

分光画像計測技術による  
食品検査・評価手法に関する研究

2013 年 1 月

博士 (工学)

小 林 健 一  
豊橋技術科学大学



# 分光画像計測技術による食品検査・評価手法に関する研究

## 論文要旨

我々は視覚を通して、対象の大きさ、形状、距離や動きに加え、分光情報を色として知覚することで、対象の様々な性質に関する情報を得ている。しかし、我々の視覚系で捉えることが出来るのは、380 ~ 780 nm の波長範囲にある可視光に限られる。さらに、無限次元である連続したスペクトル情報は、網膜上の L、M、S 錐体によって僅か 3 次元の情報にまで圧縮した上で知覚されており、波長分解能には大きな制限がある。

一方、いわゆる分光計測ではこのような制限を受けない。今日では、様々な波長帯に感度を持つ撮像素子と、数 nm 単位の波長分解能を持つ分光デバイスを用いた分光画像計測により、ヒトの視覚能力をはるかに超越した、膨大な情報を得ることが可能となっている。分光画像計測手法では、非破壊・非接触での計測が可能であり、含有する成分等の化学的な情報が瞬時に得られること、その分布状態を可視化できることなど、他の分析法には無い数多くの利点がある。こういった利点を活かし、特に非破壊計測やリモートセンシングの分野では、他に代替手法の無い強力なツールとして、広く研究が行われている。

しかしながら、分光画像計測法を実応用する上では、いくつかの問題点がある。第一に分光デバイスが高コストである点、第二に波長方向の走査が必要なため、計測時間が長い点、第三にデータ量が膨大であり、計算資源を大量に消費する点が挙げられる。

本論文では、これらの問題を解決するアプローチとして、LED 光源の分光特性を利用する手法と、透過特性を設計した光学フィルタを用いる手法を提案する。いずれも分光情報を用いることで、抽出したい情報に特化した計測システムの特長 (LED 光源/光学フィルタの透過特性) を選択/設計するものである。本手法は、分光計測で得られた数百次元の分光情報の圧縮・次元削減を、LED や光学フィルタなどのハードウェアによって実装することに相当する。従って、システムの設計段階では分光計測を必要とするものの、設計したシステムを利用する段階では、高コストな分光デバイスは不要となり、同時に、計測時間や計算資源の問題も解消する。

本論文では、食品の安全や品質の評価に関わる分野への応用を例として、微生物の迅速検出と、牛肉の品質上重要な含有成分である、脂肪と脂肪酸の分布可視化を具体的なターゲットに据え、実用を強く意識した計測・解析手法の開発を行った。また、実用時の使用状況に近い計測システムを試作し、実計測を行うことで、提案手法の実用性と有用性を示した。本論文では、膨大な分光情報をベースに、シンプルで実用的な計測システムを具現化した実例を示したが、同様のアプローチは、波長帯を問わず、分光画像計測手法が有効なあらゆる応用分野への適用が可能と考える。本研究がこれまでの研究用途から実用技術への橋渡しを行い、応用用途を拡大することで、今後の計測技術の発展に大いに寄与できるものと期待する。





# Spectral Imaging Technique for Inspection and Quality Evaluation of Food

When we see an object through our vision, we can recognize the size, shape, distance or motion but also the various properties from its color. The color reflects the spectral distribution about the object. However, there are some limitations on wavelength range and resolution of wavelength in human vision. The “visible wavelengths” of the electromagnetic spectrum is limited to about 380 to 780 nm, and a color is perceived from only three dimensional signals, which is compressed from spectra of infinite dimensional signals by three types of color sensors (L, M, S cones) on our retina.

In contrast, there are no such limitations on hyperspectral imaging. Nowadays, by using an imaging detector suitable for the targeted wavelength range, and a spectroscopic device with capability to select and scan a transparent wavelength electrically with a few nano-meters resolution, it is possible to acquire vast amounts of information beyond the human vision. The imaging technique is called “hyper-spectral imaging (HSI)”. There are many unique advantages of HSI method: it is non-destructive, contactless, and easy to use; it can obtain chemical information instantly with no pre-treatment, and visualize its spatial distribution. It is an essential and powerful tool especially for the field of non-destructive inspection or remote sensing.

