

蛍光指紋



つた・みずき
 東京大学大学院農学生命科学研究科博士課程修了。
 (独)農研機構食品総合研究所主任研究員，日本学術振興会海外特別研究員を経て，現在，(国研)農研機構食品研究部門上級研究員。博士（農学）

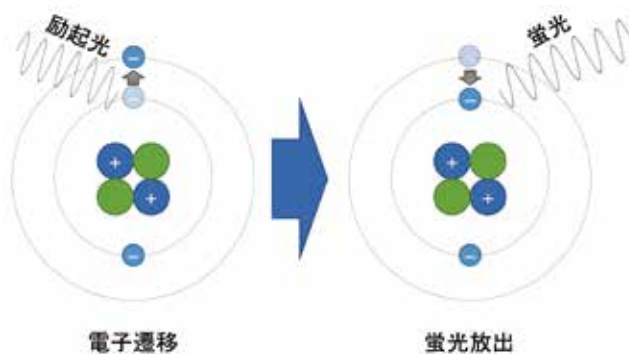
蔦 瑞樹

●1. はじめに●

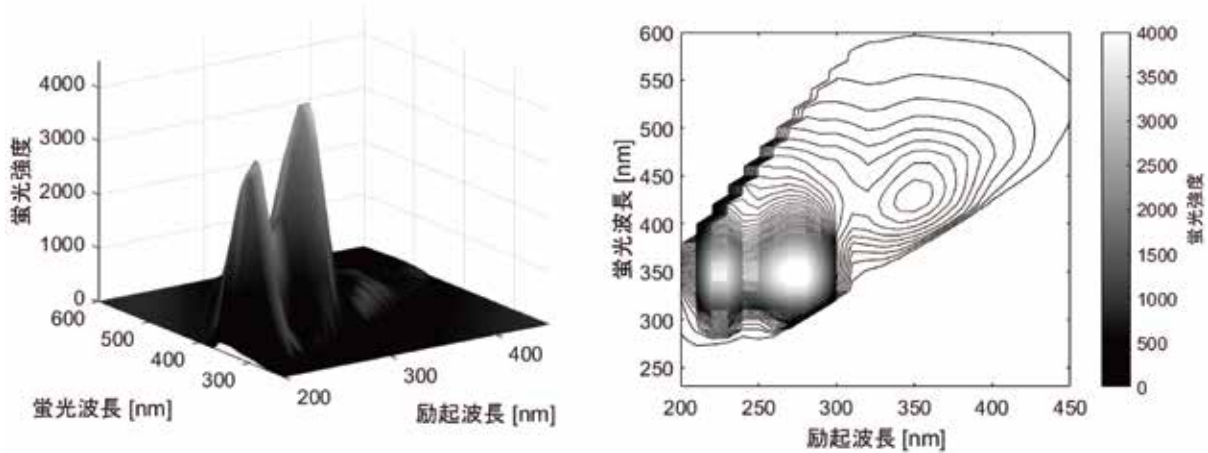
海外で買い物をする際に、渡した紙幣を店員が何やら青白い照明にかざして調べることもある。様々な国の紙幣には蛍光塗料で隠された模様が印刷されており、紫外線を照射するとその模様が青やオレンジ色で浮き上がって目に見えるようになる。そのため、模様が見えれば本物，見えなければ偽札と判定できる。また，2008年にノーベル化学賞を受賞した下村博士の研究テーマは緑色蛍光タンパク質（GFP）で，GFPは紫外や青色の光を当てると緑色の蛍光を発する。このように，ある物質に光を照射した際に，別の色の光を発する現象を蛍光，照射された光を励起光と呼ぶ。物質中の電子は，通常は基底状態と呼ばれる最もエネ

