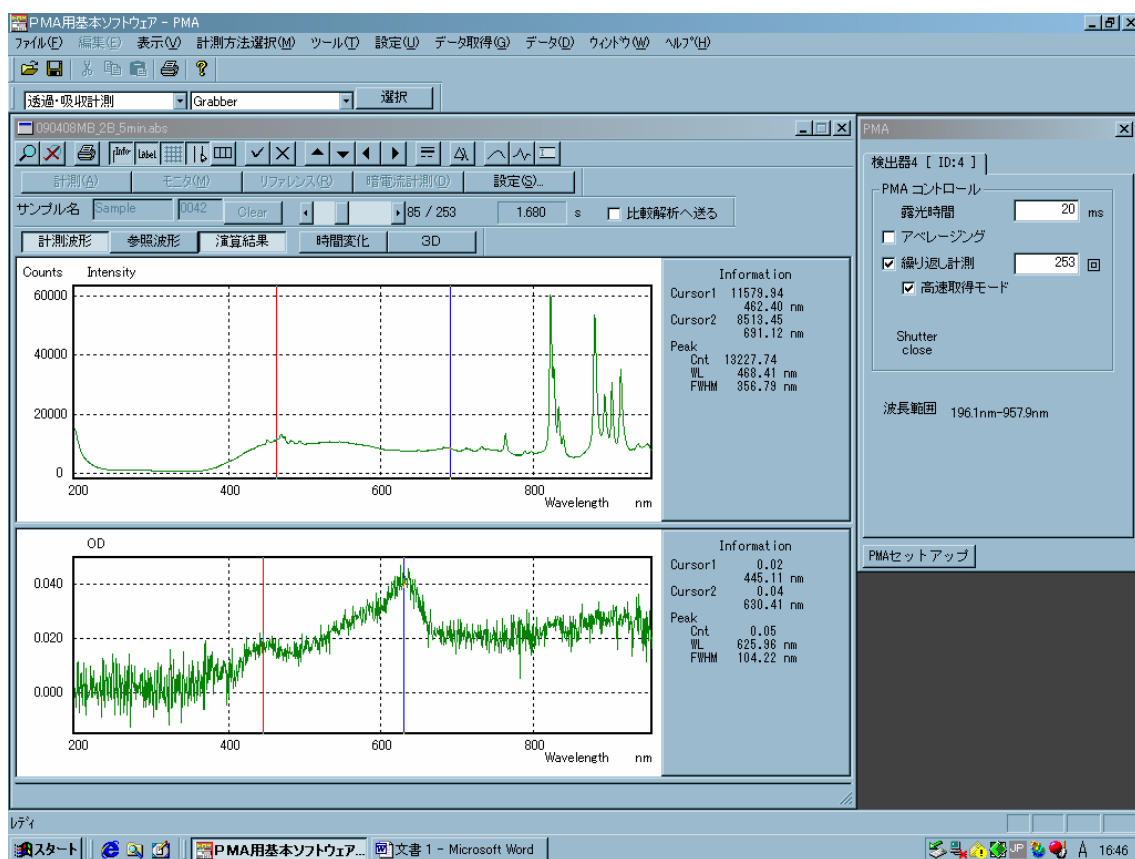


図 2 - 6 コンピュータソフトの表示画面の例

## 2) バックグラウンドの透過スペクトル測定

SOWG 上のセル内にリン酸緩衝溶液を入れ、ドリフトが収斂するのを待ってバックグラウンド用の SOWG の透過スペクトルを測定する。この際、あらかじめ ITO 電極の電位を、例えば +0.5 ~ -0.5 V vs Ag/AgCl の間で変化させ、50mV 毎にバックグラウンドの透過スペクトルを測定し、コンピュータに記憶させておく。

## 3) チトクローム *c* の吸収スペクトルのその場観察と固定化の確認

バックグラウンドの透過スペクトルを測定した時と同じ条件で SOWG の透過スペクトルを測定する。

初めにチトクローム *c* の固定化を確認する。通常、固定化の際、ITO 電極の電位はレストポテンシャルに設定した状態で行う。ソフトウェアでは自動的に吸収スペクトルが表示されるため、408nm 付近に現れる酸化体のチトクローム *c* のソーレ帯のピーク位置からコンフォメーション変化等を受けておらず、吸着構造が正常であることを確認するとともに、ピーク強度から吸着量の変化を観察し、吸着量が飽和したことを確認する。更に、試料溶液をリン酸緩衝溶液に交換し、固定化されたチトクローム *c* のみを残して、吸光度の減少度合いから固定化されたチトクローム *c* の割合を見積もる。

## 4) チトクローム *c* の吸収スペクトルの変化のその場観察

固定化を確認後、ITO 電極の電位を例えば +0.5 ~ -0.5 V vs Ag/AgCl の間で変化させ、50mV

毎に SOWG の透過スペクトルを測定し、チトクローム *c* の吸収スペクトルのピーク位置が酸化体と還元体ではそれぞれ 408、413nm であるため、測定と同時にソフトウェア上に表示されるスペクトル変化から酸化体と還元体の生成を確認する。

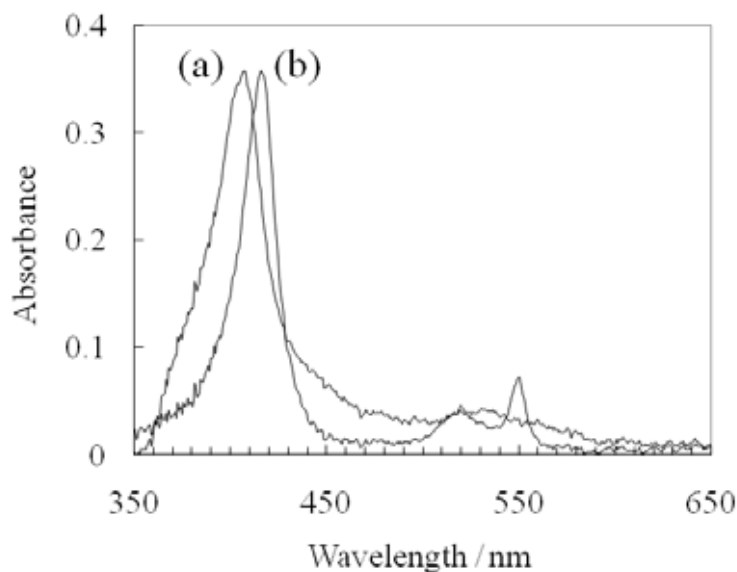


図 2 - 1 チトクローム *c* の電子移動反応に伴う吸収スペクトル変化  
(a)は 0.2、(b)は -0.4 V vs. Ag/AgCl に設定した場合の結果

### 2.3.2. ヘモグロビンへの酸素の結合反応の確認

酵素としてヘモグロビン用い、ヘモグロビンと酸素分子の結合反応を確認した結果を以下に簡潔に記す。

#### 1) 実験条件設定及びバックグラウンドの透過スペクトル測定

チトクローム *c* の電子移動反応の確認の場合と同様に、実験条件をパーソナルコンピュータのソフトウェア上で設定するとともに、バックグラウンドの透過スペクトルを測定し、パーソナルコンピュータに記憶させておく。

#### 2) ヘモグロビンの吸収スペクトルのその場観察と固定化の確認

バックグラウンドの透過スペクトルを測定した時と同じ条件で SOWG の透過スペクトルを測定し、初めにヘモグロビンの固定化を確認する。ソフトウェアでは自動的に吸収スペクトルが表示されるため、406nm 付近に現れる Met 状態のヘモグロビンのソーレ帯のピーク位置からコンフォメーション変化等を受けておらず、吸着構造が正常であることを確認するとともに、ピーク強度から吸着量の変化を観察し、吸着量が飽和したことを確認する。更に、試料溶液をリン酸緩衝溶液に交換し固定化されたヘモグロビンのみを残す場合は、同様に吸光度の減少度合いから固定化されたヘモグロビンの割合を見積もる。

固定化を確認後、セル内の試料溶液を捨て、試料溶液をリン酸緩衝溶液に交換し、固定化されたヘモグロビンのみを残して、吸光度の減少度合いから固定化されたヘモグロビンの割合を見積もる。

### 3) ヘモグロビンの吸収スペクトルの変化のその場観察

SOWG 上に固定化されたヘモグロビンに  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  の 10mM 水溶液をセル内に導入することにより、Met 状態のヘモグロビンは化学的に還元され、活性中心の鉄イオンが 2 価 ( $\text{Fe}^{2+}$ ) の状態になり、それに伴いヘモグロビンのソーレ帯の吸収スペクトルのピーク位置が大きく変化して 430nm にシフトする。このとき、ヘモグロビンの活性中心の鉄イオンは酸素分子とは結合していないため、デオキシヘモグロビンと呼ばれる状態である。

次に、溶液をリン酸緩衝液に取り換えると、SOWG 上に固定化されたデオキシヘモグロビンは酸素分子と配位結合し、オキシヘモグロビンに変化する。それに伴い、再び吸収スペクトルは大きく変化し、ソーレ帯のピーク位置は 414nm にシフトした。

SOWG 上に固定化したヘモグロビンで観察されたこれらのソーレ帯の吸収スペクトルのピーク位置は、溶液中で同様の実験を行った場合に得られた結果とほぼ一致していた。

また、実際の吸収スペクトルは図 2 - 8 に示してある。

これらの実験結果から、SOWG 上に固定化されたヘモグロビンは活性を有していることを確認することができた。

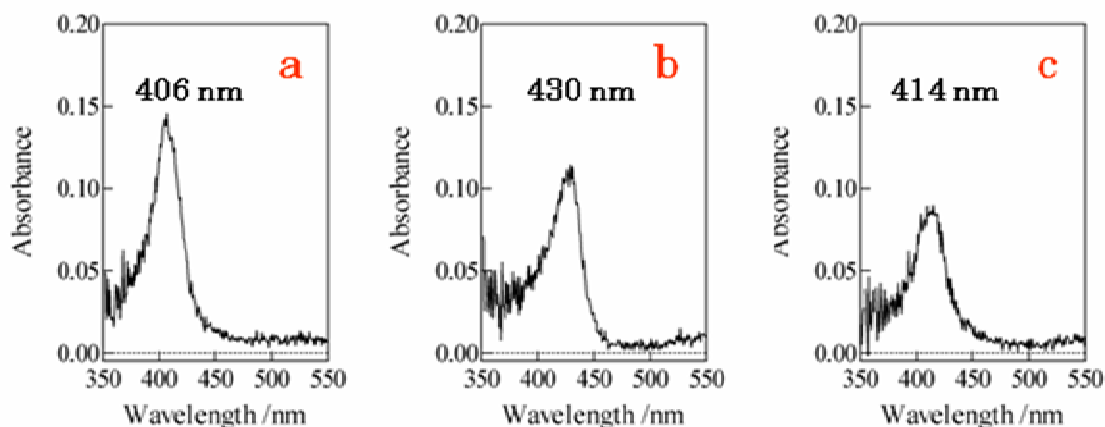


図 2 - 8 SOWG 上に固定化されたヘモグロビンの吸収スペクトルの測定結果  
a は Met 状態、b は  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  の 10mM 水溶液をセル内に導入した後、  
c は b の後にリン酸緩衝液をセル内に導入した後、の測定結果

#### 2.4. おわりに

SOWG 分光法を用いた固液界面における吸収スペクトルのその場観察方法を利用した、酵素の活性測定方法の基本原則、実際の測定手順、実施例等をまとめた。本測定法は我々が開発した産総研オリジナルである。現在も改良や高機能化を進めており、測定対象も広げつつある。今後は酵素の固定化方法や表面修飾方法を検討することで、より多くの酵素分子の機能検査が可能になると考えている。

#### 参考文献

1) “In Situ Observation of Electrochemical Activity and Time Dependent Characteristics of Cytochrome *c* at Bare Indium-Tin-Oxide Electrodes by Voltammetry and Slab Optical Waveguide Spectroscopy”, Yusuke Ayato, Akiko Takatsu, Kenji Kato, Naoki Matsuda, *IEICE Trans. Electron*, E91-C, 1899-1904 (2008).

- 2) "Spectroelectrochemical Studies on Surface Immobilized Cytochrome *c* on ITO electrode by Slab Optical Waveguide Spectroscopy", Naoki Matsuda, Jose H. Santos, Akiko Takatsu, Kenji Kato, *Thin Solid Films*, ~~438-439~~, 403-406 (2003).
- 3) "In situ observation of reduction behavior of hemoglobin molecules adsorbed on glass surface", Masayoshi Matsui, Akiko Nakahara, Akiko Takatsu, Kenji Kato, Naoki Matsuda, *IEICE Trans. Electron.*, **E89-C**, 1741-1745 (2006).

### 3. 水溶性テトラゾリウム塩を用いた微生物簡易検出法のマニュアル（平成20年度）

福岡県工業技術センター 生物食品研究所

#### 3.1. はじめに

薬剤感受性試験や抗菌性物質スクリーニング、食中毒菌検査など微生物の生存率測定は様々な分野で注目される技術である。微生物の生存率測定は一般的にコロニー形成能で目視評価されるが、長い時間がかかったり操作に熟練を要したりと煩雑な点が多い。そこで、微生物の生存率を迅速かつ簡便に測定することを目的として、水溶性テトラゾリウム塩を用いた微生物検出キットが開発された。本測定マニュアルでは、微生物検出キットを用いた簡易検出法の基本原理と操作手順、さらに実施例として大腸菌の増殖アッセイについて述べる。

#### 3.2. 測定方法

##### 3.2.1. 測定原理（図3.1）

NADH(NADPH)はエネルギー代謝活動に関与する補酵素であり、生命体の活動をつかさどっている。微生物はこの補酵素を利用することで外部から供給されたキノン化合物を還元し、ヒドロキノンを生成することができる。ここへ還元発色試薬である水溶性テトラゾリウム塩が共存すると、生成したヒドロキノンにより還元を受けてホルマザン色素に変換される。この一連の反応は微生物の代謝反応を介して起こることから、生成した色素量は微生物の代謝活性に比例することになる。つまり、生きている微生物では代謝が起こり呈色するが、死んでいる微生物では呈色しない。吸光度と生成するホルマザン量との間には比例関係が見られるため、吸光度を測定することで微生物の代謝活性を求めることができる。

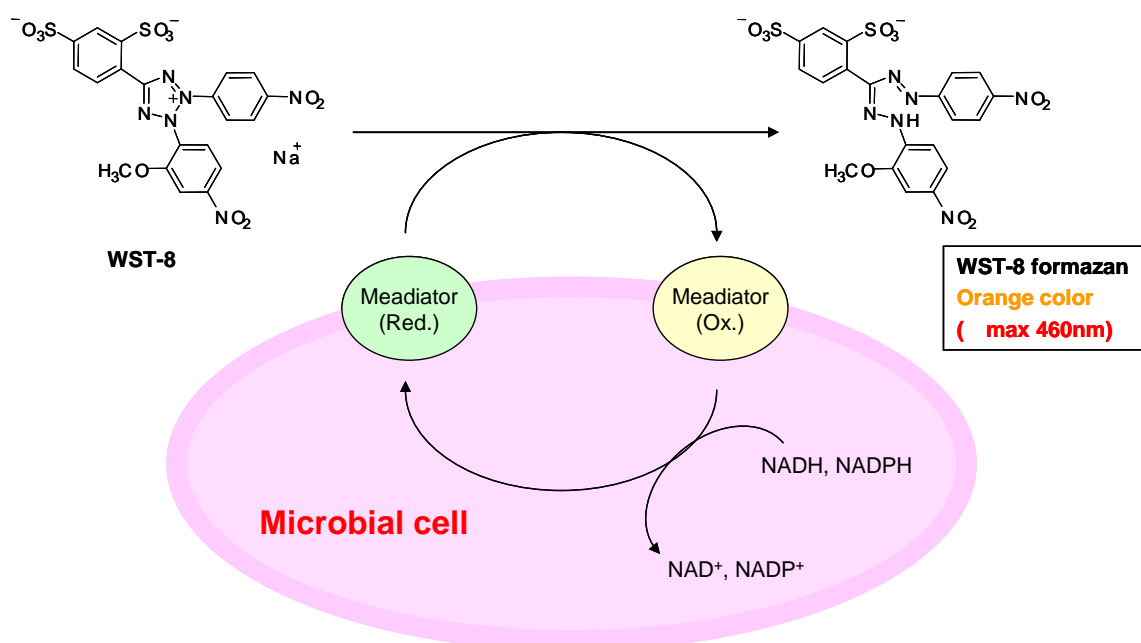


図 3.1 測定原理

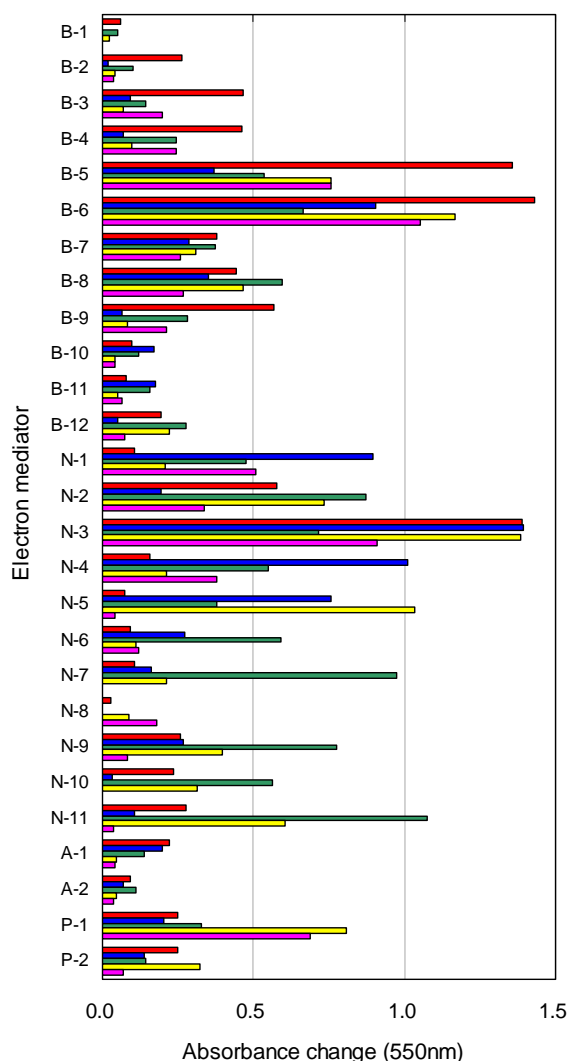
### 3.2.2. 微生物検出キット Microbial Viability Assay Kit-WST

図 3.1 の測定原理を利用した微生物検出キットは、電子メディエータ及び水溶性テトラゾリウム塩から構成される。本検出キットの構築については、様々な微生物をオールラウンドに検出できること、感度良く微生物を検出できること、培地成分の影響を受けないことを考慮して最適な電子メディエータと水溶性テトラゾリウム塩の組み合わせの選抜が行われた。

まず、電子メディエータの選抜については、様々な微生物をオールラウンドに検出できることを考慮して検討を行った。図 3.2 は、キノン類及びフェナジン類の誘導体 27 種類の電子メディエータに対する各種微生物の代謝活性を比較したものである。微生物には食中毒菌 6 種類及び発酵微生物 5 種類を用いてその代謝活性を比較した。図 3.2 の結果より、すべての微生物に良好に代謝されたナフトキノ N-3 を電子メディエータとして選択した。

(A) Fermentation microorganism

- *Saccharomyces cerevisiae* NBRC2347 ( $1.10 \times 10^6$  CFU/ml)
- *Zygosaccharomyces rouxii* NBRC0505 ( $2.24 \times 10^6$  CFU/ml)
- *Lactobacillus casei* NBRC15883 ( $9.45 \times 10^7$  CFU/ml)
- *Corynebacterium glutamicum* NBRC12168 ( $1.76 \times 10^7$  CFU/ml)
- *Acetobacter* sp. NBRC3283 ( $4.70 \times 10^7$  CFU/ml).