However, there are some barriers for practical application of HSI: the high-cost of spectroscopic device, the long measurement time due to the wavelength scanning and the large consumption of computational resources come from large numbers of images. This thesis describes information extraction methods by utilizing the hyper-spectral imaging data, and aims to apply it to the food-related field. In this thesis, two approaches to solve above problems are proposed.

As the first application for evaluation of food safety, a method for the rapid detection of microorganism is developed. First, by using the hyper-spectral imaging, it was shown that colonies with diameters of 100 and 300  $\mu\text{m}$  could be detected and identified, respectively. This method has advantages that it can identify a number of different types of microorganism at a time. It enables us to skip the pure culture phase, which needs long time. However, this method needs hyper-spectral measurement. Thus, next, a simple measurement system using spectral distribution of LED light sources was proposed. On the basis of spectroscopic properties of the colony, medium, and LEDs, an optimal combination of two LED illumina-

tions was selected to maximize the contrast between the colony and medium areas. Then, a time course imaging system was developed using a compact incubator with the two selected LEDs. The time-course changes of *Alicyclobacillus acidocaldarius* and *Escherichia coli* at two different dilution levels were monitored using the system. From the results, a similar growth rate was estimated amongst the same species of microbes, regardless of the dilution level, and the ability to detect a colony of approximately 26  $\mu\text{m}$  in diameter in a detection image was confirmed.

As the second application for evaluation of food quality, the spatial distributions of food constituents were visualized. Concretely, fat and various fatty acid contents in a raw beef cut were predicted and visualized. First, the effectiveness of the spectroscopic approach for this application was confirmed through experiment by a traditional method with hyper-spectral data. After that, this study proposed a more simple and practicable measurement system with equivalent performance to hyper-spectral method, using a set of a few optical filters. The filter shape was a band-pass-filter (BPF), and the band-pass characteristics were specifically designed for each content individually. By comparing the prediction results of actual measurement using a set of three BPFs with hyper-spectral imaging (about 200 wavelengths), the superiority of filter method in the performance was confirmed.

In both applications, the spectral characteristics of LEDs/BPFs are specifically pre-selected/designed for extracting target information from hyperspectral information. These methods are equivalent to reducing the dimensions from hundreds (obtained by hyper-spectral measurement) to a few by hardware using the spectral characteristics of LEDs/BPFs. Therefore, although the hyperspectral measurement is required in the design phase, no spectroscopic device is needed during the application phase. In these methods, only a few images are acquired by switching LEDs/BPFs. It enables us to solve the problems of the cost, measurement time and computational resources at a time. Moreover, a brighter image can be obtained by constraining the minimum bandwidth in the filter design phase. It allows for shorter exposure times, and improves S/N ratio.

Prototype measurement systems with consideration of practical use were developed, and by using them, actual measurement was performed to evaluate the performance. As a result, the practicality and availability of proposed methods were demonstrated. These approaches might be also applicable to various fields where the spectroscopic method can be applied. This study can bridge between research application and practical use, and expand the application area of hyperspectral imaging technique.

# 目次

<b>第 1 章</b>	<b>序論</b>	<b>1</b>
1.1	はじめに . . . . .	1
1.2	本論文の構成 . . . . .	5
<b>第 2 章</b>	<b>分光画像計測法の原理とその応用に関する先行研究</b>	<b>7</b>
2.1	光とスペクトル . . . . .	7
2.2	近赤外分光法 . . . . .	8
2.2.1	近赤外光の発見 . . . . .	8
2.2.2	近赤外分光法の歴史 . . . . .	9
2.3	分光画像計測法 . . . . .	10
2.3.1	干渉フィルタを用いた計測法 . . . . .	10
2.3.2	回折格子を用いた計測法 . . . . .	11
2.3.3	音響光学可変波長フィルタを用いた計測法 . . . . .	12
2.4	食品の非破壊評価手法 . . . . .	12
2.4.1	光学的方法 . . . . .	13
2.4.2	放射線的方法 . . . . .	14
2.4.3	力学的方法 . . . . .	14
2.4.4	電磁気学的方法 . . . . .	15
<b>第 3 章</b>	<b>微生物の分光特性に基づいたコロニーの検出と種判別</b>	<b>17</b>
3.1	本章の概要 . . . . .	17
3.2	背景 . . . . .	17
3.3	光合成細菌 . . . . .	18
3.4	分光画像計測による微生物種の判別 . . . . .	20
3.4.1	実験条件 . . . . .	21
3.4.2	解析の流れ . . . . .	23
3.4.3	評価方法 . . . . .	24