ルギーが低い電子軌道に存在している。これが励起光のエネルギーを吸収すると，第1図に示すようによりエネルギー準位の高い軌道に遷移する（電子遷移）。電子が熱などの形で若干のエネルギーを失った後，基底状態に戻る際に光の形でエネルギーを放出すると，これが蛍光となる。通常，蛍光のエネルギーは励起光よりも小さいため，蛍光の波長は励起光よりも長くなる。電子遷移から蛍光放出までの時間は 10^{-8} 秒程度と極めて短いため，ヒトの目には励起光を当てている間だけ蛍光が発せられているように見える。なお，蓄光塗料のように励起光を当てなくとも光が発せられる現象をりん光と呼ぶが，本稿では紹介しない。

励起光と蛍光の波長が異なるため，一般的に蛍光分析は可視 - 近赤外分光分析などの吸光法に比べて感度が高い¹⁾。吸光法が試料による光の吸収を検出するのにに対し，蛍光分析ではもともと存在しなかった蛍光波長で発せられる光の増加分を検出するためである。例えば，明るいランプに向けて薄い色ガラスをかざしても暗くなったことはなかなか判定しづらいが，暗闇の中では微弱なホタルの光を容易に見つけられることをイメージすると，理解しやすいかもしれない。一方で，蛍光を発するのは一般的には共役系という構造を持つ分子であるため，蛍光分析の対象となる物質は限定される。したがって，目的に応じて用いる分光法



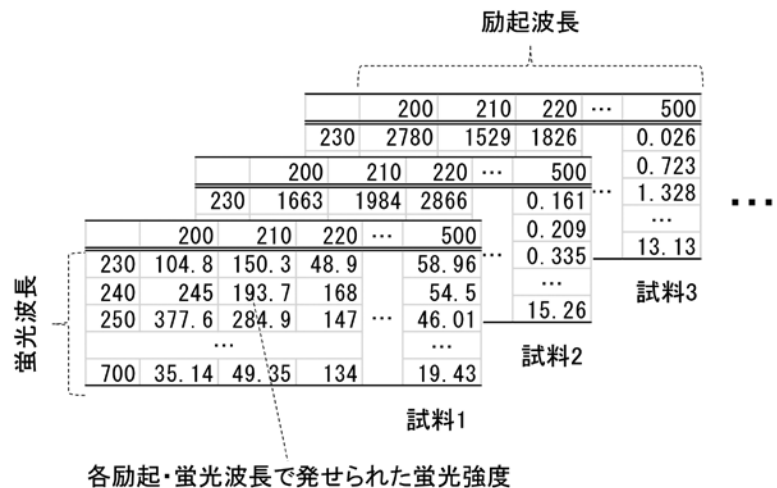
第1図 電子遷移と蛍光放出の模式図
 (カラー写真をHPに掲載C045)



第2図 蛍光指紋 (左) とその鳥瞰図 (右) (カラー写真をHPに掲載C046)

を選択することが重要と考えられる。

さて、冒頭で紹介した蛍光の事例では、励起光（紫外線や青色）と蛍光（青、オレンジあるいは緑）の組み合わせが一对一であった。この方法は、発せられる蛍光の波長や、効率よく蛍光を励起できる波長があらかじめ分かっている場合には有効である。一方、食品のように多様な成分が混在し、蛍光が発せられるかどうか、発せられるとしたらどのような励起・蛍光波長条件下で観察できるか分からない場合は、励起・蛍光波長を網羅的に走査しながら、それぞれの波長条件下で発せられる蛍光の強度を観察する手法が有効となる。このようにして得られた情報は、第2図左に示すような励起波長、蛍光波長、蛍光強度からなる3次元データとして示すことができ、鳥瞰図として見ると等高線状のパターンが確認できる(第2図右)。この等高線パターンは、人間の指紋のように対象の含有成分やその量によって固有であり、等高線パターンから対象の品質を推定することも可能である。そのため、筆者らはこのデータを「蛍光指紋」と呼び、香辛料中のアフラ



第3図 蛍光指紋を記録した行列データ

トキシン濃度推定²⁾、トマトジュースの官能評価値推定³⁾、多様な泡盛の識別⁴⁾など、様々な青果物・食品の品質評価に応用してきた。本稿では蛍光指紋の持つ特徴や、その解析方法、そして応用事例について紹介する。なお、蛍光指紋は学術分野では excitation emission matrix (EEM) と呼ばれることも多く、文献検索を行う際はこちらもキーワードにすることをお勧めする。