(B) Food poisoning bacteria

- *Salmonella enteritidis* NBRC3313 ( $4.80 \times 10^7$  CFU/ml)
- *Staphylococcus aureus* NBRC12732 ( $2.95 \times 10^6$  CFU/ml)
- *Vibrio parahaemolyticus* NBRC12711 ( $1.79 \times 10^7$  CFU/ml)
- *Escherichia coli* NBRC3972 ( $9.50 \times 10^7$  CFU/ml)
- *Bacillus cereus* NBRC13494 ( $8.85 \times 10^8$  CFU/ml)
- *Listeria monocytogenes* ATCC15313 ( $5.70 \times 10^7$  CFU/ml)

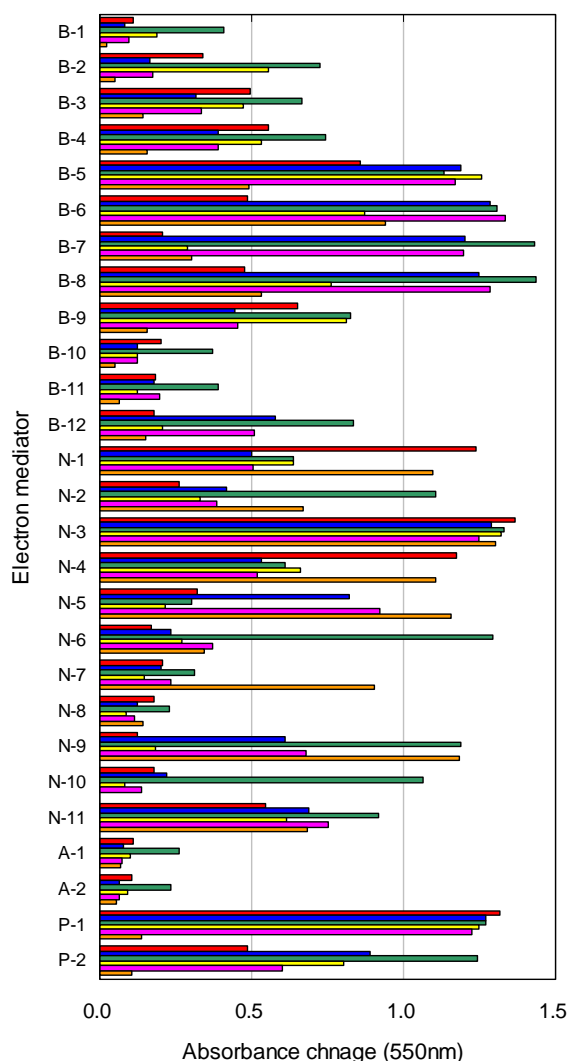


図 3.2 電子メディエータの比較（代謝効率）

水溶性テトラゾリウム塩の選抜については、感度と精度の両面を考慮して検討を行った。水溶性テトラゾリウム塩としては㈱同仁化学研究所製のWST-1, 4, 5, 8, 9及び市販品であるXTTを検討に用いた。感度については電子メディエータ N-3 との反応性が高いことを指標に、精度については培地成分による非特異的なテトラゾリウム塩の還元、すなわちバックグラウンドの上昇が抑えられることを考慮して選抜を行った。図 3.3 は清酒酵母（真菌）、サルモネラ菌（グラム陰性菌）及び黄色ブドウ球菌（グラム陽性菌）を用い、電子メディエータ N-3 存在下で水溶性テトラゾリウム塩による発色度を比較したものである。この結果から、WST-8 及び XTT が高い発色を示すことがわかった。

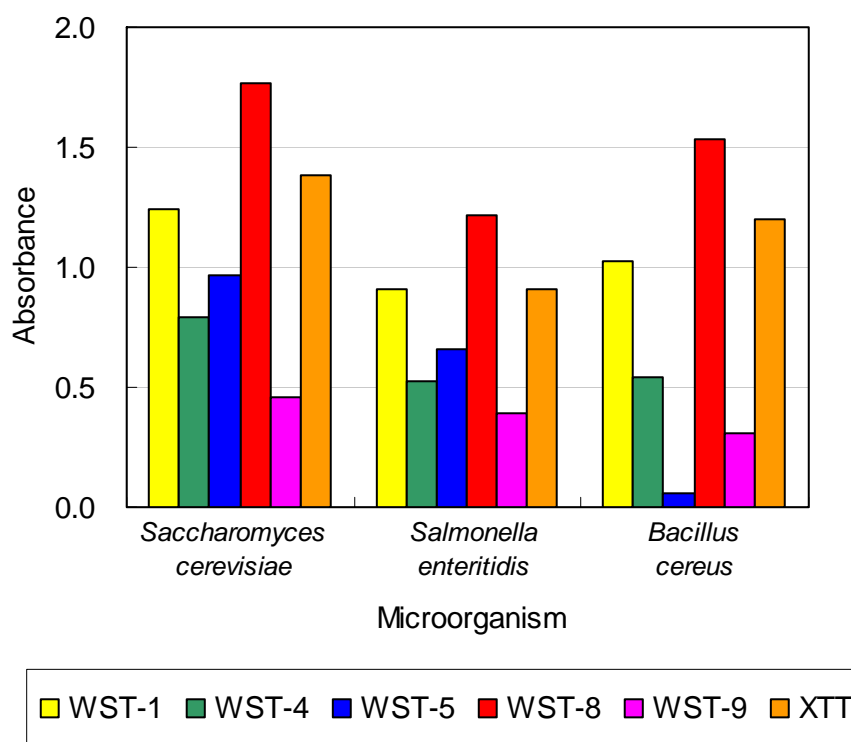


図 3.3 水溶性テトラゾリウム塩の比較（代謝効率）

次に水溶性テトラゾリウム塩として WST-8 及び XTT を用いて各種培地成分の影響を検討した。図 3.4 は微生物が存在しない条件で主要な培地成分を共存させた際の経時変化を示したものである。XTT ではいくつかの培地成分においてバックグラウンドの上昇が見られた。特にグルコースと大豆ペプトンをオートクレーブしてできたメイラード反応物は還元性が高いため大きな影響を及ぼした。これに対して、WST-8 はいずれの成分によってもほとんど影響を受けなかった。

さらに、市販の代表的な実用培地 11 種類についても同様の検討を行ったところ、図 3.5 のように XTT ではいくつかの培地によりバックグラウンドの上昇が見られたが、WST-8 ではその影響は低く抑えられた。

以上の結果より、電子メディエータ N-3 と水溶性テトラゾリウム塩 WST-8 を用いる検出系が微生物検出に対する汎用性、感度及び精度の面から最適であることがわかった。

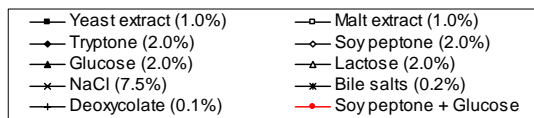
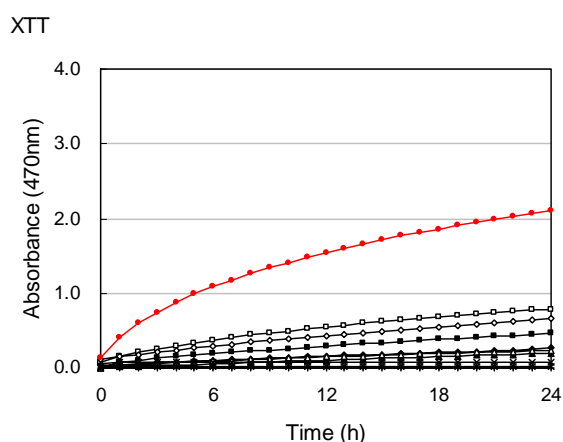
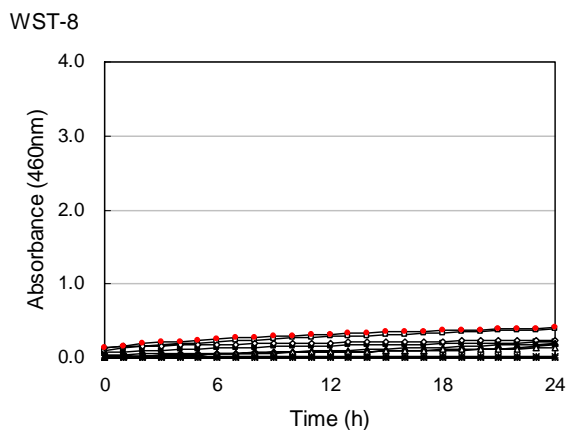


図 3.4 培地成分の影響

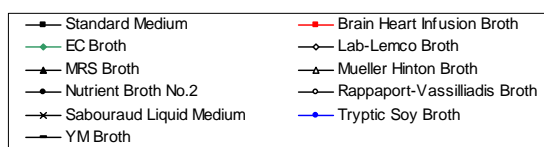
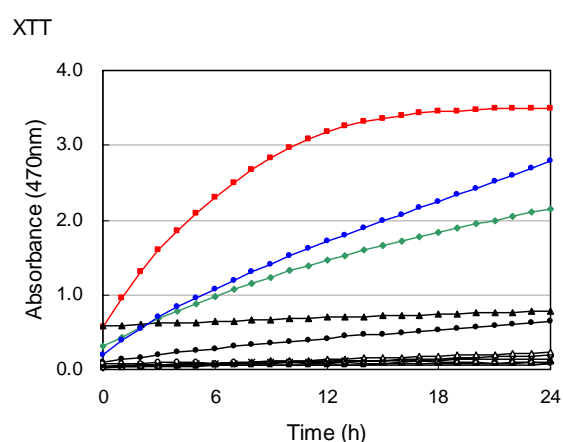
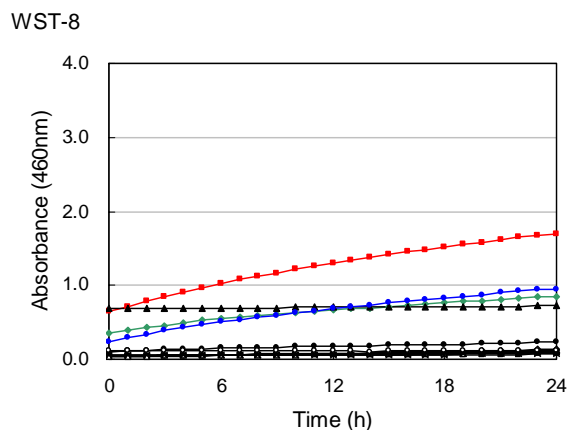


図 3.5 実用培地の影響

### 3.2.3. 測定に必要なもの

- ・ 微生物検出キット Microbial Viability Assay Kit-WST (株同仁化学研究所製)

#### キット内容

WST-8 水溶液 1.0 ml × 5 本

電子メディエータ溶液 N-3 (DMSO) 0.5 ml × 1 本

- ・ 吸光マイクロプレートリーダー (450-490 nm の吸光フィルター)
- ・ 96 ウェルマイクロプレート
- ・ インキュベータ (電気恒温機)
- ・ マイクロピペット (10  $\mu$ l, 200  $\mu$ l) 又はマルチチャンネルピペット (10  $\mu$ l, 200  $\mu$ l)
- ・ プラスチックチューブ

### 3.2.4. 試薬調製 (写真 3.1)

96 ウェルマイクロプレートの 1 ウェルあたり 10  $\mu$ l の検出試薬が必要である。検体数に応



じて調製量を決定する。

### < グラム陰性菌 >

- ・ WST 水溶液と電子メディエータ溶液を 9 : 1 の比率になるようプラスチックチューブで無菌的に混合する。… 検出試薬

### < グラム陽性菌、真菌、一部のグラム陰性菌（ビブリオ菌など） >

- ・ 電子メディエータ溶液を DMSO で 8 倍希釈する。
- ・ WST 水溶液と 8 倍希釈電子メディエータ溶液を 9 : 1 の比率になるようプラスチックチューブで無菌的に混合する。… 検出試薬

グラム陽性菌及び酵母様真菌に関しては微生物検出キットの電子メディエータ溶液（原液）の濃度では増殖阻害が生じてしまうため、濃度を 8 分の 1 で使用する。グラム陰性菌の大腸菌は電子メディエータ原液で増殖阻害を起こさないが、グラム陽性菌のセレウス菌は原液では増殖阻害が起きる。濃度を 8 分の 1 で使用すると増殖阻害は起きず、正常な細胞増殖がみられる（図 3.6）。

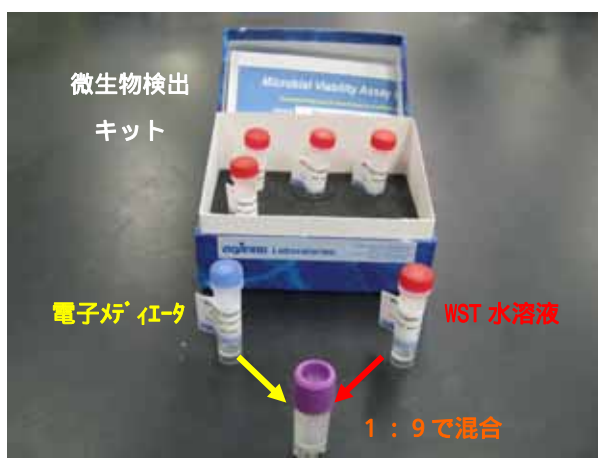


写真 3.1 検出試薬の調製

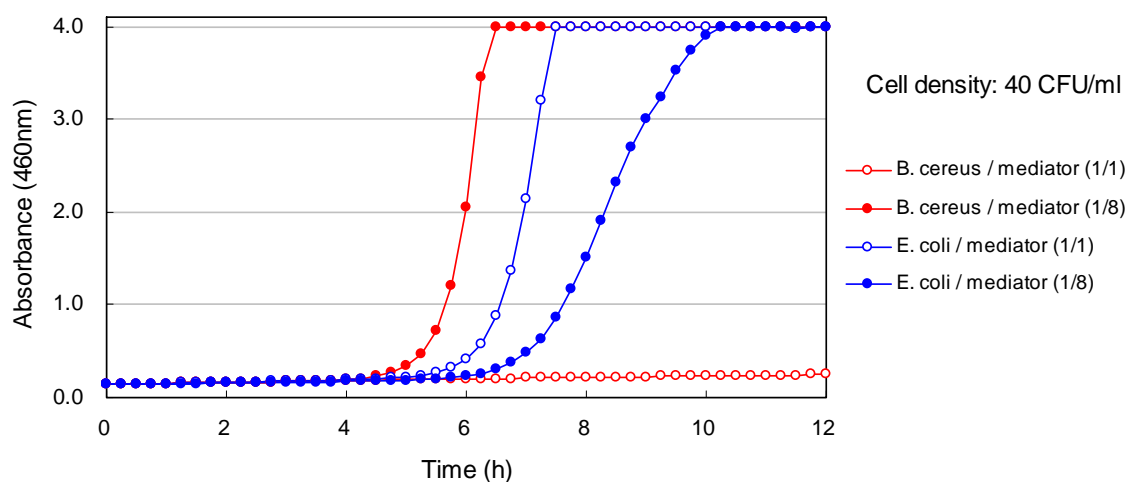


図 3.6 電子メディエータ濃度が細胞増殖へ与える影響

### 3.2.5. 測定手順 (写真 3.2)

- 1) 対象とする微生物を適当な液体培地で希釈・調製し、菌懸濁液とする。
- 2) 96 ウェルマイクロプレート各ウェルに菌懸濁液 190  $\mu$ l を分注する。微生物を含まない培地をブランクとする (図 3.7 参照)。
- 3) 検出試薬を各ウェルに 10  $\mu$ l ずつ添加する。
- 4) 最適な温度に設定したインキュベータ内で一定時間培養する。
- 5) 吸光マイクロプレートリーダーで吸光度 (450 ~ 490 nm) を測定する。

WST-8 の最大吸収波長は 460nm。

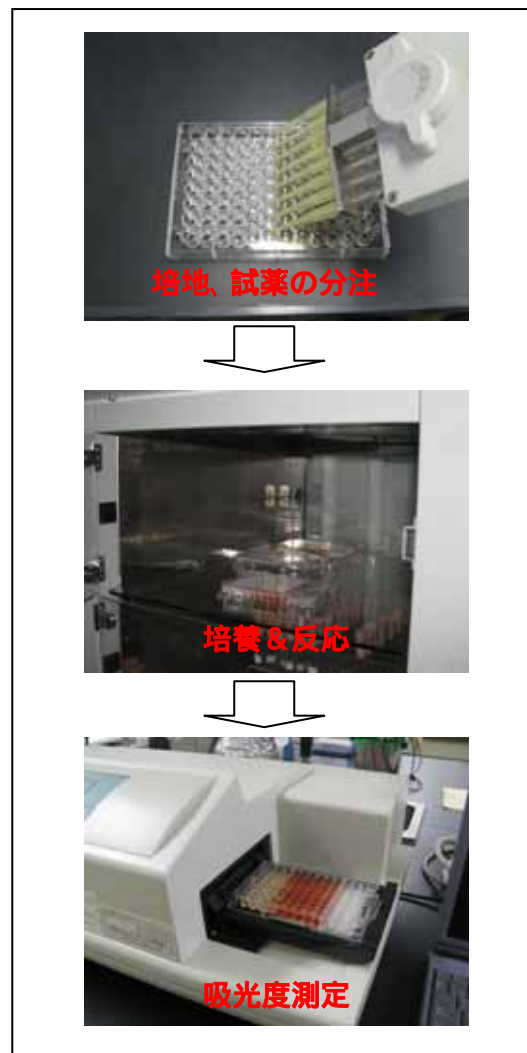


写真 3.2 測定手順

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1.0E+8	1.0E+7	1.0E+6	1.0E+5	1.0E+4	1.0E+3	1.0E+2	1.0E+1	1.0E+0	Blank		検出試薬
B	1.0E+8	1.0E+7	1.0E+6	1.0E+5	1.0E+4	1.0E+3	1.0E+2	1.0E+1	1.0E+0	Blank		発色試薬
C	1.0E+8	1.0E+7	1.0E+6	1.0E+5	1.0E+4	1.0E+3	1.0E+2	1.0E+1	1.0E+0	Blank		発色試薬
D	1.0E+8	1.0E+7	1.0E+6	1.0E+5	1.0E+4	1.0E+3	1.0E+2	1.0E+1	1.0E+0	Blank		発色試薬
E	1.0E+8	1.0E+7	1.0E+6	1.0E+5	1.0E+4	1.0E+3	1.0E+2	1.0E+1	1.0E+0	Blank		発色試薬
F	1.0E+8	1.0E+7	1.0E+6	1.0E+5	1.0E+4	1.0E+3	1.0E+2	1.0E+1	1.0E+0	Blank		発色試薬
G	1.0E+8	1.0E+7	1.0E+6	1.0E+5	1.0E+4	1.0E+3	1.0E+2	1.0E+1	1.0E+0	Blank		発色試薬
H	1.0E+8	1.0E+7	1.0E+6	1.0E+5	1.0E+4	1.0E+3	1.0E+2	1.0E+1	1.0E+0	Blank		発色試薬