3.4.4	計測結果	25
3.4.5	判別結果とまとめ	25
3.5	本章のまとめ	26
第 4 章	分光特性に基づいた光源の選択と微生物の迅速検出への応用	31
4.1	本章の概要	31
4.2	分光特性に基づいた光源選択手法の原理	32
4.3	微生物リスクに関する研究背景	33
4.4	検出ターゲットとする微生物とその検査技術	34
4.4.1	<i>Alicyclobacillus</i> 属細菌の特徴	34
4.4.2	汚染事故の事例	36
4.4.3	微生物の検査手法について	37
4.4.4	微生物の増殖について	37
4.5	実験 1: LED 光源の選択	38
4.5.1	計測サンプル	38
4.5.2	計測条件	38
4.5.3	計測結果と LED 選択	39
4.6	実験 2: 選択した LED を用いたモニタリング計測	41
4.6.1	モニタリング計測装置	41
4.6.2	計測サンプル	41
4.6.3	サンプルの計測とデータ処理	43
4.6.4	実験結果と検出性能の評価	44
4.7	実験 3: 検出されたコロニーサイズの比較	44
4.8	本章のまとめ	48
第 5 章	近赤外分光画像を用いた食品中の特定成分含量の推定と分布可視化	49
5.1	本章の概要	49
5.2	牛肉の品質評価に関する背景	49
5.3	成分含量推定モデルの構築と可視化の手順	51
5.4	従来法による成分分析と画像計測実験	53
5.4.1	計測サンプル	53
5.4.2	脂肪分と脂肪酸組成の理化学分析	54
5.4.3	近赤外分光画像計測実験	56
5.5	成分含量推定モデルの構築	59
5.5.1	スペクトルの抽出と前処理	59

---

5.5.2	PLS 回帰による成分推定モデルの構築 . . . . .	61
5.6	推定モデルの性能評価と成分分布の可視化 . . . . .	62
5.6.1	推定モデルの性能評価 . . . . .	62
5.6.2	成分分布の可視化結果 . . . . .	65
5.7	本章のまとめ . . . . .	66
第 6 章	数枚組の帯域透過光学フィルタを用いた分光情報の抽出と食品成分分布 可視化への応用 . . . . .	69
6.1	本章の概要 . . . . .	69
6.2	背景 . . . . .	69
6.3	帯域透過光学フィルタの設計方法 . . . . .	70
6.4	牛肉の品質評価への適用 . . . . .	72
6.4.1	フィルタ特性の理論設計 . . . . .	73
6.4.2	シミュレーションによる評価 . . . . .	76
6.5	多層膜光学フィルタを用いた実計測による性能評価実験 . . . . .	78
6.5.1	光学フィルタを用いた実計測実験 . . . . .	78
6.5.2	分光法との比較 . . . . .	78
6.5.3	可視化結果の評価 . . . . .	81
6.6	本章のまとめ . . . . .	83
第 7 章	総括 . . . . .	85
参考文献	. . . . .	89
謝辞	. . . . .	95
研究業績目録	. . . . .	97



# 第 1 章

## 序論

### 1.1 はじめに

我々は、視覚を通して物体の大きさや形、距離や動きのみならず、“色”の情報を得ることで、物体に関する様々な性質をも含めた大量の情報を得ている。しかし、我々が視覚を通して知覚可能な光は、可視光と呼ばれるおおよそ波長  $\lambda = 380 \sim 780$  [nm] の範囲に限られた電磁波に過ぎない。さらに、ヒトの視覚はこの範囲の無限次元とも言えるスペクトル情報を、L、M、S の錐体によって僅か 3 次元の情報にまで圧縮した上で“色”として認識している。

従って、ヒトの視覚系には次のような限界があることは明らかである。まず、可視波長外の光は、知覚することが不可能である。これは当然のことながら、一方で鳥類や昆虫類では近紫外線に感受性を持つものも多く存在する。このことは、不可視波長の光にも有用な情報が隠れていることを予想させる。