● 2. 蛍光指紋データの解析法 ●

第3図に示すように、蛍光指紋は行方向に蛍光波長、列方向に励起波長、各セルにそれぞれの励

		波長条件					
試料情報	励起波長 [nm]	200	200	200	...	500	500
	蛍光波長 [nm]	230	240	250	...	690	700
	試料 1	2303	664	847	...	4343	3774
	試料 2	3400	2341	3172	...	4812	3748
	試料 3	2139	2478	1555	...	2362	1181
...	

第4図 2次元に展開した蛍光指紋データ

起・蛍光波長で発せられた蛍光強度が記録された行列データとして取得できる。表計算ソフトでは、1シートに1試料のデータが格納されたファイルとして取り扱うことが多い。しかし、生の蛍光指紋データには散乱光や蛍光が発せられない波長領域の情報も含まれている。また、全ての試料のデータを1つのシートにまとめた形式でないと、一般的なデータ解析手法は適用できない。そこで、蛍光指紋データを解析する前に、(1) 不要な情報の削除と、(2) 2次元データへの展開を行う。(1)では蛍光波長が励起波長より短くなる領域と、蛍光波長が励起波長の整数倍になる領域のデータを0に置き換える。(2)では、励起波長200 nmで得られた蛍光スペクトルの後に励起波長210 nmの蛍光スペクトルをつなげる、という要領で1試料のデータを1列に並び替える。これらの前処理を行うと、第4図に示すように行方向に試料情報、列方向に励起・蛍光波長条件の情報が配置された行列が得られる。この形状であれば、近赤外分光法など他の分光法に適用されているデータ解析法を適用することができる。

蛍光指紋や近赤外分光スペクトルのように、試料点数、変数(波長条件数)ともに多くなりがちな

第1表 多変量解析で用いられる手法

分類	手法	用途例
教師なし・定性	主成分分析 クラスタ分析	マンゴースの蛍光指紋の産地による違いの把握
教師あり・定性	PLS 判別分析 SIMCA 決定木	マンゴースの産地分析
教師あり・定量	重回帰分析 PLS 回帰分析 回帰木	牛肉表面上の一般生菌数推定

データの解析には、第1表に示すような多変量解析(データマイニング、統計解析とも呼ぶ)の様々な手法が用いられる。「教師なし」の手法はデータそのものに内在されるパターン(蛍光指紋の産地による違いなど)を把握したい場合に用い、「教師あり」は試料の蛍光指紋や近赤外分光スペクトルから品質指標を推定したい場合に用いる。この場合、蛍光指紋や近赤外分光スペクトルを説明変数、推定したい品質指標を目的変数と呼ぶ。「定性」は産地や等級などの質的な指標、「定量」は特性成分の含量などの定量的な指標を推定する場合に用いる。本稿では、教師なし・定性分析の代表として「主成分分析」、教師あり・定性分析の代表として partial least squares (PLS) 判別分析、教師あり・定量分析の代表として PLS 回帰分析を蛍光指紋に適用した事例を紹介する。なお、蛍光指紋の解析には上記(1)(2)の前処理を施してから専用の統計解析ソフトを用いるか、前処理の機能を兼ね備えたソフトを用いる必要がある。後者の例として、フリーの統計解析ソフトウェアRのパッケージである「EEM⁵⁾」や、Eigenvector社の「PLS_toolbox⁶⁾」が挙げられる。以下、蛍光指紋データに多変量解析を適用した事例を紹介する。