菌懸濁液 (CFU/ml, 190 $\mu$ l)       ブランク (190 $\mu$ l)

検出試薬 (110 $\mu$ lストック 各ウェルへ10 $\mu$ lずつ添加)

図 3.7 96 ウェルマイクロプレート分注例

### 3.3. 実施例

#### 3.3.1. 大腸菌の増殖アッセイ

##### 3.3.1.1. 測定手順

大腸菌(NBRC3972)を TSBYE 培地中で前培養した (37、16 時間)。

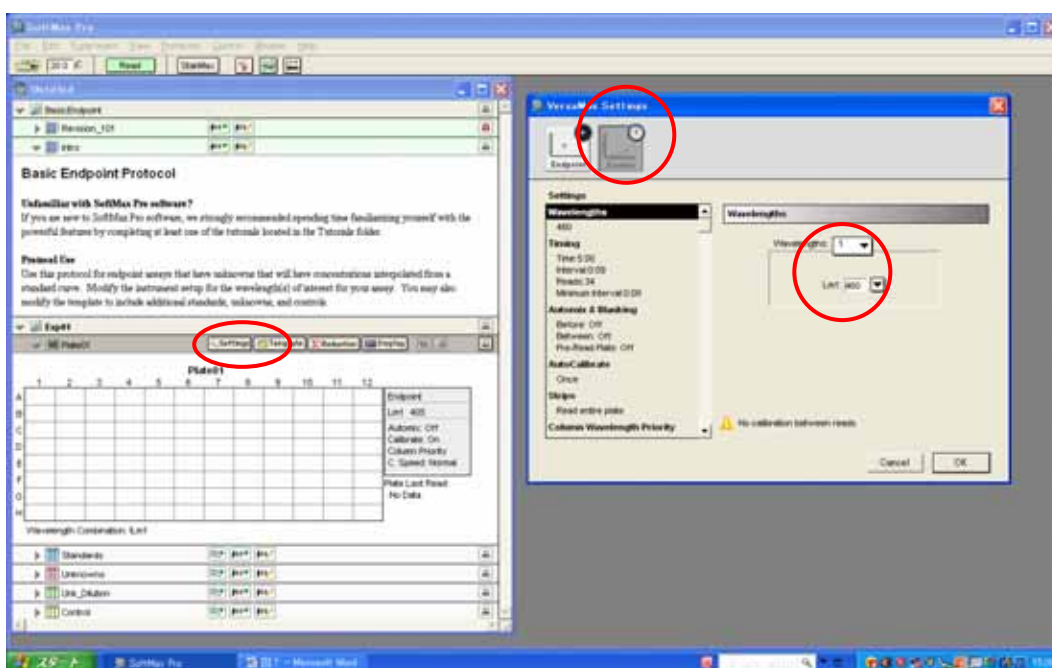
ミュラーヒントンブrossを用いて約  $10^8$ CFU/ml となるように前培養した大腸菌を希釈・調製し、さらにミュラーヒントンブrossを用いて10倍希釈系列で菌懸濁液を作製した。図 3.7 の 96 ウェルマイクロプレート分注例に従い、マルチチャンネルピペットを用いて各菌体密度の大腸菌を各ウェルへ 190  $\mu$ l ずつ分注した。

さらに、マルチチャンネルピペットを用いて各ウェルへ検出試薬 10  $\mu$ l を添加した。培地の蒸散とコンタミネーションを防ぐために、マイクロプレートに透明圧着シール(PCR 用など)を貼り、吸光マイクロプレートリーダー(VersaMax, 日本モレキュラーデバイス)へセットした。

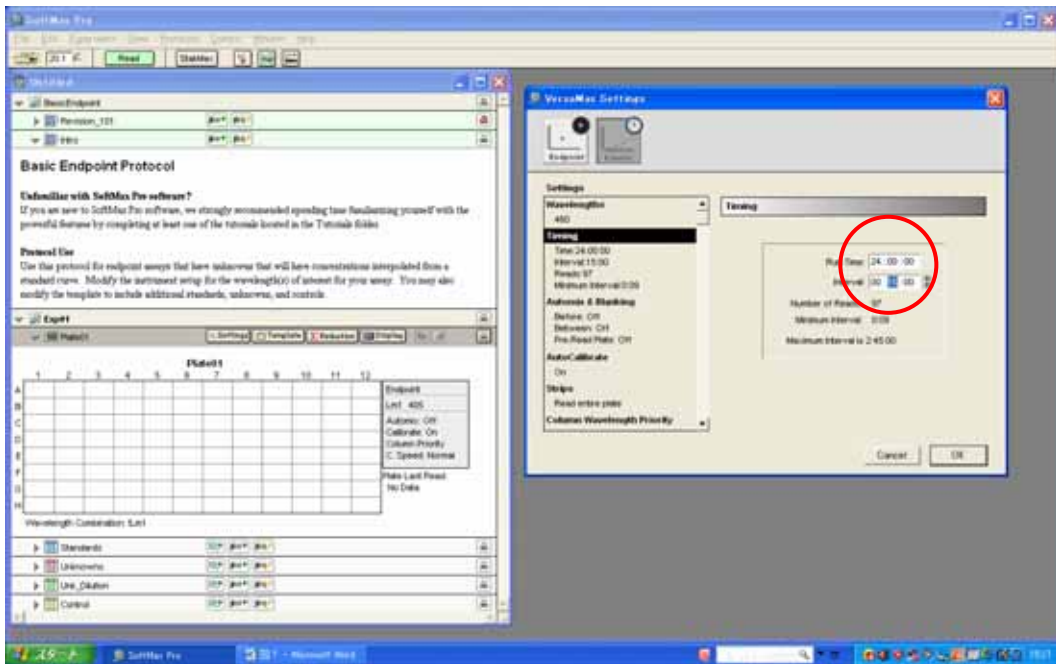
カインティック測定モード で 460nm における吸光度を 15 分おきに 24 時間まで経時的に測定した (37 )。

吸光マイクロプレートリーダーのカインティック測定モード設定手順

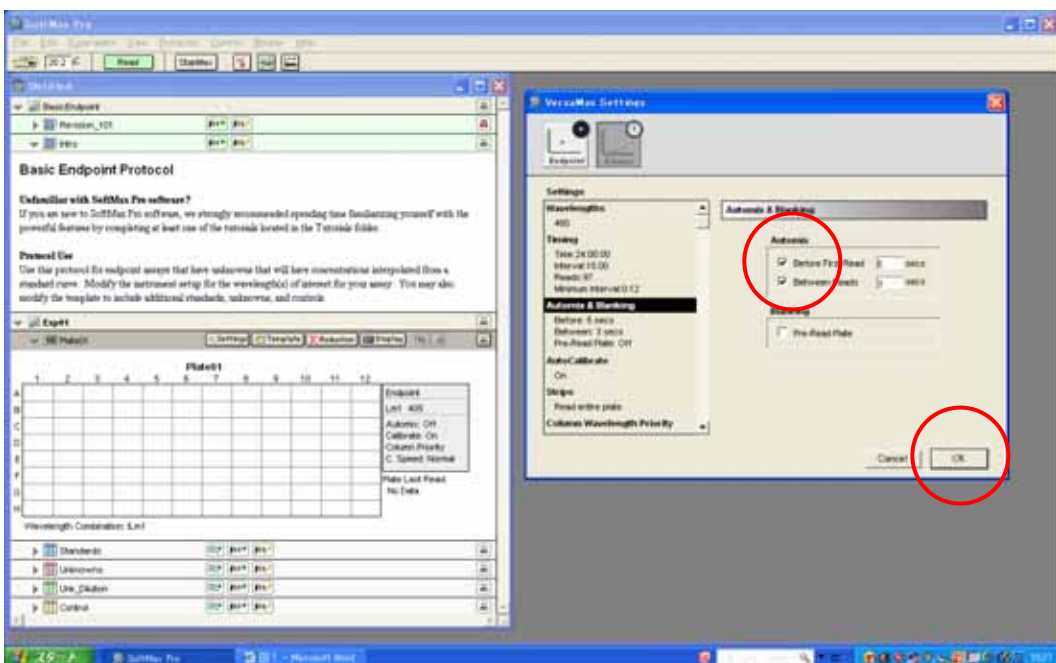
- 1) ソフト “SoftMax Pro” を開くと初期画面が現れる。
- 2) “Settings” をクリックして、“VersaMax settings” を開き、“kinetic” を選択する。
- 3) “Wavelengths” で、波長を「460nm」と設定する。



- 4) “Timing” で、“Run Time” を「24:00:00」、 “Interval” を「00:15:00」と設定する。

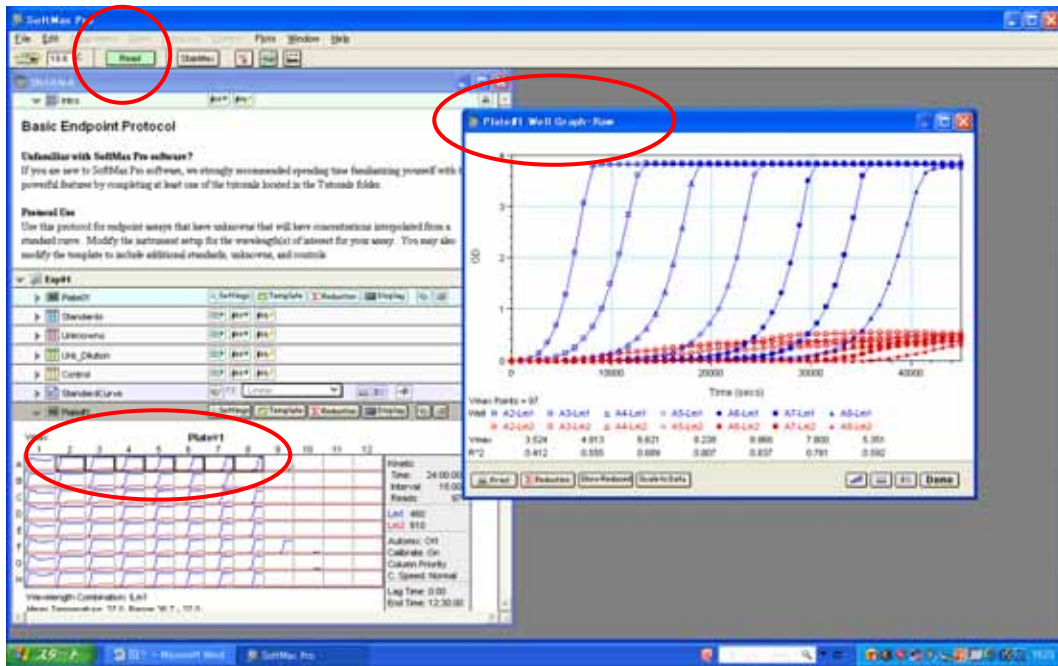


- 5) “Automix&Blanking” で、“Automix” のボックスをチェックする。
- 6) ”OK” をクリックする。



- 7) ”Read” で測定を開始する。
- 8) ”Plate#1” のウェルを選択してダブルクリックすると、“Well Graph-Raw” が立ち上がり、測定経過をモニターすることができる。





### 3.3.1.2. 測定結果及び定量性の確認

図 3.8 は大腸菌の増殖アッセイを経時的に示したものである。マイクロプレートの最左列が高密度(約  $10^8$ CFU/ml)、右に行くにつれて低密度になっており、約 1 時間おきに 1 列ずつ発色がみられることがわかる。

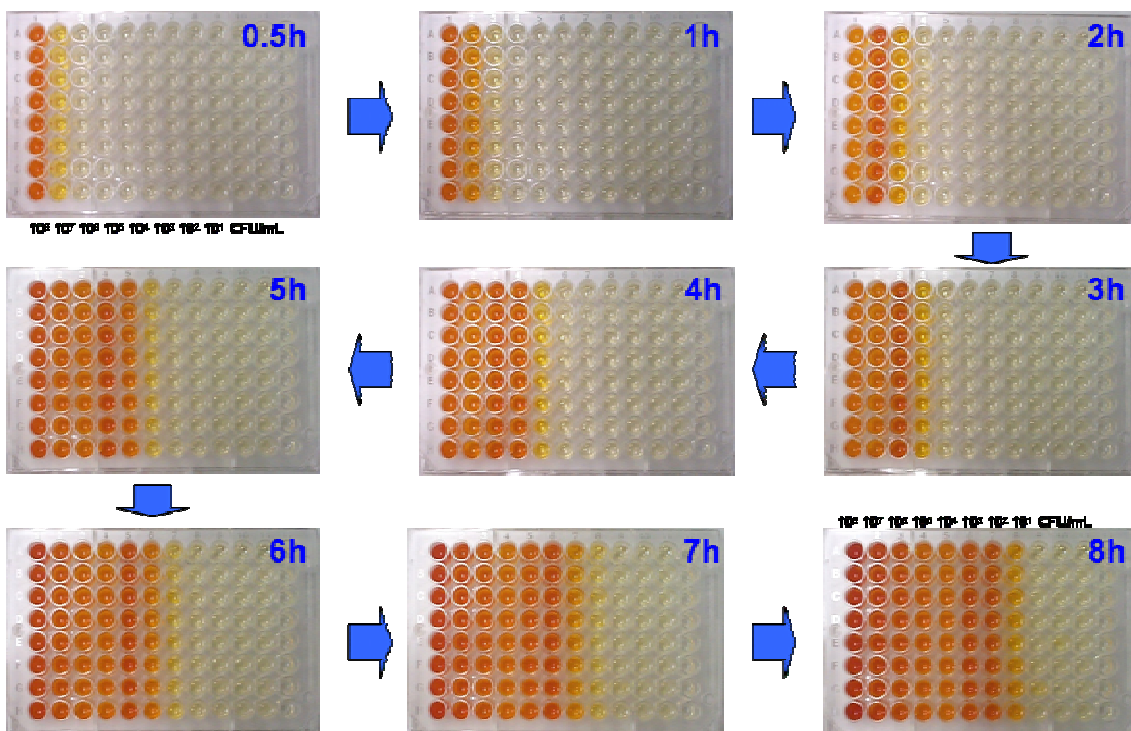


図 3.8 大腸菌の増殖アッセイ (経時的変化)

図 3.9 は大腸菌の増殖アッセイの結果をグラフ化したものである。目視でも十分発色の確

認が可能な吸光度変化 0.5 を示すのに必要な時間(h)を y 軸に、それぞれの菌体密度(CFU/ml)を x 軸にプロットしたところ、下記のような直線関係式が導かれ、大腸菌の定量性が確認できた。

$$y = -0.43\ln(x) + 8.01$$

ここで  $x=1$ 、すなわち 1CFU/ml の時、 $y=8.01$  となることから、1 個の微生物を検出するのに約 8 時間必要であることがわかる。つまり、約 8 時間培養して吸光度変化がなければ大腸菌陰性と判定できる。

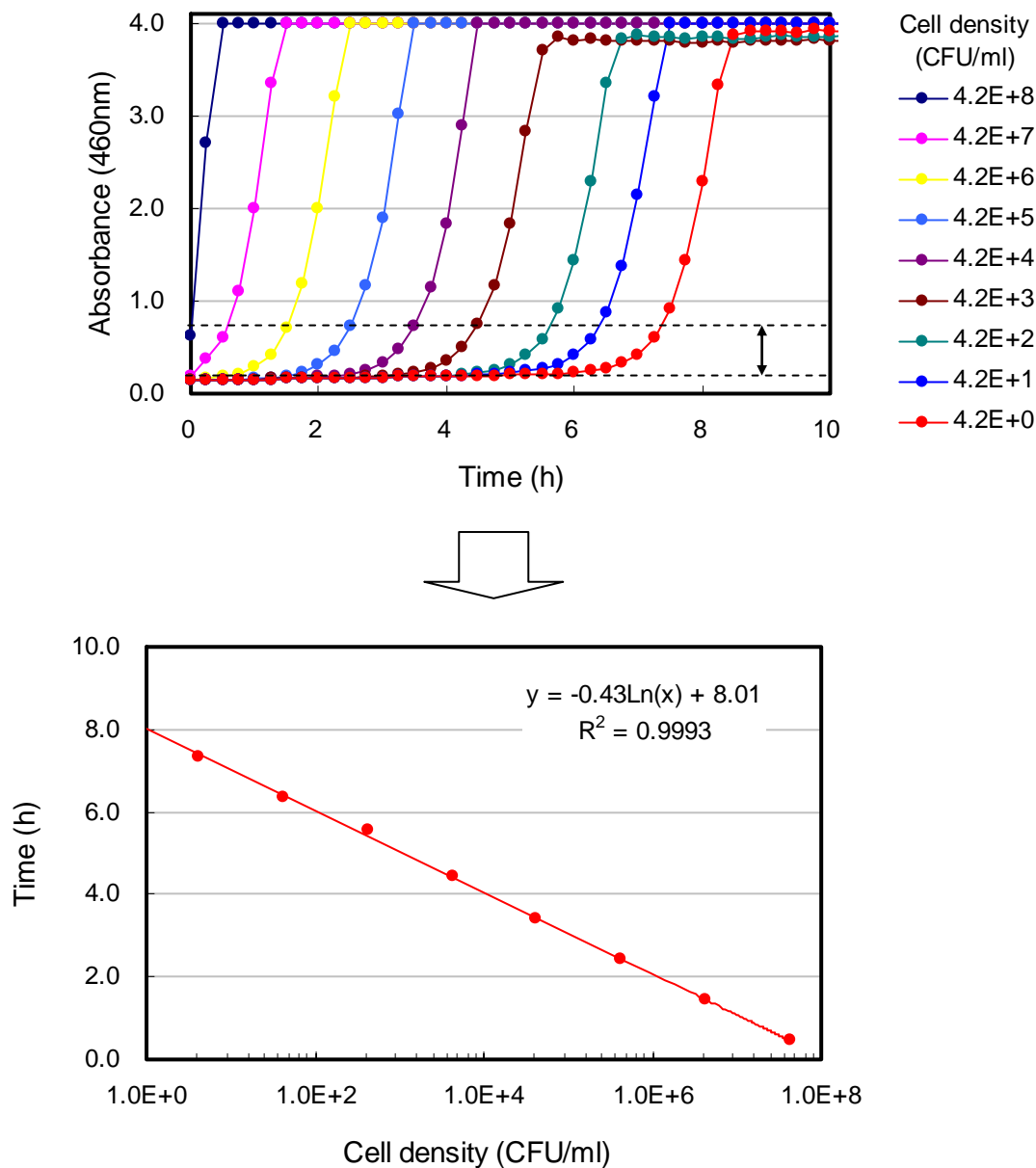


図 3.9 大腸菌の増殖アッセイ ( 定量性 )