もう一つの限界は、波長分解能である。ヒトの網膜には、前述のとおり 3 種類の錐体、即ち 3 種類の感度特性を持つ光センサしか存在しない。これを例えば鳥類と比較すると、ヒトよりも 1 種類多い、4 種類の視物質を持っていること、吸収ピークが比較的等間隔に並んでいること、ヒトに比べて短波長側にも複数の吸収ピークがあり、さらに近紫外まで感度を持っているなど、短波長における分解能が高いことなどが分かる (図 1.1)。ヒトの場合、L 錐体と M 錐体の吸収ピークが比較的近く、従って赤と緑の識別はよく出来るが、S 錐体は離れているため、短波長の光は (波長方向の) 分解能が低いことになる。また、各錐体は一般に相互にオーバーラップした広帯域の特性を持っていることも分かる。他にも、魚類の中には、8 種類程度の錐体を持つものもあり、さらに環境に応じて発現する視細胞を切り替えるといった例も報告されている [1]。生物により異なる多様な視覚特性は、個々の生物が、その生態や周囲の環境に適応し生き残っていく上で、有用な情報を効率良く得るため、進化の過程で獲得してきた特性であると考えることが出来る。とはい

え、我々ヒトを含めた生物は、わずかに数種類の光センサによる入力を用いるだけで、非常に高度で巧妙な視覚処理を行っていることになる。

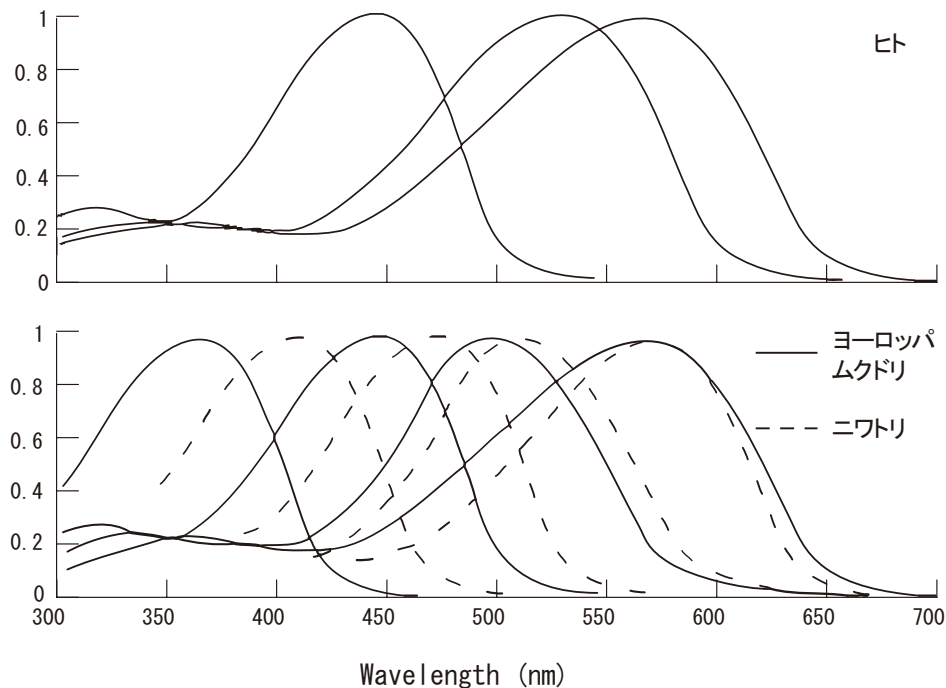


図 1.1 視物質の光波長吸収曲線 [2]

ここ数十年の材料や半導体技術の発達により、可視波長のみならず、紫外から赤外に至るまで、様々な波長帯に感度を持つデバイスが開発された。さらに、イメージングを行う多種多様なデバイスも市販されるようになり、近年は感度や解像度が飛躍的に向上すると同時に、低価格化も進んでいる。こういったデバイスは、ヒトの視覚とは異なり、不可視波長の画像を容易に取得可能である。例えば、赤外線像を用いた暗視装置が、軍事用途から発展した。現在では監視カメラなどにも使用されている。また、今日の一般的なデジタルカメラに用いられている **CCD** や **CMOS** 撮像素子は、近赤外光にも感度があるため、撮影される色のバランスが、不可視光である近赤外光によって影響されることを防ぐため、わざわざフィルタを追加してカットする製品が多い。