● 3. 応用事例1 マンゴースの産地判別⁷⁾ ●

3-1) 研究の背景

近年、青果物の高付加価値化、ブランド化を進める動きが活発化している。中でも、マンゴースは宮崎県の「太陽のタマゴ」に代表されるように、産地毎の

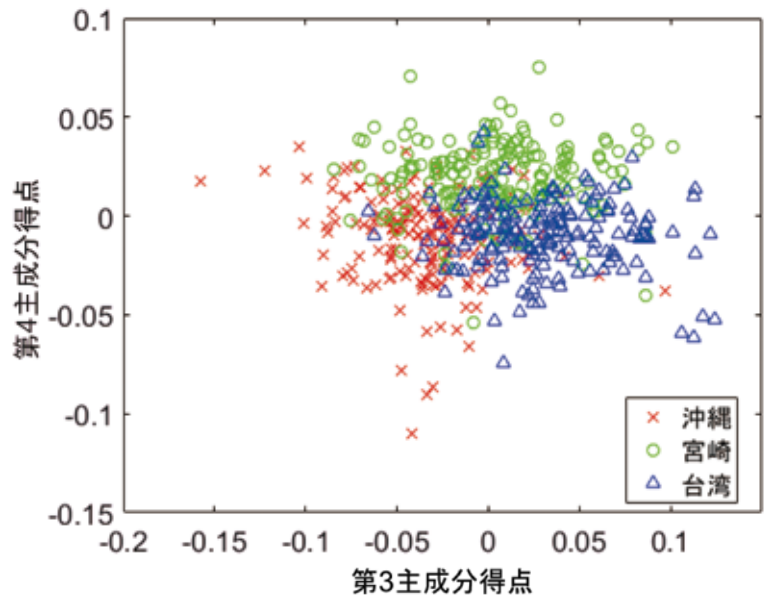
ブランド化が進み、付加価値も高い青果物の代表格である。各産地ではブランド保護のため、包装箱や果実にラベルを貼る、あるいはスタンプを押すといった工夫をこらしている。しかし、ラベルやスタンプの模倣による産地偽装のリスクはゼロとは言えない。そのため、果実そのものの性質に基づく産地判別技術が求められている。現在利用可能な産地判別手法には、安定同位体比分析、微量元素組成分析などがあるが、いずれも高額な装置が必要で、分析には手間と時間がかかる。また、試料から果肉を切り出した後前処理を施すため、流通過程での検査には向かないという課題もある。そこで本研究では、蛍光指紋による簡易かつ迅速なマンゴーの産地判別手法の開発を試みた。

3-2) 実験方法

市場に幅広く流通しているアーウィン種（いわゆるアップルマンゴー）を対象とし、2010年、2011年に宮崎産、沖縄産、台湾産を各90点ずつ入手した。赤道部の2カ所から果皮ごと果肉をくり抜き、粉体測定用の石英セルに封入した。この際、果皮側が石英窓に密着するようにした。試料を封入した石英セルを分光蛍光光度計（日立ハイテクノロジー製 F-7000）の試料室にセットし、励起・蛍光波長範囲200-900 nm、波長間隔10 nm の条件で蛍光指紋を測定した。蛍光指紋には励起光の散乱光や、蛍光が発せられない励起波長が蛍光波長より長い領域の情報も含まれているため、これらの不要なデータを削除した。その結果得られた540点 × 1115波長条件のデータに対し、（1）主成分分析と（2）産地を目的変数としたPLS判別分析を実施した。

3-3) 実験結果

第5図に主成分分析の結果得られたスコアプロ



第5図 主成分分析の結果得られたスコアプロット
(カラー写真をHPに掲載C047)

ットを示す。スコアプロットは多次元空間上における試料のばらつきを可視化するために用いられる。第5図の場合は、1115波長条件のデータを数次元の主成分に圧縮し、そのうち第3、4主成分の情報を可視化している。宮崎産は第4主成分得点が高い、沖縄産は第3、4主成分得点がともに小さいといった傾向があり、産地毎に蛍光指紋パターンが異なる可能性が示唆された。しかし、産地毎に明確なクラスターは形成されておらず、このままでは産地判別に応用するのは困難と考えられた。一方、第2表にPLS判別の結果得られた混同行列を示す。混同行列は列方向に実際の産地、行方向に予測された産地を配置し（行と列が逆の場合もある）、それぞれの実際と予測結果の組み合わせに対応する試料の数を各セルに入力し