### 3.3.2. その他の微生物の定量性

#### 3.3.2.1. 測定手順

下記以外は3.3.1.1.と同様に実験を行った。

- 1 前培養は対象とする微生物に最適な培地、温度で行った。  
酵母：YM 培地、乳酸菌：MRS 培地、腸炎ビブリオ：TSBYE 培地+1%NaCl、  
その他：TSBYE 培地
- 2 電子メディーエータは下記の濃度で使用した。  
グラム陰性菌：原液、グラム陽性菌、酵母、腸炎ビブリオ：8 倍希釈液
- 3 菌懸濁液調製培地  
酵母：MOPS 緩衝性 RPMI-1640 培地、その他：ミューラヒントンブロス

#### 3.3.2.2. 測定結果及び定量性の確認

表 3.1 は様々な微生物について、3.3.1.2.と同様に定量性の確認を行った結果である。いずれの微生物についても菌体密度と検出時間との間に直線関係がみられたことから、本法による定量性が確認された。最右列の "Time(h)" は 1CFU/ml、すなわち 1 個の微生物を検出するために必要な時間を表しており、早い微生物で約 7 時間、遅い微生物では 2 4 時間以上要するものもある。これは微生物の増殖速度に依存するものと考えられるが、目視や濁度測定に比べて高感度にしかも定量的に検出が可能である。

表 3.1 各種微生物の定量性と検出時間

Microorganism		Equation	$r^2$	Time(h)
Yeast				
<i>Candida albicans</i>	JCM2085	$y = -2.27\ln(x) + 26.45$	0.990	26.5
<i>Candida krusei</i>	NBRC1395	$y = -2.20\ln(x) + 28.43$	0.998	28.4
<i>Candida parapsilosis</i>	NBRC1396	$y = -2.00\ln(x) + 28.50$	0.990	28.5
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NBRC2347	$y = -2.33\ln(x) + 31.16$	0.989	31.2
Bacteria				
Gram-positive				
<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i>	NBRC12732	$y = -0.99\ln(x) + 16.05$	1.000	16.1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	NBRC12993	$y = -1.77\ln(x) + 29.18$	0.996	29.2
<i>Bacillus cereus</i>	NBRC13494	$y = -0.44\ln(x) + 7.12$	0.998	7.1
<i>Bacillus subtilis</i>	JCM1465	$y = -0.49\ln(x) + 9.92$	0.987	9.9
<i>Micrococcus luteus</i>	NBRC13867	$y = -1.96\ln(x) + 29.11$	0.985	29.1
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC15313	$y = -1.41\ln(x) + 23.05$	0.997	23.1
<i>Enterococcus faecalis</i>	JCM5803	$y = -0.55\ln(x) + 9.17$	1.000	9.2
Gram-negative				
<i>Escherichia coli</i>	NBRC3972	$y = -0.43\ln(x) + 8.01$	0.999	8.0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NBRC3512	$y = -0.56\ln(x) + 9.92$	0.999	9.9
<i>Proteus mirabilis</i>	NBRC13300	$y = -0.84\ln(x) + 13.57$	0.995	13.6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NBRC13275	$y = -0.80\ln(x) + 15.80$	0.998	15.8
<i>Salmonella enterica subsp. enterica</i>	NBRC3313	$y = -0.53\ln(x) + 10.19$	0.999	10.2
<i>Serratia marcescens</i>	NBRC102204	$y = -0.56\ln(x) + 10.50$	0.999	10.5
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	NBRC12711	$y = -1.08\ln(x) + 19.28$	0.997	19.3

### 3.3.3. 適用実績リスト

#### 真菌（酵母）

*Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida utilis*,  
*Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces rouxii*

#### グラム陽性菌

*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium glutamicum*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus sakei*, *Listeria monocytogenes*,  
*Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *MRSA*, *Staphylococcus epidermidis*,  
*Streptococcus pyogenes*

#### グラム陰性菌

*Acetobacter sp.*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*,  
*Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*,  
*Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Vibrio parahaemolyticus*,  
*Yersinia enterocolitica*

### 3.4. おわりに

微生物検出キット Microbial Viability Assay Kit-WST を用いた微生物の増殖アッセイ法は従来の濁度測定法と比べて感度及び精度において優れた手法である。感度については微生物によって若干の差はあるが約 10 倍高く、測定時間も大幅に短縮可能である。また、濁度測定法で精度の良い増殖曲線を得るためには、微生物がウェルの底に沈降しないようにマイクロプレートに常に振とうさせておかなければならず現実的でない。本法を用いることで、これまで不可能であったマイクロプレートによる微生物の増殖アッセイが可能になった。

今後は今回確立した基本的な操作マニュアルを基に本法を薬剤感受性試験へ適用し、薬剤感受性試験用マニュアルを作成する予定である。薬剤感受性試験の常法である微量液体希釈法は目視で微生物の生育の有無を確認するため、測定に長時間と熟練を要する。本法を適用することにより、微生物の生育の有無を呈色反応で感度よく検出できるため、薬剤感受性試験の迅速化と簡便化が期待できる。本法と微量液体希釈法を用いて得られた結果を比較し、両者に一致が認められる測定条件（最短の培養時間と検出時間）を検討することで迅速かつ簡便な薬剤感受性試験用マニュアルの確立を目指す。

#### 参考文献

- 1) Tadayuki Tsukatani, Hikaru Suenaga, Tomoko Higuchi, Tetsuyuki Akao, Munetaka Ishiyama, Kimitoshi Ezo, Kiyoshi Matsumoto, Colorimetric cell proliferation assay for microorganisms in microtiter plate using water-soluble tetrazolium salts. *J. Microbiol. Methods*, 75, 109-116 (2008).



## 4. 光を用いた非破壊計測方式による水分ストレス計および糖度計のマニュアル(平成20年度)

長崎県工業技術センター

果実の生産管理では、灌水量を制限するなど、樹木にかかる水分ストレスを調節することで果実糖度を高める努力がなされている。このため、水分ストレスの簡便な計測手法の開発が強く望まれている。また、果実の品質管理では、既に大型のライン選果装置などが実用化されてはいるが、農家や小売店、消費者など、個人ユーザにも普及できる高精度で携帯型の糖度計の開発が強く望まれている。

そこで、光計測技術を基に、農作物の水分ストレス状態を測定する水分ストレス計と、果実の糖度を測定する糖度計の開発を目指し、それぞれについて基本的な計測原理等を整理する。

### 4.1. 植物にかかる水分ストレスの非破壊計測技法

#### 4.1.1. はじめに

ミカンなどの果実栽培では、灌水や水切りといった水管理が重要視されている。それは、樹体に与える水分ストレス量の上手なコントロールが果実への糖の集積を促し、高糖度果実の生産を可能にするからである<sup>1)</sup>。このため従来から、果樹にかかる水分ストレスと収穫果実糖度との関係などが研究され、樹種あるいは品種に応じた理想的な水分ストレスのコントロール方法、いわゆる栽培管理技法の研究もなされてきた。

このような栽培技法の研究で用いられてきた水分ストレスの測定器は、プレッシャ・チャンバ法などに代表される破壊方式の機器が一般的であるが、その操作性は煩雑で農業現場での利用には不向きなものであった。このため、高糖度果実の栽培管理技法が完成しても、それを普及させるためには、農業現場で簡便に利用できる非破壊方式の水分ストレス計の開発が別途必要であった。

一方、樹木に水分ストレスが与えられれば、緑葉の分光特性に現れるレッドエッジの波長が短波長側に移動する現象(レッドエッジのブルーシフト)など、分光特性の特徴に変化が生じることが知られている<sup>2), 3)</sup>。そこで、定期的に観測した緑葉分光特性からレッドエッジのブルーシフト量を検出することで、樹体にかかる水分ストレスを非破壊で推定する技法の開発を進めている。

このマニュアルでは、緑葉分光特性の特徴量の変化を捉えることを利用した、植物にかかる水分ストレスの非破壊計測技法について、実際のミカン栽培実験の結果をまじえながら、その基本原理などを整理する<sup>4), 5) 6) 7)</sup>。

#### 4.1.2. 測定と解析方法

ここでは、植物にかかる水分ストレスの非破壊計測のもととなる、緑葉分光特性の測定方法と、測定で得られた緑葉分光特性の特徴量の抽出方法について説明する。

##### 1) 緑葉分光特性

調査には、プレッシャ・チャンバ法などを用いて行われた栽培管理技法に関する既往の研究を参考に、新梢の先端から3枚目の葉を対象とする。

緑葉分光特性の測定には、2種類の方法について試している。一つは、光源と受光部の軸が同一の場合である(図4.1-1(a)を参照)。この測定には、タングステン・ハロゲン光源(LS-1)と、マルチチャンネル分光器(HR2000)、反射プローブ(R200-7)、緑葉と反射プローブとの位置関係を固定する治具などを用いた。なお、緑葉の法線と反射プローブとが成す角は $30^\circ$ とした。

もう一つは、光源と受光部の軸が異なる場合である(図4.1-1(b)を参照)。この測定では、ハロゲン光源(MHF-V501-AL-GF)と、マルチチャンネル分光器(HR4000CG-UV-NIR)、制御用の小型コンピュータ、光源用と検出用の光ファイバ、緑葉と光ファイバの位置関係を固定する治具などで構成される装置を用いて実施した(図4.1-2を参照)。なお、緑葉と光ファイバとの位置関係を固定する治具は、緑葉の法線方向と光源の光軸とを一致させ、緑葉から $45^\circ$ 方向への散乱光を、検出用光ファイバを通して分光器に導くように機能する。

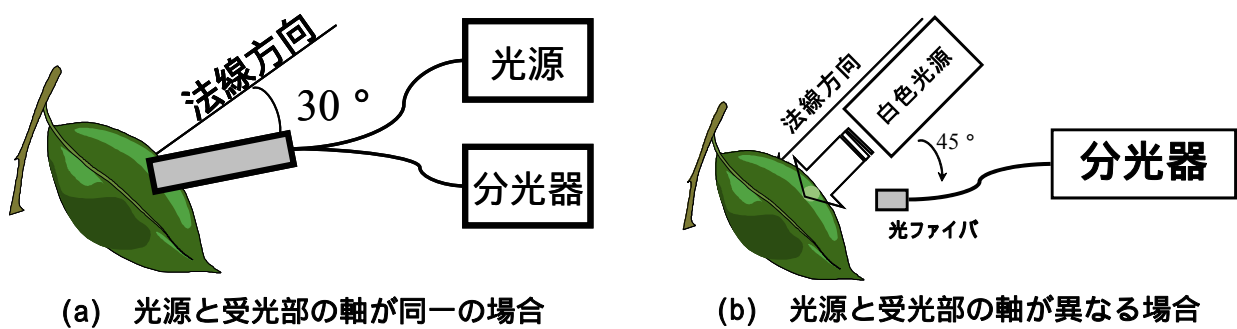


図4.1-1 緑葉の分光反射率の計測



図4.1-2 緑葉分光特性の測定風景

## 2) 緑葉分光特性

レッドエッジは、緑葉の分光反射率を測定した後、その一次微分特性を利用して検出する。

図4.1-3は緑葉分光反射率特性の測定結果例を示している。本報告では、反射率が低い値から高い値に急激に変化する領域(図中に で囲った領域) すなわち一次微分の値が大きくなる領域をレッドエッジとする。

本マニュアルでは、レッドエッジの波長位置や特徴を表す波長として、幾つかの値を採用する。まず、一次微分の値が最大(図4.1-3中にPで示したところ)となる波長を  $\lambda_p$  とする。

次に、 $\lambda_p$  を挟み、一次微分の値が0以上となる区間(図4.1-3中の で囲まれた部分、

すなわち  $s$  (  $e$  の区間 ) に含まれる一次微分特性について、次式で求められる値を  $R_{RE}$  とする。なお、 $R(\lambda)$  は緑葉の分光反射率の一次微分特性を表す。

$$R_{RE} = \int_s^e R'(\lambda) d\lambda \quad \dots\dots\dots \text{式 4.1 - 1}$$

また、同区間 (  $s$  (  $e$  の区間 ) の一次微分特性を、次に示す正規分布の重ね合わせであると仮定する ( 式 4.1 - 2 を参照 )。この式に含まれる係数の最適値となる、異なる2つの波長を  $\lambda_1$  と  $\lambda_2$  (  $\lambda_1 < \lambda_2$  ) とする。さらに、 $\lambda_1$  と  $\lambda_2$  をそれぞれの分布の面積 (  $a_1$  と  $a_2$  ) で加重平均した値を  $\lambda_m$  とする ( 式 4.1 - 3 を参照 )。

$$R_{RE}' = a_1 \frac{1}{\sqrt{2\pi} \sigma_1} \exp\left(-\frac{(\lambda - \lambda_1)^2}{2\sigma_1^2}\right) + a_2 \frac{1}{\sqrt{2\pi} \sigma_2} \exp\left(-\frac{(\lambda - \lambda_2)^2}{2\sigma_2^2}\right) \quad \dots\dots\dots \text{式 4.1 - 2}$$

$$\lambda_m = \frac{a_1 \lambda_1 + a_2 \lambda_2}{a_1 + a_2} \quad \dots\dots\dots \text{式 4.1 - 3}$$

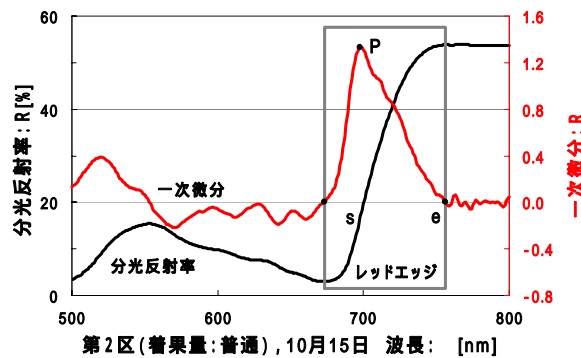


図 4.1 - 3 分光特性の測定結果例

4.1.3. 測定実験と解析結果の評価

ここでは、実際に栽培されている露地栽培ミカンに関する測定データを用いて、緑葉分光特性の特徴量であるレッドエッジと植物にかかる水分ストレスとの関連性について評価する。このことによって、レッドエッジなどの分光特性の特徴量によって植物の水分ストレスを推定することの妥当性を検証する。

1) 試験圃場における栽培実験

検証には、長崎県果樹試験場の試験圃場で栽培されている露地栽培ミカンに関する2003年度のデータを使用した。栽培されていた品種は原口早生である。

(a) 試験圃場内の試験区

図 4.1 - 4 は圃場内の試験区の並びを示している。試験区は、シートマルチ栽培技法が適用されている第1区～第5区と、マルチ無区の合計6区であった。第5区だけは圃場の都合上2列に跨がっていた。

なお、シートマルチ栽培技法とは、透湿性の白いマルチシートで樹下の地面を覆う栽培技法であり、雨水の浸透を防いで人為的に制御された水分ストレスを与えることを可能にする。このため、高糖度果実の生産を目的とする場合などに良く利用される。

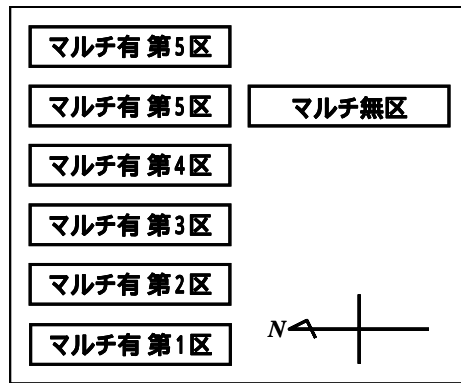


図 4.1 - 4 試験圃場内の試験区の設定

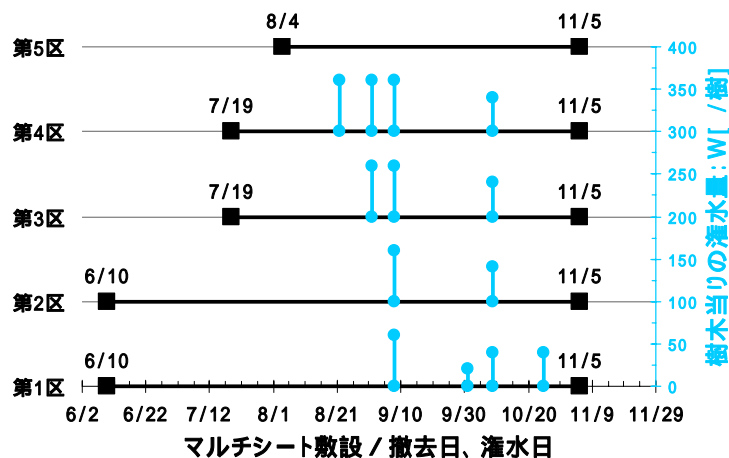
(b) 栽培管理

試験に用いたミカン果樹は、2003年5月上旬に開花期を迎え、同年11月12日の収穫であった。その間の各試験区におけるマルチシートの敷設および撤去作業と、灌水作業の実施状況を図4.1-5に示す。

図4.1-5に黒い四角で示された区間は、マルチシートが敷設されていた期間を示す。マルチシートは、その効果を十分に引き出すために、土壌が適度に乾燥しているときに敷設される。このため、試験区毎に敷設日が異なっている。また、収穫前にはマルチシートが撤去され、樹勢の回復が促される。なお、9月12日に長崎県付近を通過した台風200314号の風雨により、第5区のマルチシートが剥離した。このため、第5区では台風通過後に土壌の乾燥が行なわれ後、再びマルチシートが敷設された。

図4.1-5に丸印で示された棒グラフは、灌水を実施した日と、1樹当たりの灌水量を示している。マルチ無区は、常に降水の影響を受けるため、管理された灌水作業は実施されていない。また第5区についても、前述の台風被害による雨水侵入があったため、管理された灌水作業は実施されていない。

なお、10月1日の第1区の灌水は、好天によって水分ストレス過多となり落葉現象が発生したため、特別に実施されたものである。10月9日の灌水は、収穫前に実施されたもの