また、ヒトを含め生物の視覚系は、基本的に太陽光を光源として、検出器側 (眼) において分光を行なっているが、装置を用いた計測システムを構築する場合は、光源側の特性を用いた分光も可能であり、計測システムの構成上の自由度が高い。波長分解能に関して、分光デバイスの性能・仕様・セッティングによって制限は受けるものの、ヒトの視覚系に比べて自由度が高い。従来は分光画像の取得のためには、狭帯域の透過型干渉フィルタを測定波長に応じて用意し、フィルタを機械的に切り替えて計測を行う必要があったが、1990 年代からは電氣的に透過波長を制御可能な **AOTF**(Acousto-Optic Tunable Filter;



音響光学可変波長フィルタ) の応用が広がり、それまでの数十～数百 [nm] 程度の波長分解能を持つマルチスペクトラルイメージング (multi-spectral imaging; MSI) から、数 [nm] 間隔以下の波長分解能を達成可能なハイパースペクトラルイメージング (hyper-spectral imaging; HSI) が実現した。その後も同様に、可動部を持たずに、電氣的な波長制御が可能な LCTF(Liquid crystal tunable filter; 液晶チューナブルフィルタ) が実用化され [3]、これらのデバイスを用いた MSI、HSI による研究が活発になっている。

分光画像計測手法には、他の分析手法には無い、数多くの利点が存在する。まず、非破壊・非接触での計測が可能であることが挙げられる。この特長は、食品を含む様々な製品等の全数検査を可能にする。また、そのままの状態 (*in-situ*) での計測が可能であるため、モニタリングなどの用途にも有用である。次に、波長帯によっては、計測対象に含まれる成分などの化学的な情報が得られるという点が挙げられる。このことを用いれば、従来の化学的な分析手法に比べて極めて簡便に、しかもほぼ瞬時に分析結果を得ることが可能となる。加えて、化学的な分析に必要な前処理や、分析に必要な薬品等の消耗品、分析操作に必要な設備や技術、知識などが不要であるなど、多くの利点がある。また、成分や性質に関する情報の分布状態を可視化し、画像として提示することが可能であるという大きな特長がある。これにより、局所的な差異を明らかにしたり、広範囲を同時に計測したり、形状情報を活用した応用など、画像処理的な手法の導入も可能となる。

以上のように、今日では分光画像計測法を用いることで、ヒトの視覚能力をはるかに超越した、膨大な情報を得ることが可能となった。しかし、AOTF や LCTF を用いた分光画像計測法には、実応用を行う上では、いくつかの問題点がある。

第一に、導入に際して最も大きな障壁となっている点として、コストの問題が挙げられる。波長帯によってはカメラのコストも無視できないが、一般に AOTF や LCTF などの分光デバイスのコストが大きな割合を占める場合が多い。

第二に、波長軸方向にスキャンを行う必要があるため、1 回の計測に時間を要する点である。確かに、従来の干渉フィルタを機械的に切り替える方法よりは、はるかに高速に波長を選択することが可能ではある。しかし、計測波長点毎に、狭帯域のフィルタを通した光を計測することになるため、一般に非常に暗い画像を計測することになる。従って、波長解像度を上げれば上げるほど、透過帯域幅はより狭くなり、必要な S/N 比を得るために長時間の露光が必要となる。また、計測する波長点数が多くなれば、当然その分だけ計測時間が必要となる。

第三に、計測で得られるデータ量が膨大であるため、計算資源を大量に消費する点である。1 計測当たりのデータ量を考えると、「ピクセル階調 [bit] × 画像高さ [pixel] × 画像幅 [pixel] × 波長点数」となり、記録や解析にあたっては、大容量のストレージ、大量のメモリ、および大量の計算時間を消費する。通常のカラ画像の場合、波長点数が R、G、B の 3 点であるのに対し、HSI では波長点数は数百点から 1000 点を超えるものまであり、