第2表 マンゴー産地判別の混同行列

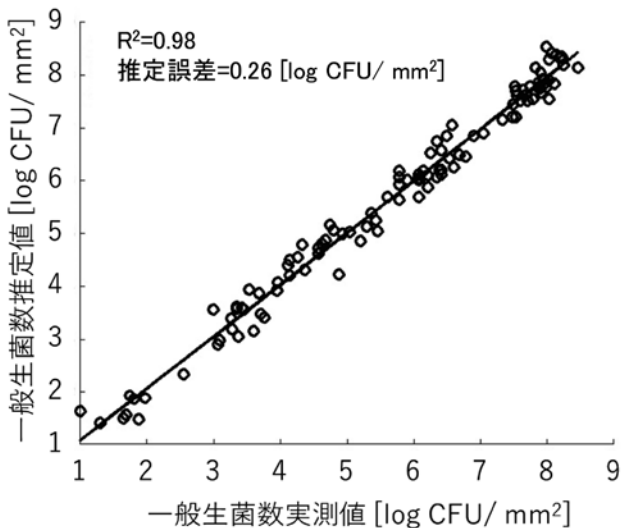
		実際の産地		
		宮崎	沖縄	台湾
予測産地	宮崎	168	7	5
	沖縄	7	172	5
	台湾	5	5	170
誤判別率 (%)		7.14	6.98	5.88

たものである。実際と予測結果が一致する試料の数は対角線上に並び、それ以外の部分は予測を誤った試料の数を示す。第2表の場合、予測を誤った割合（誤判別率）は平均で約7%であった。この結果は果皮の蛍光指紋に基づいているため、マンゴの果肉を切り出さず、そのまま果皮の蛍光指紋を測定してその産地を予測する技術の開発が期待される。

● 4. 応用事例2 牛肉表面上の一般生菌数推定⁸⁾ ●

4-1) 研究の背景

食肉加工場では衛生管理の指標の1つとして一般生菌数が用いられることが多い。例えば、一般生菌数が高くなってきた場合は、加工ラインのどこかで汚染が生じている可能性が示唆される。また、生食用とするか、加熱専用として販売するかの判断基準の1つに、一般生菌数が用いられる場合もある。しかし、コロニーカウントによる一般生菌数測定には試料の培養に48時間を要するため、万が一汚染が生じた場合の対処が遅れる可能性がある。そこで本研究では、分光蛍光光度計を用いて牛肉表面の蛍光指紋を測定し、そのデータを元に一般生菌数を推定する手法の開発を試みた。



第6図 PLS回帰分析による牛肉表面上の一般生菌数推定結果

4-2) 実験方法

茨城県つくば市の肉屋でおよそ50 × 50 × 8 mmにカットした国産牛肉を入手した。試料をシャーレに1枚ずつ入れた後、15°Cに設定した恒温器で保管した。12時間毎に一部の試料を取り出し、後述する蛍光指紋測定と培養法による一般生菌数測定に供試した。実験は保管開始から72時間後まで実施し、計24枚の試料を測定した。

分光蛍光光度計（日立ハイテクノロジー製F-7000）に光ファイバーオプション（同社製5J0-0114-F-7000）を装着し、試料表面から5 mm離れた位置で蛍光指紋を測定した。これにより、試料を非破壊で、かつ試料に非接触で蛍光指紋の測定が可能となる。試料と器具や設備の交差汚染が起こりうる食品加工現場では、このような非接触測定が望ましいと考えられる。蛍光指紋の測定条件は励起波長範囲200-500 nm、蛍光波長範囲200-900 nm、波長間隔5 nmであった。試料あたり9点の蛍光指紋を測定し、同じ位置を綿棒でこすり取り、培養法による一般生菌数測定に用いた。合計で216点の蛍光指紋と一般生菌数のデータが得られ、前者を説明変数、後者を目的変数としたPLS回帰分析を実施した。