注) の区間はマルチ期間を、 の棒グラフは灌水量を示す。

図 4.1 - 5 マルチシートの敷設期間と水管理

で、果実の肥大促進や、樹勢を回復させて翌年の新梢形成や着花を促す目的がある。結果的に、第2区が最も灌水量の少ない試験区となっている。

### (c) 試験木の選定

各列には10本あるいは11本の木があったが、その年の新梢発生量や着花量の違いにより、木によって着果量が一定ではなかった。そこで、第1区～第5区では、着果量を揃えるための摘果作業が行なわれ、実験データを収集する試験木が選定された。表4.1-1は、選定された試験木の着果量を示している。なお、着果量とは、着果数を樹容積（樹木の縦、横、高さの積に0.7を乗じた値で、枝葉の量やその拡がりを知る目安）で割った値であり、枝葉の量に応じた着果数を知る目安となる。

2003年の栽培期は柑橘類にみられる隔年結果性の裏年に当たり、全体的に着果量が少なく、比較的に着果量の多い樹木でさえ、例年に比べれば充分とは言えない着果量であった。このため試験木には、各試験区から最も着果量の多い木が普通着果樹として選ばれた。また、参考のために次に着果量の多い2本も、少着果樹と甚少着果樹として試験木に追加された。

マルチ無区については、普通着果樹が1本選定された。なお、マルチ無区については着果量などの詳しい情報は無い。

表 4.1 - 1 摘果作業後の試験木の着果量

試験区	着果量 [個 / m <sup>3</sup> ]		
	普通	少	甚少
第1区	54.5	30.3	26.3
第2区	53.7	34.5	18.8
第3区	58.4	36.5	29.5
第4区	47.2	39.1	21.0
第5区	55.4	44.0	24.8
マルチ無区			

## 2) 実験データの取得

実験評価には、開花後約70日目から収穫前後までの約120日間について、およそ10日間隔で測定された情報を用いた。その項目は、緑葉分光特性とレッドエッジ波長、水分ストレスの物理的指標の一つである水ポテンシャルである。また、最終的な評価のために、収穫果実の平均糖度も使用した。

### (a) 緑葉分光特性とレッドエッジ

計測の方法、その後のデータ解析については、前述（4.1. 測定と解析方法）のとおりである。

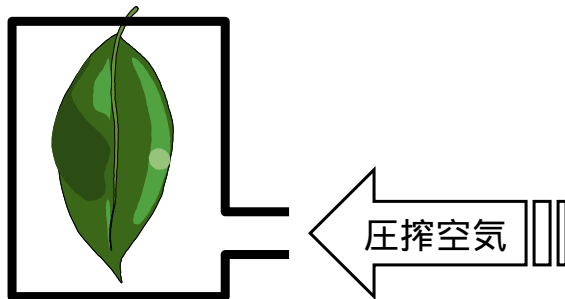
### (b) 水ポテンシャル

水分ストレスの物理的指標の一つである水ポテンシャルは、プレッシャ・チャンバ法を用いて計測された。

プレッシャ・チャンバ法とは、圧搾空気を導入して加圧できる容器に、葉柄部だけを外にだして緑葉を中に入れ、密閉された状態を準備する（図4.1-6(a)を参照）。圧搾空気を容器内に導入して徐々に加圧すれば、ある圧力の時、葉柄の導管から水が吹き出してくる。この

時の圧力にマイナス符号を付けたものを水ポテンシャルとみなす測定方法である。なお、実際の測定には、大起理化工業製の植物体内水分張力測定器（DIK - 7002）が使用された。

また、水ポテンシャルの測定は、緑葉の気孔が閉じる深夜から夜明け前が望ましいとされている。このため、前述の分光特性が計測された後の深夜12時頃を目安に測定が行われた。



(a) 測定原理



(b) 測定器の外観

図 4.1 - 6 プレッシャ・チャンバ法

### (c) 収穫果実の平均糖度

収穫果実の糖度の測定には、ブリックス屈折糖度計が使用された。

収穫された果実からランダムに選んだ5果について、その果肉を搾り、得られた搾り汁の混合液が測定された。従って、得られた値は果実個々のものではなく、平均の B r i x 糖度である。

## 3) 結果と評価

### (a) レッドエッジ波長の検出方法の妥当性

図 4.1 - 7 は、第 2 区の普通着果樹における水ポテンシャルの推移を示している。なお、水ポテンシャルが低下することは（縦軸の下方向）、水分ストレス量の増加を意味する。この図によれば、8月5日には比較的弱かった水分ストレスが、その後増大し、10月6日の時点では強い水分ストレスとなっている。また、マルチシート撤去後（図 4.1 - 5 を参照）の11月11日には水ポテンシャルが上昇し、水分ストレスが軽減されたことが分かる。

図 4.1 - 8 は、第 2 区の普通着果樹の測定結果から、レッドエッジ付近の波長域に限定して、その一次微分特性を幾つか示したものである。水分ストレスが弱かった5月5日、一次分特性は全体的になだらかな山状の特性を成し、720nm 付近に極大部が見られる。水分ストレスが徐々に増大した8月25日と9月16日には、極大部となる波長が700nm 付近に移動し、強い水分ストレスとなった10月6日と10月15日では、その極大部への立ち上がりがさらに急峻な特性へと変化している。また、水分ストレスが軽減された11月11日の特性は、700nm 付近の極大部分への立ち上がり方が小さくなるとともに、720nm 付近の極大部が再び現れている。

図 4.1 - 9 は、全試験木の測定日毎の  $\rho$  の出現頻度を集計した結果である。この図をみれば、緑葉の分光特性の一次微分値が最大となる波長（ $\rho$ ）には、大きく分けて2つのグループがあることが分かる。それらのグループの中心の波長は、 $701.7 \pm 2.6\text{nm}$  と  $717.3 \pm 2.3\text{nm}$  である。

従って、このマニュアルで使用したミカン緑葉の分光反射率の一次微分特性は、701nm または 717nm 付近に極大部を持つ特性を示し、樹木が受けた水分ストレスによってその2つの極大部の発現性が変化していると推察される。

このことから、前述 4.1.2.の 2)の式 4.1 - 2 による一次微分特性の近似は妥当であると考えられる。

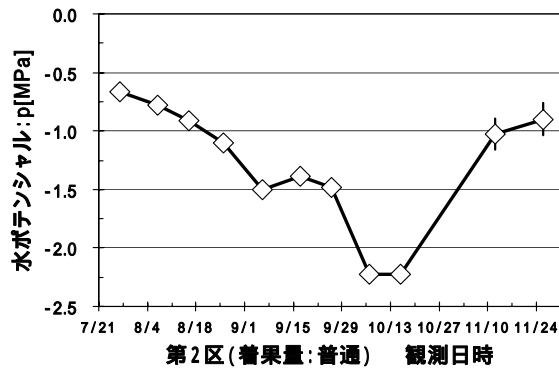


図 4.1 - 7 水ポテンシャルの推移 (第2区の普通着果樹)

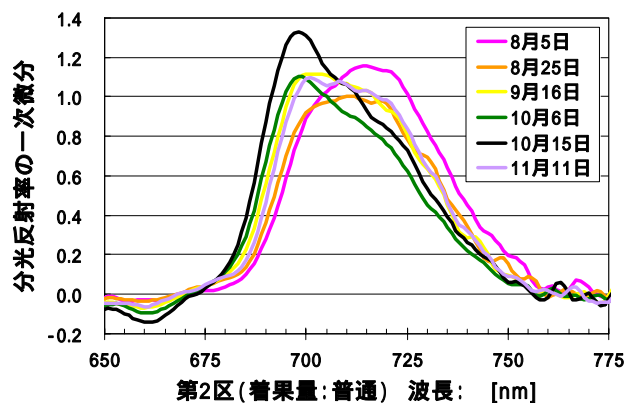


図 4.1 - 8 一次微分の例 (第2区の普通着果樹)

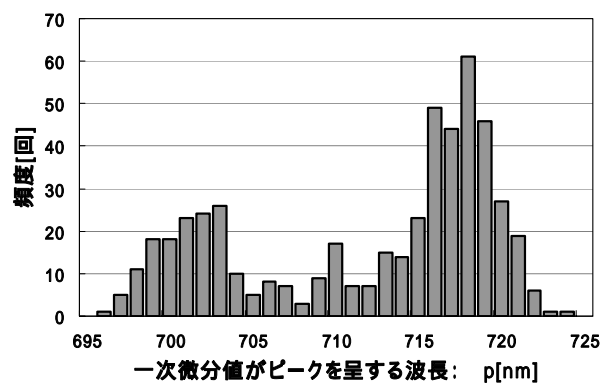


図 4.1 - 9 一次微分値が最大となる波長の出現頻度



(b) 微分特性の近似

式 4.1 - 2 による一次微分特性の近似処理は、その極大部が 701nm または 717nm 付近にあることから、これらの値を初期値とした非線形最小二乗法を用いて実施した。

図 4.1 - 10 は、分光特性の一次微分を 2 つの正規分布の重ね合わせによって近似した結果として、第 2 区の普通着果樹について 8 月 5 日と 10 月 15 日を例に示したものである。この図によれば、レッドエッジ付近の一次微分特性が、式 2 による関数で良く近似されていることが確認できる。なお、図 4.1 - 10(a) の場合は、

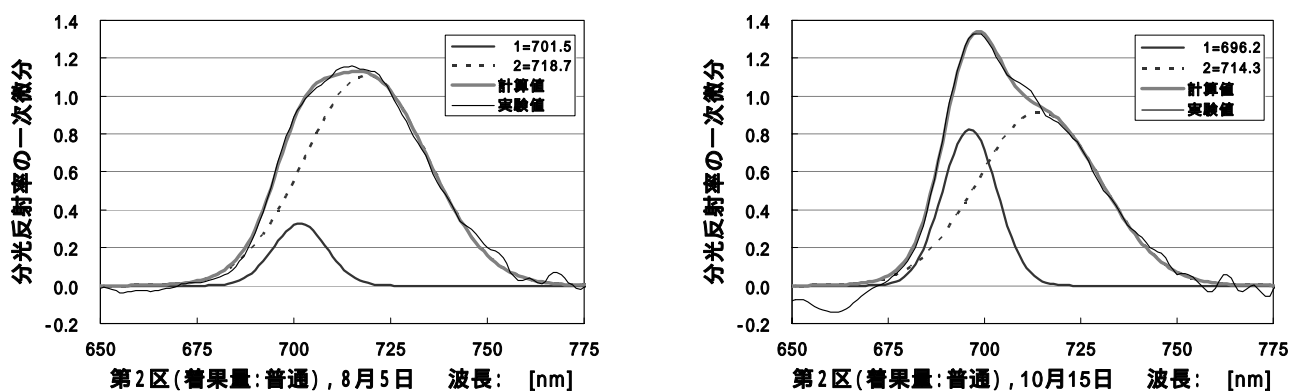
$$a_1=5.70、\quad \lambda_1=6.96、\quad \lambda_1=701.5、\quad a_2=44.1、\quad \lambda_2=15.89、\quad \lambda_2=718.7$$

であった。同じく図 4.1 - 10(b) では、

$$a_1=14.6、\quad \lambda_1=7.08、\quad \lambda_1=696.1、\quad a_2=36.4、\quad \lambda_2=15.86、\quad \lambda_2=714.2$$

の結果が得られている。

図 4.1 - 11 は、レッドエッジの特徴を表す波長 ( $\lambda_1$ 、 $\lambda_2$ 、 $\lambda_p$ 、 $\lambda_m$ ) の推移について、第 2 区の普通着果樹を例に示したものである。図 4.1 - 7 と図 4.1 - 11 とを比べれば、水ポテンシャルの推移とレッドエッジの推移の傾向が類似していることが見て取れる。このことからレッドエッジも水分ストレスに応じて変化することが確認できる。



(a) 第 2 区 (普通着果樹) の 8 月 5 日

第 2 区 (普通着果樹) の 10 月 15 日

図 4.1 - 10 一次微分特性の関数による近似結果の例

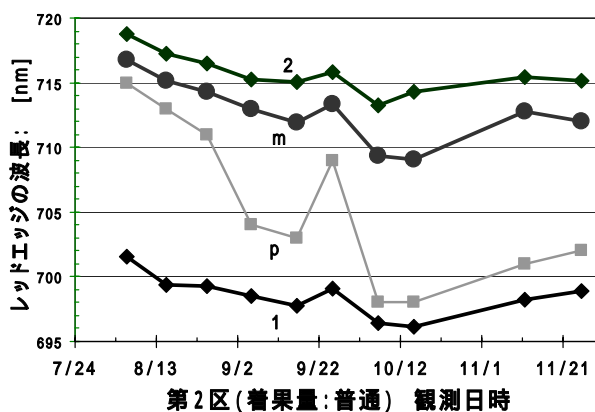


図 4.1 - 11 レッドエッジの特徴を表す波長の推移



(c) 収穫果実の平均糖度との関係

図 4.1 - 12 は、レッドエッジの特徴を表す値である  $\lambda_1$  の 8 月 5 日以降の積算値と、収穫果実の平均糖度との関係を示したものである。なお、両者の間の相関性を求める際、残差が他に比べて大きかった第 2 区、第 4 区、第 5 区の甚少着果樹と、第 2 区の少着果樹のデータは除外している。また、表 4.1 - 2 は、 $\lambda_1$  の代わりに  $\lambda_m$ 、 $\lambda_p$ 、 $\lambda_2$  を用いた場合の同様の相関性の評価結果を加えて示している。

これらの結果から、レッドエッジの日積算値と収穫果実の平均糖度との間には良い相関性があることが分かる。特に、 $\lambda_1$  を使用した場合は、 $R^2=0.89$  の高い相関性が得られている。

なお、前述 4.1.2. の 2) の式 4.1 - 1 で算出される  $\lambda_{RE}$  についても、十分な相関性が得られることを確認している。

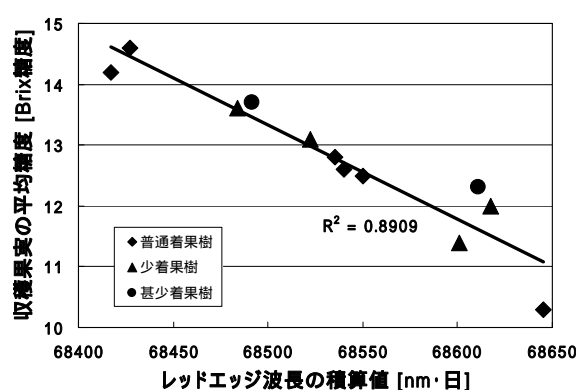


図 4.1 - 12  $\lambda_1$  の積算値と収穫果実糖度との関係

表 4.1 - 2 レッドエッジと収穫果実糖度との関係

レッドエッジの特徴を示す値	$R^2$
1	0.8909
m	0.7769
p	0.5776
2	0.8246

4.1.4. おわりに

本マニュアルでは、緑葉分光特性に現れるレッドエッジなどの特徴量の観測が、植物にかかる水分ストレスの非破壊計測技法に活用できることについて、実際のミカン栽培実験の結果を交えて説明した。

実際の栽培実験では、樹体にかかる水分ストレス量を変化させた露地ミカンの試験圃場を利用して、レッドエッジの推移と収穫果実の糖度などを調査し、その両者の関連性について検討した。この結果、緑葉の分光反射率の一次微分は、平均値が 701nm と 717nm 付近にある正規分布を重ね合わせた様な特性をしており、樹木が受けた水分ストレスの程度によって、その 2 つの分布の発現性が変化していることが分かった。

また、レッドエッジの日積算値と収穫果実との間には高い相関性があることも確認できた。特に、重ね合わされた 2 つの分布の内、短波長側の分布の平均値の日積算値を利用すれば、

収穫果実の糖度との間に  $R^2=0.89$  の高い相関性が得られた。

今後は、より簡易に水分ストレスを推定する方法について検討し、その詳細なマニュアル化などを実施する予定である。

## 4.2. 新方式による果実糖度の非破壊計測装置

### 4.2.1. はじめに

波長域 800 ~ 2500 nm の近赤外光を用いた分光法は近赤外分光法<sup>1)</sup>と呼ばれ、Norris<sup>2)</sup>らによる小麦粉中の水分の定量分析に始まる。今日では果実を初め、他の食品の品質管理、さらには医療診断とその適用範囲は広がり、品質管理上の重要な分析手法となっている。

いずれの分野においても、光を強く散乱する散乱体中での成分分析を目的としている。光学的に透明な媒質の場合、散乱の影響を受けない為、吸光度からランベルト・ベール則を用いてその成分を簡単に定量することができる。しかしながら、散乱体では照射した光の拡散反射(または透過)光が吸収と散乱の影響を同時に受ける為、拡散反射光から吸収成分のみを分離することは難しく、反射スペクトルから散乱体中の成分を定量することは容易ではない。こうした問題を解決するため、これまでの近赤外分光法では試料からの連続した拡散反射(または透過)スペクトルの微分値と試料成分(糖度等)実測値との関連付けをケモメトリックス<sup>3)</sup>と呼ばれる多変量解析で行い(これを検量線作りと呼ぶ)、作成した検量線を用いて測定スペクトルから試料成分を定量してきた。

近赤外分光法が非破壊による青果物の成分分析に応用されたのは1985年以降になってからで、タマネギの乾物量<sup>4)</sup>を測定したのが最初である。果実糖度の非破壊計測手法については、これまでに各種の果物を対象に多くの研究・開発が行われてきた<sup>5) 7)</sup>。現在では、既にこの近赤外分光法を利用した果実糖度の非破壊計測装置が幾つかのメーカーで商品化され、各産地の選果場等で利用されている。しかしながら、果実糖度の非破壊計測を目的としたこれまでの近赤外分光法では、連続したスペクトルデータを取得する必要があり、装置構成はハロゲンランプと分光器を用いた複雑なものとなっている。

一方、半導体レーザー、あるいは発光ダイオードは 小型・軽量、 低電圧駆動、 安価等の優れた特徴を有しており、非破壊計測用光源として非常に魅力的である。また、これまでの分光器タイプを用いた屋外での糖度測定では太陽光の影響を受け、測定誤差が生じる問題があるが、光源に発光ダイオード等を用いることで、その強度変調を利用したロックイン増幅により太陽光などの外乱光の影響を簡単になくすることができる。しかしながら、光源に半導体レーザー、あるいは発光ダイオードなどを用いた果実糖度の非破壊計測技術を実現するには散乱の影響を受けない新たな物理量とその測定方法が必要となる。本項では、その測定方法の一つとして我々が開発した TFDRS (Three-Fiber-Based Diffuse Reflectance Spectroscopy)に関する測定原理とその測定例について記述する。