4-3) 実験結果

一般生菌数は試料や測定ポイントによって異なり、実験開始直後の1-5 log colony forming unit (CFU) / mm²から、実験終了時の6-8 log CFU / mm²まで大きなばらつきがあった。第6図に横軸に一般生菌数の実測値、縦軸にPLS回帰分析による一般生菌数の推定値をとった検量線を示す。蛍光指紋のPLS回帰分析により、決定係数0.95以上かつ推定誤差1桁を切る高い精度で一般生菌数を推定可能なことが明らかとなった。細菌が増殖する際に、食肉上のトリプトファンを栄養源とすることが知られている。また、細菌の体内にはNAD (P) Hやポルフィリンといった物質が存在し、これらは自家蛍光を持つ。トリプトファンも強い蛍光を発することから、生菌数

とこれらの成分が発する蛍光の強度に相関があり、蛍光指紋を用いて生菌数を推定する検量性が構築できたと考えられた。以上のことから、食肉加工現場で、簡易、迅速かつ非接触で一般生菌数を推定できる可能性が示唆された。

● 5. おわりに ●

本稿では、蛍光指紋の概要、解析方法と応用事例を紹介した。紙面の都合上、蛍光が生じる原理など、かなり単純化した説明も多く、正確な理解のためには専門書^{9) 10) 1)}を参考にされたい。また、可視-近赤外分光法などと同様に、蛍光指紋も多変量解析のモデルを通じて「間接的」に対象の

品質を推定することが多い。このようなモデルは、モデル構築の際に用いたデータの特性によって変わるため、別のデータセットへの適用可能を確認する必要がある。例えば、本稿で紹介したマンゴアの産地判別に関しては、年度の異なる試料に対しても同様の判別精度が達成できるかどうか、検証することが望ましい。多変量解析の方法や注意点は近赤外分光法と共通する部分が多いので、興味のある読者は毎年11月に開催されている近赤外フォーラム¹¹⁾や、定期的に農研機構食品研究部門で開催されている近赤外講習会¹²⁾に参加することをお勧めする。

参 考 文 献

- 1) Lakowicz, J.R. (2013). Principles of Fluorescence Spectroscopy. Springer US.
- 2) Fujita, K., Sugiyama, J., Tsuta, M., Shibata, M., Kokawa, M. and SAGAWA, T. (2013). Detection of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in nutmeg extract using fluorescence fingerprint. *Food Science and Technology Research*, **19**, 539-545.
- 3) Trivittayasil, V., Tsuta, M., Imamura, Y., Sato, T., Otagiri, Y., Obata, A., et al. (2016). Fluorescence fingerprint as an instrumental assessment of the sensory quality of tomato juices. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **96**, 1167-1174.
- 4) 蔦瑞樹, 相山怜子, 塚原正俊, 塚原恵子, 平良英三 泡盛の蛍光指紋と品質特性に関する基礎的検討. 日本食科学工学会誌 (accepted).
- 5) Trivittayasil, V. (2016). EEM: Read and Preprocess Fluorescence Excitation-Emission Matrix (EEM) Data. R package version 1.1.1. 2016. <https://cran.r-project.org/package=EEM>.
- 6) Eigenvector Research, I. (2017). PLS_toolbox. 2017.
- 7) 中村結花子, 藤田かおり, 杉山純一, 蔦瑞樹, 柴田真理朗, 吉村正俊ほか (2012). 蛍光指紋計測によるマゴアの産地判別. 日本食品科学工学会誌, **59**, 387-393.
- 8) Mita Mala, D., Yoshimura, M., Kawasaki, S., Tsuta, M., Kokawa, M., Trivittayasil, V., et al. (2016). Fiber optics fluorescence fingerprint measurement for aerobic plate count prediction on sliced beef surface. *LWT - Food Science and Technology*, **68**, 14-20.
- 9) 田村善蔵, 太幡利一, 保田和雄 (1974). けい光分析. 講談社.
- 10) 西川泰治, 平木敬三 (1984). 蛍光・りん光分析法. 共立出版.
- 11) 近赤外研究会. <http://jcnirs.org/>
- 12) 農研機構 イベントカレンダーのイベント・セミナー一覧 | 農研機構. <http://www.naro.affrc.go.jp/event/list/calender/index.html>