### 4.2.2. 基本原理

図 4.2 - 1 に TFDRS による相対反射率  $R$  の測定方法を示す<sup>8)</sup>。1本の光照射ファイバーを用いて果実にレーザー光を照射する。果実に照射されたレーザー光は果実内部での散乱、吸収を繰り返しジグザグ光路に沿って伝播する。距離  $L$ 、 $L$  にそれぞれ配置した受光ファイバーで受光される拡散反射光  $i_1$ 、 $i_2$  から算出される相対反射率  $R = i_2/i_1$  を用いて下記式で

表される相対吸光度比  $\gamma$  を定義する<sup>8)</sup>。

$$\gamma(\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3) = \frac{\ln(R(\lambda_3)) - \ln(R(\lambda_1))}{\ln(R(\lambda_2)) - \ln(R(\lambda_1))} \quad (4.3.1)$$

ここで  $R(\lambda_1)$ 、 $R(\lambda_2)$ 、 $R(\lambda_3)$  はレーザー光の波長  $\lambda_1$ 、 $\lambda_2$ 、 $\lambda_3$  での相対反射率をそれぞれ表す。

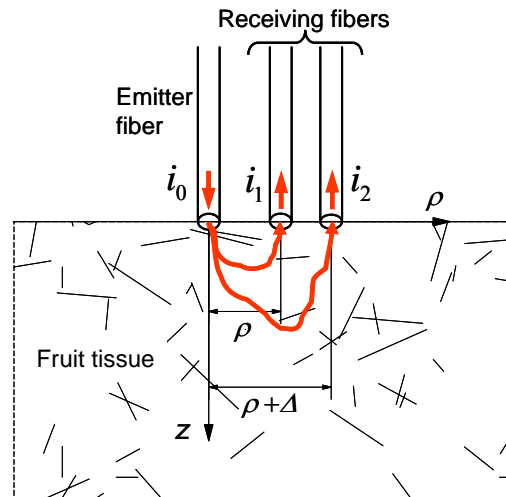


図 4.2 - 1 TFDRS(Three-Fiber-Based Diffuse Reflectance Spectroscopy) 法による相対反射率の測定方法<sup>8)</sup>

果実を一様な散乱体でモデル化すると、(4.2.2)式で表される相対吸光度比  $\gamma$  は検出距離  $\rho$  が  $\rho^2 \gg 1/\mu_s'^2$  を満たす条件では距離  $\rho$  に依存しない下記式で近似される<sup>8)</sup>。

$$\gamma(\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3) \cong \frac{\alpha(\lambda_3)\mu_a(\lambda_3) - \alpha(\lambda_1)\mu_a(\lambda_1)}{\alpha(\lambda_2)\mu_a(\lambda_2) - \alpha(\lambda_1)\mu_a(\lambda_1)} \quad (4.3.2)$$

図 4.2 - 2 に(4.2.2)式で表される相対吸光度比の等価散乱係数依存を糖度 10 wt%、20 wt% のリンゴモデルでそれぞれ計算した結果を示す。ここでの計算では、検出距離  $\rho$  をそれぞれ 5 mm、7 mm とし、また相対吸光度比を算出する 3 つの波長 ( $\lambda_1$ 、 $\lambda_2$ 、 $\lambda_3$ ) を (900 nm, 940 nm, 1060 nm) とした。等価散乱係数の増加に伴い相対吸光度比は(4.2.1)式で算出した値 (図中点線) に収束していく。リンゴの等価散乱係数の範囲  $0.8 \text{ mm}^{-1} \sim 1.5 \text{ mm}^{-1}$  では、糖度による相対吸光度比の変化量は等価散乱係数による変化量の約 10 倍となる。以上の特徴を持つ相対吸光度比を用いることで散乱に影響されない高精度な糖度推定が可能となる。

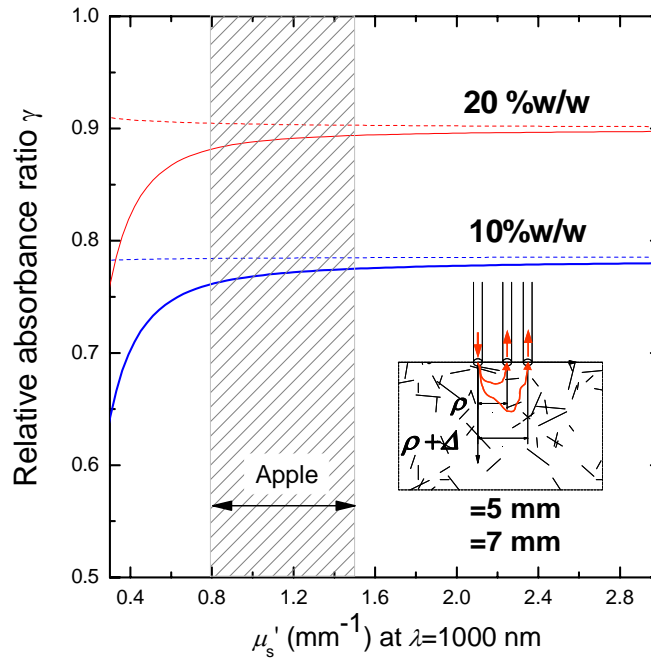


図 4.2 - 2 相対吸光度比と等価散乱係数の関係

#### 4.2.3. 測定装置の構成とその測定条件

図 4.2 - 3 に TFDRS をベースとした実験配置図を示す<sup>9)</sup>。光源に電子制御波長可変 Ti:sapphire レーザー(繰り返し周波数 5kHz、パルス幅 50ns 以下、平均出力 60~70 mW、メガオプト社製)を用いた。発振波長領域は 900~1070 nm (スペクトル幅 1 nm 以下)で、果実の糖度測定に必要な波長範囲を十分にカバーしている。またこの波長可変レーザーでは音響光

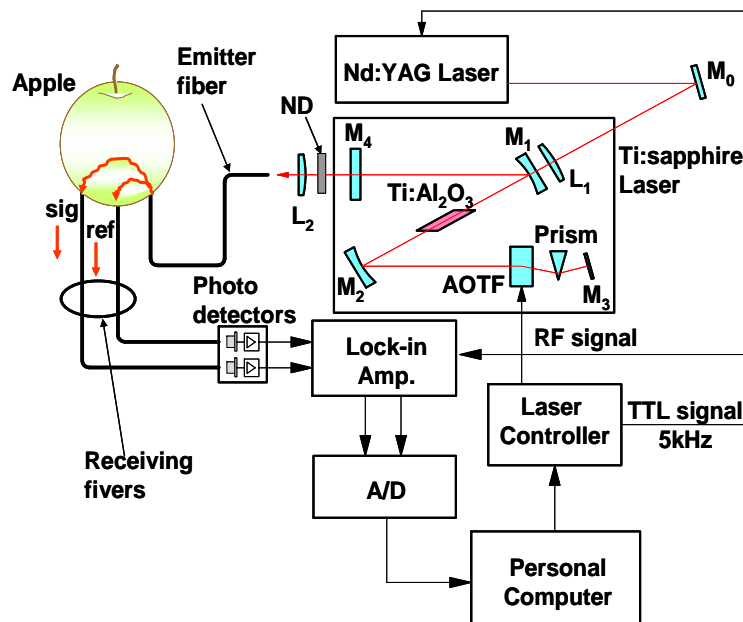


図 4.2 - 3 TFDRS をベースとした実験配置図<sup>9)</sup>

学波長変換フィルター (AOTF: Acousto Optical Tunable Filter) を用いることでレーザー光の波長・出力を機械的な駆動部無しで電子的に制御する<sup>10)</sup>。

光ファイバーを介してレーザー光を果実に照射し、一部果実からの透過光を2本の光ファイバーを介して InGaAs PIN フォトダイオード (G8370-02, 浜松ホトニクス社製) で検出する。さらに、このセンサで検出した検出信号に対しレーザーの繰り返し周波数に同期した変調検波をロックインアンプで行い、その出力信号を A/D 変換ボードによりサンプリング (5ksps) する。2本の受光ファイバーで検出される光強度の比で定義される相対反射率を波長毎に 50 ms の時間間隔で平均し、900~1070 nm の範囲で 1 nm ステップ単位の相対反射率のスペクトルを測定する。

#### 4.2.4. 実果実への適用例

果実サンプルとして 50 個のリンゴ (サンふじ、青森) を皮付きのまま用いた。測定時の果実温度は  $22.1 \pm 0.2^\circ\text{C}$  (std.) であった。反射率測定後のリンゴは測定した箇所を中心に表皮から  $35\text{mm} \times 20\text{mm}$  の円柱にくり抜き、その果汁糖度を屈折糖度計 (PR-101、アタゴ社製) で測定した。本実験装置により測定した相対反射率から (4.2.2) 式により算出した相対吸光度比と糖度の関係を図 4.2 - 4 に示す<sup>9)</sup>。ここでは、相対吸光度比を算出する3つの波長 ( $\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3$ ) として (900 nm, 940 nm, 1060 nm) を用いた。図中の記号 ( ) ( ) は実測値と光拡散理論<sup>11,12)</sup>による計算値をそれぞれ示す。相対吸光度比は糖度と非常に良い直線相関を示し、その回帰誤差は実測値で 0.33 wt% と実用精度が得られた。また、相対吸光度比の実測値と理論値は良く一致しており、糖度推定の為の回帰式 (検量式) の高精度な理論的予測が可能である。

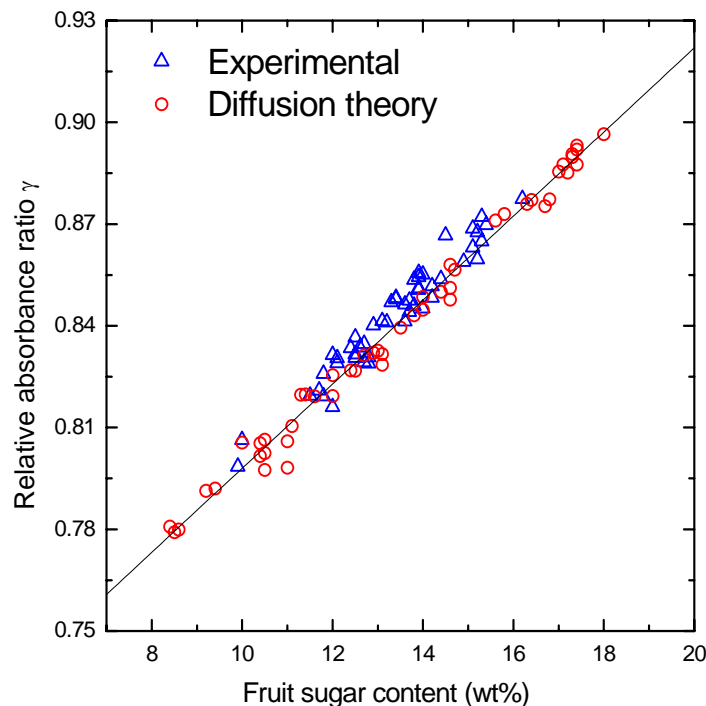


図 4.2 - 4 相対吸光度と果実糖度の関係<sup>9)</sup>

#### 4.3. まとめ

このマニュアルでは、光計測技術を活用した農作物の水分ストレス状態を測定する水分ストレス計と、果実の糖度を測定する糖度計について、その基本的な計測原理等の整理を行った。

水分ストレス計に関する項では、水分ストレス付加量に起因して生じる緑葉分光特性の変化を検出し、その変化から水分ストレスを測定する光計測技術(特開 2005 - 308733、長崎県)について整理した。高糖度果実の生産では、樹木が受けている水分ストレスを指標とした適切な灌水管理が必要であるため、この技法は高糖度果実の生産管理などに活用が期待される。

糖度計に関する項では、TFDRM 法(特願 2003 - 113498、長崎県)で測定される相対吸光度比を利用した果実の糖度計則技法について整理した。この技法で測定される相対吸光度比は、測定成分と直線相関があり、しかも散乱による散乱光路長の変化に影響を受けない特徴がある。このため、対象果実の組織構造に影響されず、数波長の光のみを用いた糖度の非破壊計測が可能となる。

#### 参考文献

##### 4.1.の参考文献

- 1)野並 浩, 2001. 植物水分生理学, 養賢堂, 東京, pp.236 - 257 .
- 2)本郷千春, 他, 1998. 分光反射率からみた樹木の水分ストレス反応, 写真測量とリモートセンシング, 37(4), pp.43 - 50 .
- 3)西田顕郎, 他, 2000. 樹木単葉の分光反射率特性と光合成速度および水分欠乏との関係, 日本リモートセンシング学会誌, 20(3), pp.6-16 .
- 4)兵頭竜二, 他, 非破壊検査手法を取り入れた農作物の高品質栽培技術の確立, 公設試連携プロジェクト平成 17 年度終了課題研究報告書, 長崎県科学技術振興局(非公開).
- 5)兵頭竜二, 他, 2004. ミカン緑葉の水分ストレス応答, 日本写真測量学会平成 16 年度年次学術講演会発表論文集, pp.293 - 296 .
- 6)兵頭竜二, 他, 2004. 果実育成期間に水分ストレスを与えられたウンシュウミカンの緑葉分光特性とその果実糖度との関係, 写真測量とリモートセンシング, 43(5), pp.24 - 35 .
- 7)Ryuji Hyodo, et al., 2005. Practical Use to Satsuma Mandarin Cultivation of the Red Edge Wavelength of Leaves, ACRS2005.

##### 4.2.の参考文献

- 1) 尾崎幸洋、河田聡編:“近赤外分光法”日本分光学会測定法シリーズ32、学会出版センター、東京(1996)。
- 2) K. H. Norris, J. R. Hart: “Direct spectrophotometric determination of moisture content of grain and seeds”, Proc. of the 1963 International Symposium on Humidity and Moisture, 4 (1965)19.
- 3) 尾崎幸洋、宇田明史、赤井俊雄:“化学者のための多変量解析 - ケモメトリックス入門 - ”、講談社、東京(2003)。
- 4) G. S. Birth, G. G. Dull, W. T. Renfro, and S. J. Kays: “Nondestructive

- spectrophotometric determination of dry matter in onions ” , J. Amer. Soc. Hort. Sci., 110 (1985) 297.
- 5) S. Kawano, T. Fujiwara, and M. Iwamoto: “ Nondestructive Determination of Sugar Content in Satsuma Mandarin using Near Infrared Transmittance ” , 62, 2 (1993) 465.
  - 6) D. C. Slaughter: “ Nondestructive Determination of Internal Quality in Peaches and Nectarines ” , Transactions of the ASAE, 38, 2 (1995) 617.
  - 7) R. K. Cho, M. R. Sohn, and Y. K. Kwon: “ New observation of nondestructive evaluation for sweetness in apple fruit using near infrared spectroscopy ” ,J. Near Infrared Spectrosc., 6 (1998) A75.
  - 8) 下村義昭、岡田龍雄 :“ 3 波長の近赤外半導体レーザーを用いた果実糖度の非破壊計測手法の開発 ”、レーザー研究、33、9 (2005) 620.
  - 9) 下村義昭 :“ 近赤外レーザーを用いた果実糖度の非破壊計測技術の開発 ”、レーザー学会第 365 回研究会報告、RTM-07-37 (2007) 55.
  - 10) S. Wada, K. Akagawa, and H. Tashiro: “ Electrically tuned Ti:sapphire laser ” , Opt. Lett., 21, 10 (1996) 731.
  - 11) A. Ishimaru: “ Wave Propagation and Scattering in Random Media ” , IEEE Press, New York (1997).
  - 12) M. S. Patterson, B. Chance, and B. C. Wilson: “ Time resolved reflectance and transmittance for the noninvasive measurement of tissue optical properties ” , Appl. Opt., 28, 12 (1989) 2331.

## 5. ミリ波による非破壊型糖度計等のマニュアル（平成20年度）

宮崎県工業技術センター

### 5.1. はじめに

現在の私たちの身の回りにおいては、電波を活用した製品があふれている。電波がなければ、現在の快適な生活は成り立たなくなっている。

電波の利用状況については、図 5.1 で示したとおりであり、2つの分野に大別できる。一つは情報通信の分野である。情報通信の分野では、ラジオ、テレビ、携帯電話等で、電波が利用されている。初期の携帯電話は音声の通話だけであったが、電波利用技術の高度化に伴い、ショートメッセージ、メールの送受信が可能になり、さらには静止画や動画の送受信も可能になった。今日ではインターネットの利用も可能になったため、航空券やホテルの予約にも活用されている。GPS 機能により、行方不明者の現在地情報を得ることも可能である。

もう一つの電波の利用はセンシングの分野である。自動車の衝突防止レーダなどの ITS 関連システム、地雷検出器、コンクリート中のクラック検査装置などが研究され、一部で実用化も進んできている。

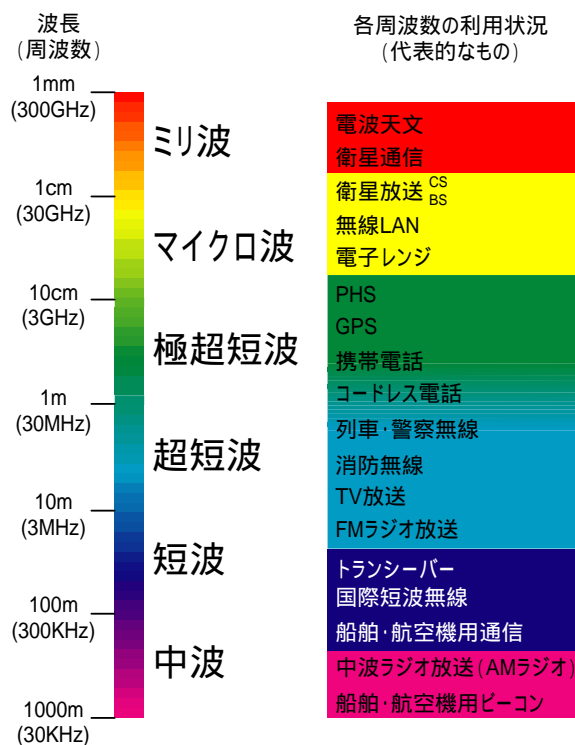


図 5.1 電波の種類と利用状況

このような電波の一種として、ミリ波がある。ミリ波は、波長が1mmから10mm（周波数に換算すると300GHz～30GHz）の電波のことであり、以下のような特長が挙げられる。

- ・携帯電話等で使われているマイクロ波と比較した場合、
  - 小型・軽量のシステムを実現できる。
  - 周波数帯域が広いため、多くの情報を扱える。
  - センシングに用いた場合に高分解能が得られる。
- ・可視光線あるいは赤外線と比較した場合、



表皮効果が深いので、被測定物の内部情報が得られる。

塵・ほこりなどに対する耐環境性に優れる。

以上述べたように、ミリ波はマイクロ波や可視光線などにはない特長をもっており、宮崎県工業技術センターでは、このミリ波の優位性を利用した非破壊検査装置の開発に取り組んでいる。

ミリ波を使った非破壊検査方式には、被測定物が熱エネルギーとして放射するインコヒーレントなミリ波を受信するパッシブ方式と、発振器を使ってコヒーレントな電波を被測定物に照射し、反射や透過した電波を受信するアクティブ方式とがある。当センターでは、パッシブ方式のミリ波計測装置を使った果実糖度計の開発と、果実以外の農林畜産物等の品質判定への応用展開を図るためのアクティブ方式非破壊検査方法の開発を進めており、今回、測定のためのマニュアル作成を行った。下記に現在までに作成したマニュアルを示す。

## 5.2. パッシブ方式非破壊型糖度計

本節ではパッシブ方式のミリ波受信装置（放射計）を使用して、果実の糖度を非破壊で測定するためのマニュアルを記す。測定のために理解しておくべき、基礎的な原理も併せて記載する。

### 5.2.1 プランクの法則

あらゆる物質はプランクの法則に従い、熱エネルギーを放出している。黒体が放射するエネルギーと波長の関係を図5.2に示す。赤外領域には劣るもののミリ波帯でも電力が放射されており、ミリ波帯では温度と放射電力が比例関係になっていることが分かる。

物質が黒体でない場合、物体から放射されるミリ波電力は、

$$P = \epsilon kTB$$

で表される。ここで、 $\epsilon$  は物体の放射率、 $k$  はボルツマン定数、 $T$  は物体の温度、 $B$  は帯域幅である。

物質の放射率が異なれば、放射されるエネルギー強度に違いが生じると考えられる。このように物質が放射する微弱なエネルギーを測定する装置をパッシブ型受信装置（放射計）と呼ぶ。

ここで、一般的に物体から放射される微弱なミリ波は、電力  $P$  に代わり、物体の放射率と温度を用いて、

$$\tau = \epsilon T \quad \dots (5.1)$$

と表される。これを、その物体のミリ波帯輝度温度と呼ぶ。

次に、果実の糖度が変化した場合に、輝度温度に違いが生じるかの検証をショ糖水溶液を用いて行った。

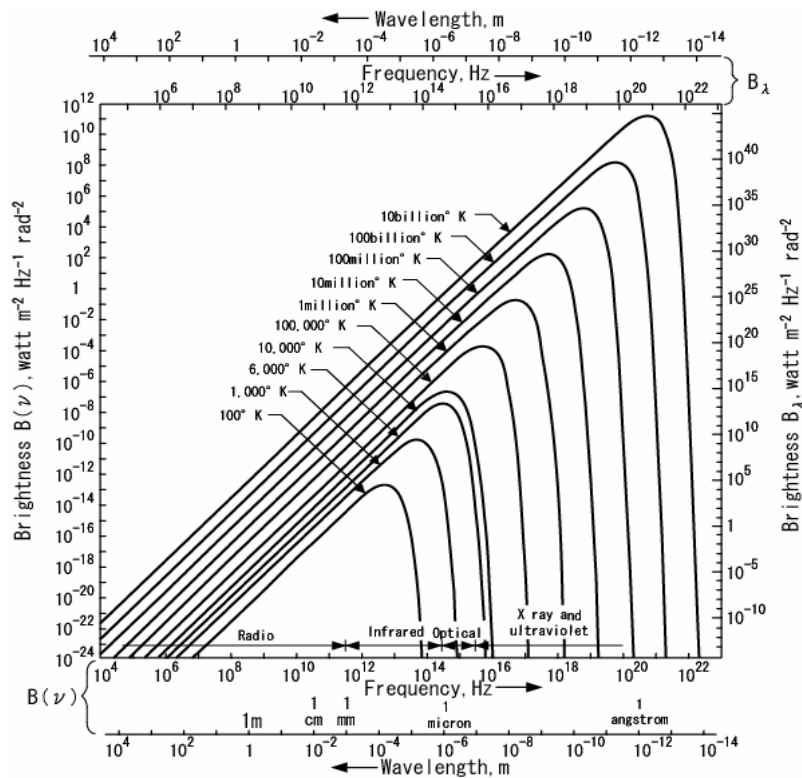


図5.2 プランクの法則

### 5.2.2 ショ糖水溶液における濃度と放射率の関係

物質の複素誘電率（誘電率  $\epsilon'$  と誘電損失  $\epsilon''$ ）を用いると、放射率は、

$$\epsilon = 1 - \frac{1 - \sqrt{\epsilon' - j\epsilon''}}{1 + \sqrt{\epsilon' - j\epsilon''}} \quad \dots (5.2)$$

ここで  $j$  は虚数単位を表す。

で表されるため、物質の誘電率が分かれば、計算により物質の輝度温度を求めることができる。

果実糖度とミリ波強度の相関関係を解明するに当たり、まずショ糖水溶液を用いてモデル化し、ショ糖水溶液の濃度とミリ波強度について検討を行った。

表 5.1 に濃度が異なるショ糖水溶液の、誘電率と誘電損失を示す。ここでは、周波数が 35GHz における値を記す。濃度が 0% の場合、誘電率が 20、誘電損失が 30 であることから、放射率は式(5.2)により、0.444 となる。また、常温 21.5 における水の輝度温度は式(5.1)により、130.8K となる。5%、10%、15% ショ糖水溶液についても同様に求めた結果から、ショ糖水溶液の濃度が高くなると輝度温度は高くなると考えられる。

表 5.1. ショ糖水溶液の輝度温度

濃度	誘電率	誘電損失	放射率	輝度温度
0%	20	30	0.444	130.8
5%	19	28	0.456	134.3
10%	18	27	0.462	136.1
15%	17	25	0.475	139.9

水温 21.5 における輝度温度を表す。

### 5.2.2. 測定装置原理

上記の結果から輝度温度が分かれば、濃度を推定できると考えられる。この輝度温度を測定するための装置がパッシブ型受信装置（放射計）である。今回使用した、パッシブ型受信装置（放射計）のタイプは、ディッケ型である。等価回路を図 5.3 に示す。このように、発振器を使用しないために、シンプルな装置構成になり小型化が期待できる。

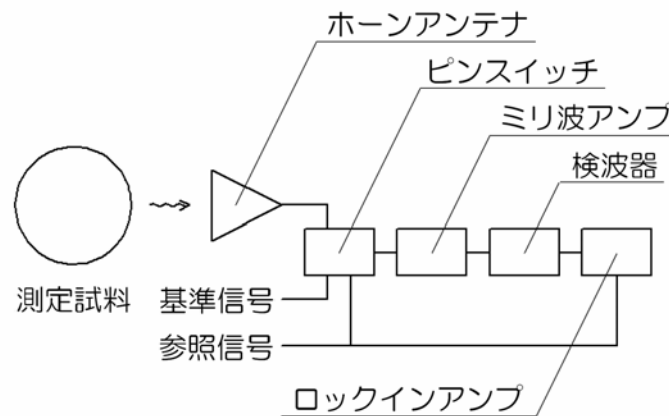


図 5.3 ディッケ型放射計の等価回路

図 5.4 にディッケ型受信機のブロックダイアグラムを示す。ピンスイッチにより、受信機に入力される信号が、アンテナが受信する熱雑音と参照信号に切り替えられる。2つの信号がロックインアンプによって同期検波されるので、図 5.4 に示すように、受信機で発生するノイズを打ち消す。また、増幅器の利得変動等の影響も受けない。したがって、雑音に埋もれた微弱な信号を検出することができる。さらに、雑音成分の直流成分が出てこないため、補正電圧を加えなくてよいという特長がある。しかし、同じ積分時間でも測定時間が全電力型放射計と比べ半分になるため、温度分解能が悪くなるという欠点がある。

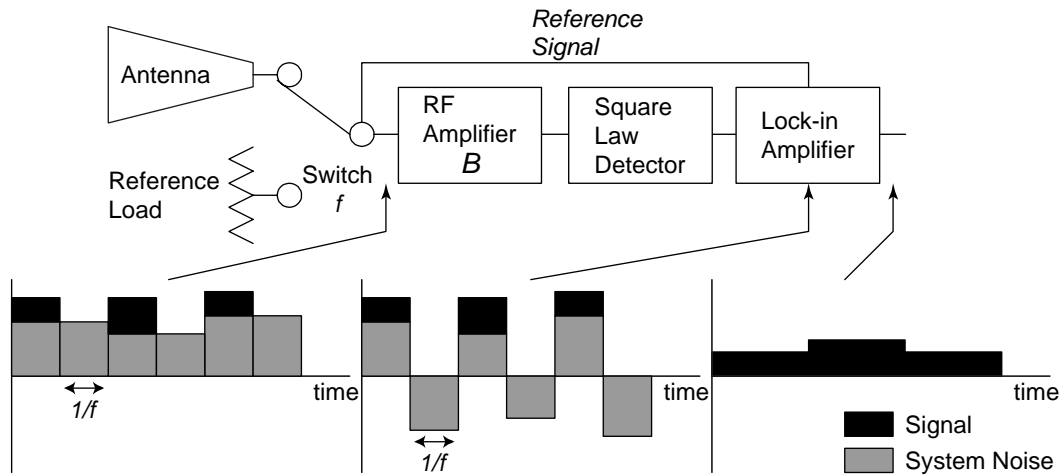


図 5.4 ディッケ型受信機

アンテナで受信される雑音温度を  $T_{out}$ 、受信機で発生する雑音温度を入力に換算したものを  $T_{in}$ 、受信機の利得を  $G_R$ 、帯域幅を  $B$ 、 $\tau_s$  をスイッチ切替えの 1 周期とすると、それぞれの時間における検波器出力電圧は次式で表せる。

$$\left. \begin{aligned} V_{ANT} &= kB G_R (T_{out} + T_{in}) \\ &= kB G_R T_{SA} \quad (0 \leq t < \tau_s / 2) \\ V_{REF} &= kB G_R (T_{ref} + T_{in}) \\ &= kB G_R T_{SR} \quad (\tau_s / 2 \leq t < \tau_s) \end{aligned} \right\} \quad (5.3)$$

ここで  $T_{SA}$ 、 $T_{SR}$  はそれぞれ  $T_{out} + T_{in}$ 、 $T_{ref} + T_{in}$  である。 $V_{ANT}$  はスイッチがアンテナを選択した時の出力、 $V_{REF}$  は参照負荷を選択したときの出力を表す。これら  $V_{ANT}$ 、 $V_{REF}$  にはバイアス誤差とランダム誤差が含まれる。バイアス誤差の要因は、受信機利得のドリフト、受信系の損失見積り誤差、検波器の二乗特性からのずれなどである。一方、ランダム誤差としては、観測すべき雑音電力の統計的変動、受信機利得の短期変動が主と考えられる。これらの出力を再び電圧合成し、低域通過フィルタを通して直流成分のみを抽出するとその出力電圧  $V_{UDK}$  は次式で表せる。

$$V_{UDK} = \frac{1}{2} kB G_R (T_{out} - T_{ref}) \quad (5.4)$$

この式から、不平衡ディッケ型放射計には、受信機雑音温度によるバイアス誤差がないことがわかる。

図 5.5 に試作した糖度計に使用したミリ波モジュールの写真を記す。

果物が放射するミリ波の強度は、糖度が変化することによって変化する。この変化は非常に微弱であるが、本装置を用いることで測定が可能である。果実の糖度測定を行うには、事前に検量線を作成しておく必要がある。測定したミリ波強度から検量線を利用することにより糖度を推定することができる。

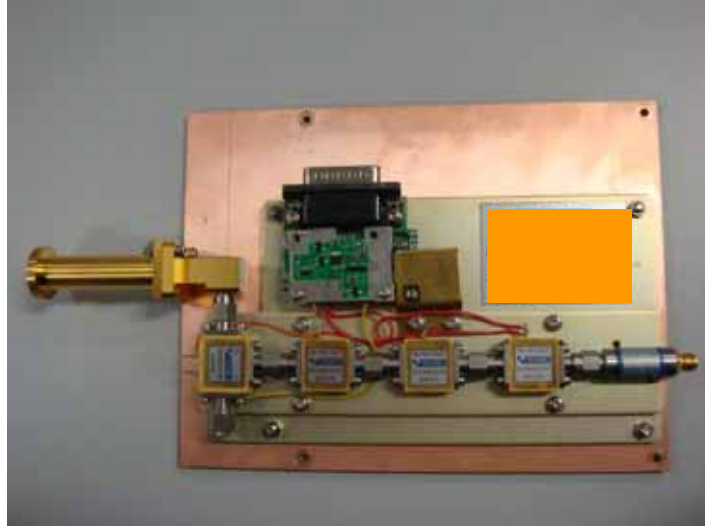


図 5.5 試作装置

5.2.3. 実測におけるシヨ糖濃度とミリ波強度の関係

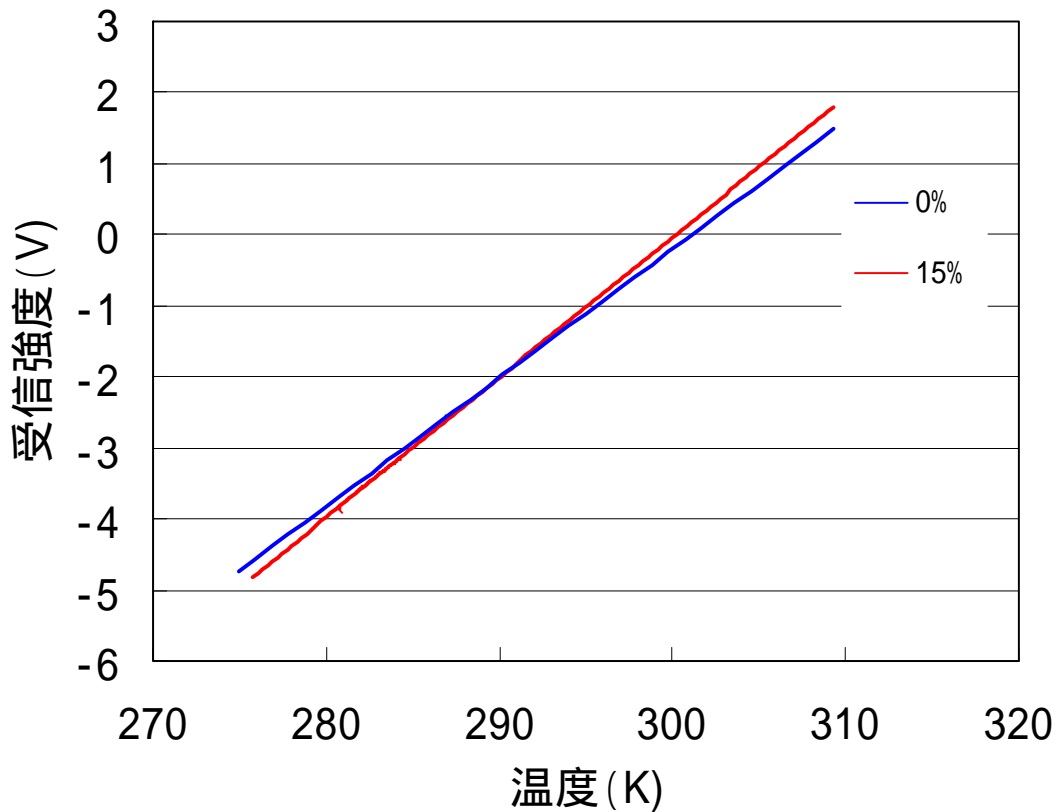


図 5.6 シヨ糖水溶液糖度とミリ波強度の関係

表 5.1 ではシヨ糖濃度が高くなると測定されるミリ波の強度が強くなることが予想された。しかし、実測による検証実験を進めた結果、シヨ糖水溶液糖度とミリ波強度の相関は、シヨ糖水溶液の温度と装置の温度により影響を受けることが分かった。

図 5.6 は、シヨ糖水溶液の濃度とミリ波強度の相関関係を解明するために、濃度の異なるシヨ糖水溶液のミリ波強度の温度特性を測定した結果である。この図からシヨ糖水溶液が低温の場合と高温の場合で相関が逆になることが分かった。

#### 5.2.4. 装置の調整

シヨ糖水溶液と同様に果物糖度とミリ波強度の相関は、果物の温度と装置の温度による影響を受ける。

本装置は、この特性が反転するポイントを装置の温度を調整することによって、変更することができる。反転する温度と果物の温度差を大きくすることが、測定精度を高めるために必要である。

- (1)ハウス内での測定の場合：果物が高温になっているため、装置設定温度を低くする。
- (2)冷凍果物の場合：果物が低温になっているため、装置設定温度を高くする。

#### 5.2.5. 果実の測定に必要なもの

- (1) ミリ波糖度計（試作機）
- (2) 検量線作成用果物
- (3) 果物冷却装置（冷蔵庫）
- (4) 破壊式糖度計（例 屈折式糖度計）
- (5) 測定用果物

#### 5.2.6. 検量線作成

糖度測定の前に検量線作成を行う。測定は 5.2.4 で設定した温度で行う必要がある。

- (1) 検量線作成用果物を冷却する。
- (2) ミリ波糖度計のセンサ部分に果物を接触させる。
- (3) 果物の温度が上昇していく過程の、ミリ波強度を記録する。
- (4) 同時にセンサに併設された温度計の出力を記録する。
- (5) 測定終了後の果物の糖度を化学分析や屈折式糖度計を使って測定する。
- (6) 以上のデータをメモリーに記録する。

図 5.7 に検量線を作成した結果の例を示す。

測定にはマンゴーを使用した。

## マンゴー検量線

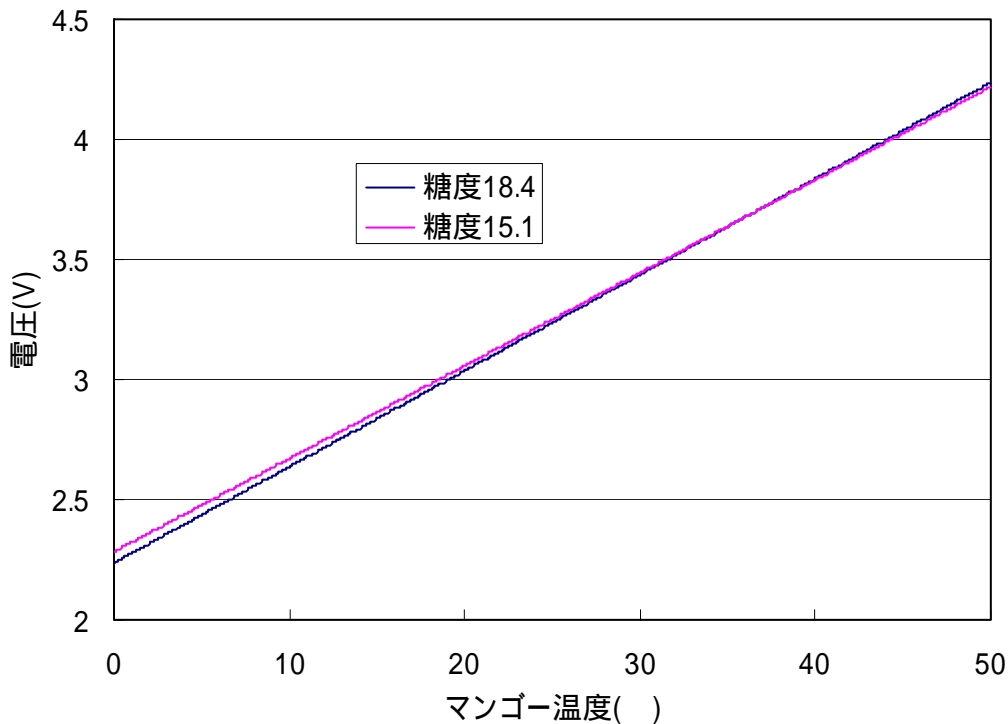


図 5.7 検量線作成例装置(設定温度：40 )

図 5.6 と図 5.7 とでは、縦軸電圧値のレンジが全く異なっているが、これは、参照負荷の設定温度が異なるためである。測定に際しては、検量線作成時と糖度測定時の設定温度を同じにする必要がある。

### 5.2.7. 実施例

図 5.7 で測定した検量線のパラメータを計算する。ミリ波を測定した結果から糖度を自動的に算出するように LabView で作成したプログラムに求めたパラメータを入力する。

次に糖度が未知の果実を測定プローブに接触させ、測定開始アイコンをクリックする。画面上に糖度が表示される。次に測定箇所をくりぬき、果汁を搾り、屈折式糖度計で糖度を測定する。

ミリ波糖度計による値と屈折式糖度計による値をグラフ化した結果を図 5.8 に示す。

測定の結果は、相関係数 0.9、標準誤差 0.5 程度であった。標準誤差が 0.5 であることから、測定したサンプルの 95%が  $\pm 1\%$  の範囲内に収まると考えられる。今までに調査した結果から、近赤外線方式の非破壊型糖度計も同程度の実力であることがわかっている。同一の果実においても、部位によって糖度が異なり、 $\pm 2\%$ 程度異なることもあるため、標準誤差は 0.5 程度であれば、問題ないと考えられる。現場の担当者の意見からも、この程度の測定精度であれば、実用上特に問題ないと考えられる。

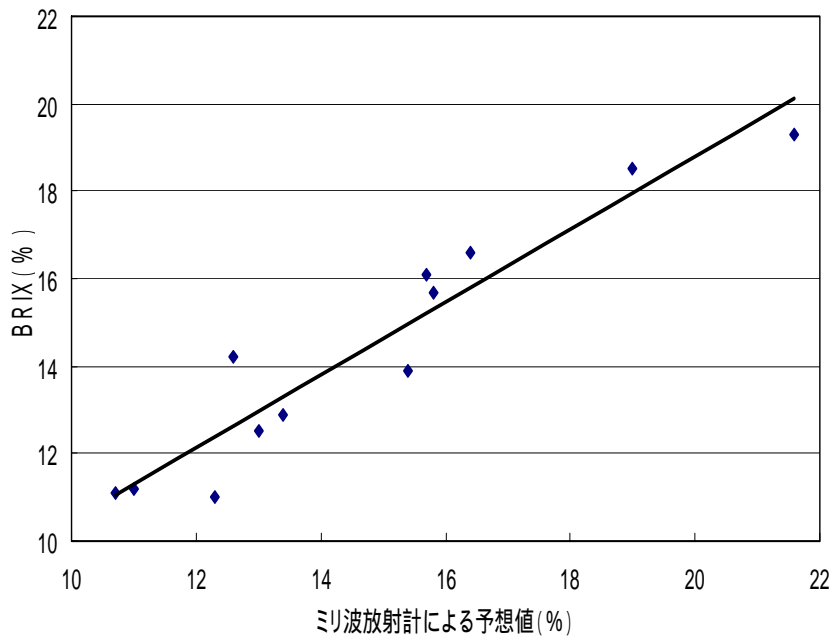


図 5.8 糖度測定結果

### 5.3. アクティブ方式非破壊検査方法

果実の糖度計測においては、パッシブ方式ミリ波計測技術を用いたミリ波放射計にて、非破壊での計測が可能であることが示された。しかし、放射率の低い材料については、物質内部から放射されるミリ波が微弱すぎて、精度良く計測ができない可能性がある。このような物質に対しては、ミリ波発信器を用いて、発信器から放射されるミリ波を測定したい物質にあて、その透過ミリ波あるいは反射ミリ波を計測する手法(アクティブ方式ミリ波計測)により、物質内部の情報をよりよく捉えることが可能となり、パッシブ方式より精度良く測定できることが想定される。

しかし、実際に測定対象物の種類によって、パッシブ方式あるいはアクティブ方式のいずれを選ぶかは、その計測原理が異なるため、そのつど実験により確かめる必要がある。

本節では、農林畜産物などの品質評価に必要なアクティブ方式ミリ波計測技術に関して基本原理等をまとめた。

#### 5.3.1. アクティブ方式ミリ波計測の特徴

アクティブ方式においては、ミリ波発信器から放射されるミリ波を測定試料に当てて計測を行うが、一般的にこの領域の電波は、赤外線、可視光線などに比べて波長が長いので、物質内部により深く浸透する可能性が高い。一方、ミリ波よりもさらに波長の長いものとして、図 5.1 で示したようにマイクロ波、短波などの電波があるが、ミリ波はこれら電波と比べて、物質内部への浸透度が低いものの、波長が短いので、空間分解能がよく、高精度計測、装置の小型化が可能である。

また、X線、ガンマ線などを用いた装置と比べると、人体への影響が少なく、取り扱いやすいという特徴がある。



さらに、非破壊検査装置としては超音波を用いたものもあるが、当該装置は、接触式が原則である。ミリ波による装置は非接触での計測が可能であるため、接触により傷が付きやすいものなどの検査に有効である。

### 5.3.2. アクティブ方式ミリ波計測の原理

#### 1) 基本原理

ミリ波程度の波長の電波は、物質内部の誘電率の不連続面で反射するという性質がある。例えば、図5.9のように誘電率が異なる物質の中に、水分、空洞や腐れなどの異質部分があった場合を考える。当該部分にミリ波を当てた場合、表面で反射する、物質そのものに吸収される、異質部分との境界で反射するといった様々な過程が考えられる。したがって、異質部分がある部分とそうでない部分とで、ミリ波を当てた場合に、その透過量及び反射量に差異が現れる。特に、異質部分とそうでない部分とで、誘電率の差が大きい場合に、その差が顕著に現れることとなる。

この性質を用いて、異質部分とそうでない部分との比較測定を行ったり、基準試料との比較測定を行うことにより、物質の内部状態に対する情報を得ることが可能となる。

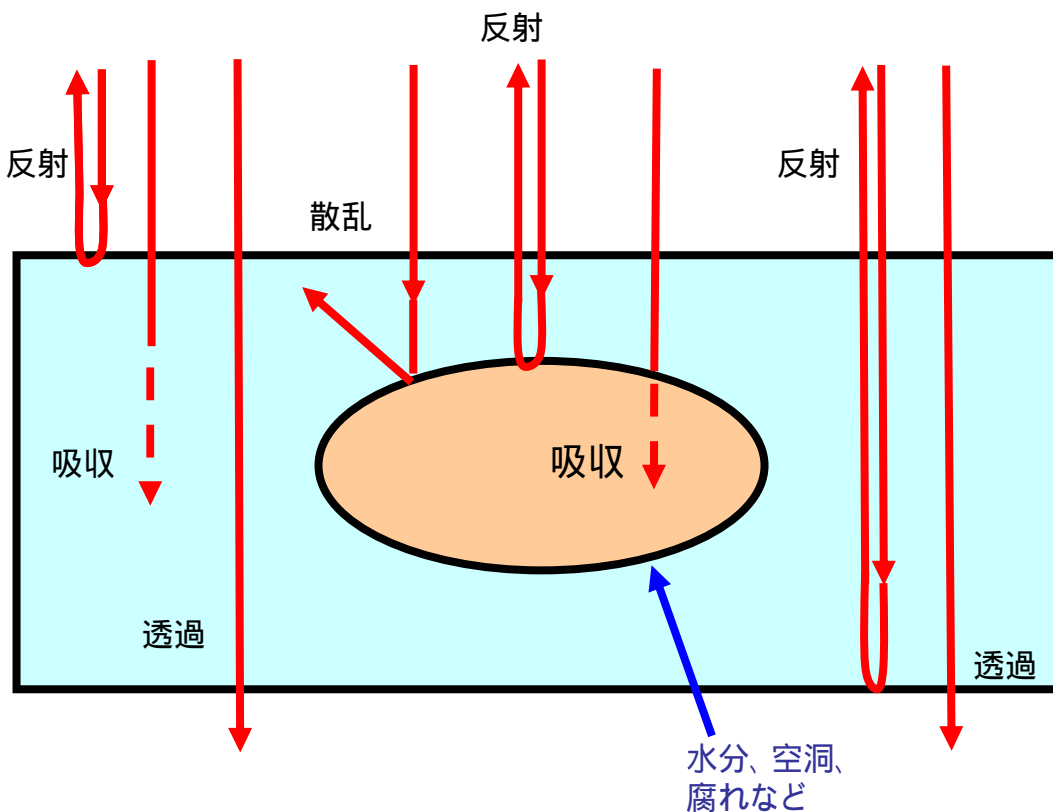


図 5.9 物質に対するミリ波の挙動

#### 2) 透過型ミリ波計測システム

アクティブ方式で非破壊検査を行おうとした場合、ミリ波を当ててその透過量を見る場合

(以下、「透過型」と呼ぶ。)と反射量を計測する場合(以下、「反射型」と呼ぶ。)とがある。

透過型と反射型のいずれが適しているかは、測定対象物によって、実験等により確認を行い、選択する必要がある。

今回構築した透過型のアクティブ方式ミリ波計測システムを図 5.10 に示す。発信器側の装置と受信器側の装置を測定試料を挟んで対向に置く。発信器側にはガンダイオードなどのミリ波発信器を置き、その発するミリ波を測定試料に当てる。受信機側には、パッシブ方式と同じディック型のミリ波受信システムを置き、測定試料を透過してきたミリ波を受信する。当該ミリ波受信システムは、前述のように、受信ミリ波強度の微妙な変化が測定可能であるため、透過量の微妙な差を捉えることができる。また、厚みがあるなどの理由により、透過量が極端に少ない測定試料についても、計測が可能である。

このシステムでは、基準試料をあらかじめ用意することで、測定試料との比較により、質の違いを確認可能である。

また、同一測定試料内で、数ポイント比較測定を行うことにより、異質部分の位置を発見するといった使い方も可能である。

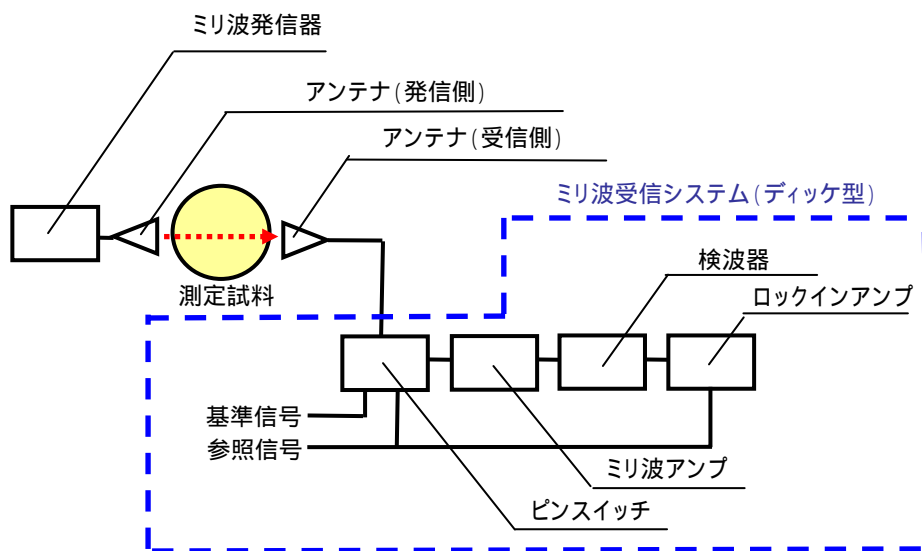


図 5.10 アクティブ方式ミリ波計測システムのブロック図

### 5.3.3. アクティブ方式ミリ波イメージングシステム

図 5.10 で示したシステムを用いて、図 5.11 のように測定試料を 2 軸自動ステージに搭載し、2 次元的にスキャンさせることにより、イメージング(可視化)画像を得ることが可能となる。これにより、例えば、異質部分の形状などを計測することができる。

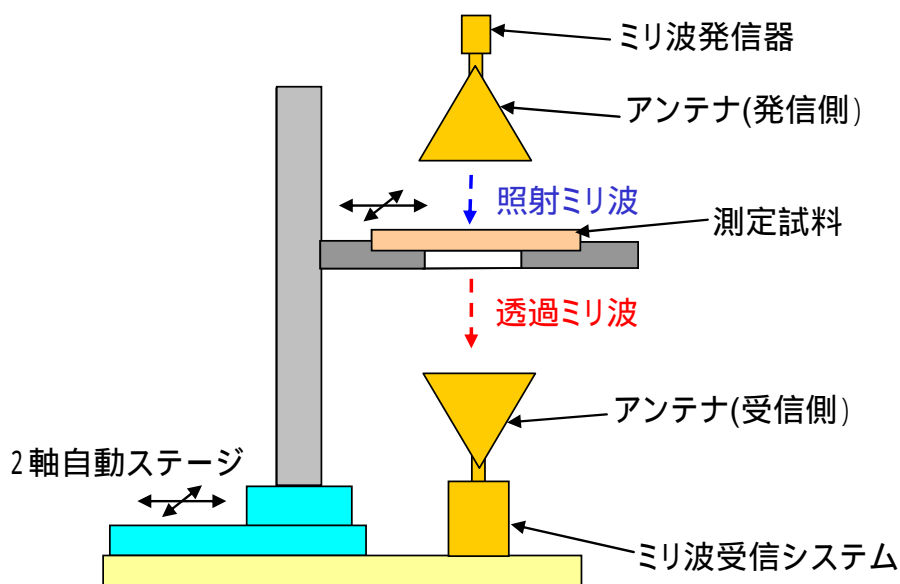


図 5.11 アクティブ方式ミリ波イメージングシステム

#### 5.3.4. アクティブ方式ミリ波イメージングシステムによる計測原理確認実験

アクティブ方式ミリ波計測技術についての計測原理を確認するために、前述図5.11のイメージングシステムを用いて、比較的均質な材料のナイロン樹脂（白色・不透明）を測定試料として、イメージング実験を行った。図 5.12 に示した実験は、空洞を想定し、ナイロン樹脂（厚み 10mm）の側面から穴（約 5mm、深さ約 30mm）をあけ、上面からミリ波を当ててイメージング（可視化）したものである。

この実験の際に、ミリ波発信器には周波数 35GHz（波長約 8.7mm）の単波長ガンダイオードを用いた。また、発信側及び受信側のアンテナとして、レンズアンテナ（両凸レンズ）を用いた。発信側、受信側双方において、このレンズアンテナの焦点位置が測定試料の厚み方向に対して概ね中心となるように配置し、実験を行った。なお、測定試料をスキャンするピッチは 2.5mm とした。

図 5.12 に示したイメージング結果により、空洞部分の形状が概ね可視化できていることがわかる。この実験により、可視光が透過しない不透明な物質においても内部の空洞などの異質な部分がある程度可視化できることがわかり、アクティブ方式ミリ波計測技術の有効性が確認できた。

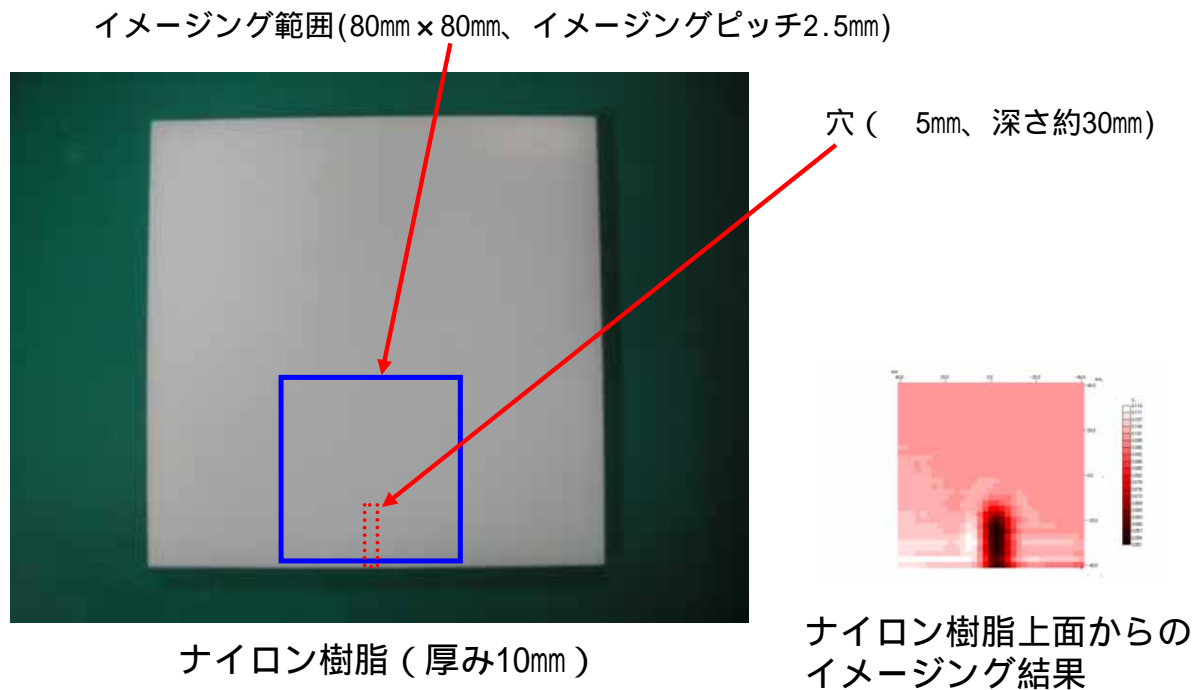


図 5.12 イメージング実験例 (ナイロン樹脂の空洞)

#### 5.4. おわりに

パッシブ方式による糖度測定装置を構築し、その測定原理、操作方法等についてのマニュアルを作成した。また、農林畜産物などの品質評価に必要なアクティブ方式ミリ波計測システムを構築し、基本原理等についてのマニュアルを作成した。

パッシブ方式の果実糖度計は実用化に向けての開発が進んでおり、高精度測定のためのマニュアルを来年度も継続して作成していく。

アクティブ方式については、来年度は、測定精度向上を図りながら、農林畜産物などの各種ターゲットで実験を行い、応用展開の可能性を見極めた上で、可能性の大きなものについて、その評価手法等の詳細なマニュアルを作成する予定である。