近年の計算機性能の著しい向上をもってしても、非常に負荷の高い処理であることに変わりはない。

以上の問題に対し、本論文では二つのアプローチによってこれらの課題を解決することを目指した。ひとつは LED 光源の特性を用いた手法、もうひとつは透過特性を専用に設計した数枚の光学フィルタセットを用いた手法である。いずれも、個別のターゲットに特化して、特性の選択・設計を行なう手法であり、その設計段階では分光計測を必要とするものの、一度設計してしまえば、高コストな分光デバイスを使用せずに計測が可能となる。これは、情報圧縮、次元削減をハードウェアで行なうことに相当する。もともと、計測されたスペクトルの隣接した波長点のデータは、互いに相関が非常に高いことから、全ての波長点のデータをそのまま使用するのではなく、変数選択や、主成分分析、PLS 回帰分析などを使用し、数次元 (～十数次元) 程度にまで次元を削減した上で、解析を行うことが多い。しかし、数次元で表現可能な情報を得るために、数百次元のデータを毎回計測し、多くの計算資源を使って次元削減を行い、解析をするという手法は、結果的には、次元削減の段階で単に捨てられる情報を、苦勞して計測しているということになってしまう。生物の視覚に学べば、互いにオーバーラップする広帯域の波長特性を持つ、数種類の光センサから構成されており、狭帯域の数百にも及ぶ波長情報は必ずしも必要としないことが予想できる。本論文では、使用する LED 光源の選択や、ある程度の帯域幅を持った帯域透過フィルタを使用することで、ターゲットとする情報の効率的な抽出を目指す。

本アプローチによれば、実応用を行う時点では、1 回の計測につき数枚程度の画像計測が、LED 光源や、光学フィルタの切り替えによって行われることになる。従って、まず第一の問題であった分光デバイスが不要となる。また、数種類程度の LED 光源や、光学フィルタの切り替えで 1 回の計測が終わるため、第二の計測時間の問題が軽減される。光学フィルタセットを用いる方法では、AOTF や LCTF の波長選択時間に比べ、光学フィルタの切り替え時間は確かに長くはなるが、計測すべき波長点数 (フィルタ枚数) が非常に少ないこと、比較的広帯域な透過特性を持つ光学フィルタであるため、露光時間を短くすることが可能であることから、実際の計測時間は大幅に短縮されることになる。同時に、計測時のデータ量が大幅に削減されるため、第三の計算資源の問題も解消可能となる。

フィルタセットによる手法は、一見、従来型の干渉フィルタ切り替えによる MSI システムと同様に見えるが、詳細な波長解像度を持つ HSI と、ターゲットとする情報の抽出に必要な次元削減をハードウェアとして同時に実現したシステムである。また、従来型の MSI システムで使用していた狭帯域の干渉フィルタを、設計した光学フィルタと入れ替えるだけで、計測システムは完成する。

本論文では、食品に関わる分野への分光画像計測手法の応用を目指し、実用を強く意識した計測、解析手法の開発を行った。さらに、研究用途のみではなく、実際の使用状況に近い計測システムを試作し、実測を行うことで、性能の評価を行い、提案手法の有用性の

確認を行った。

## 1.2 本論文の構成

本論文は、以下に示す全 7 章から構成される (図 1.2)。

まず、第 2 章では、光とスペクトル、分光画像計測法、食品検査手法など、本論文で扱う分野の歴史や先行研究などについて概説する。

第 3 章と第 4 章では、食品の安全性に関連する微生物を対象として、分光情報を用いた迅速検出と識別を行う。第 3 章ではまず、近赤外分光計測と判別分析を用いた古典的なアプローチにより、微生物自体が持つ分光的な特性に着目したコロニー検出と識別を行い、本手法が微生物の簡易・迅速検査に適用可能であることを示す。次に第 4 章では、実際に飲料製品の変敗を引き起こすことで問題となっている *Alicyclobacillus* 属細菌の早期検出を目的とし、LED 光源の特性をそのまま用いた簡易な計測システムを提案する。ここでは、候補とする LED の中から、ターゲットの検出に適した LED を 2 つ選択する手法について述べ、モニタリングが可能な試作計測システムとして実装した上で、実測により、検出性能の評価を行う。

第 5 章と第 6 章では、食品の品質評価の例として、牛肉を対象に、含まれる各種脂肪酸等の成分分布を、近赤外光を用いて可視化する手法について述べる。第 5 章ではまず、近赤外分光計測法と PLS 回帰分析を用いたオーソドックスな手法を画像計測法に適用することで、成分の空間分布の可視化を行う。次に第 6 章では、成分の情報を効率よく抽出する光学フィルタセットの特性を設計する手法について述べ、設計した特性を実際に光学フィルタとして実装し、実測による評価までを行った結果を示す。

第 7 章では、本論文を総括し、今後の展望について述べる。

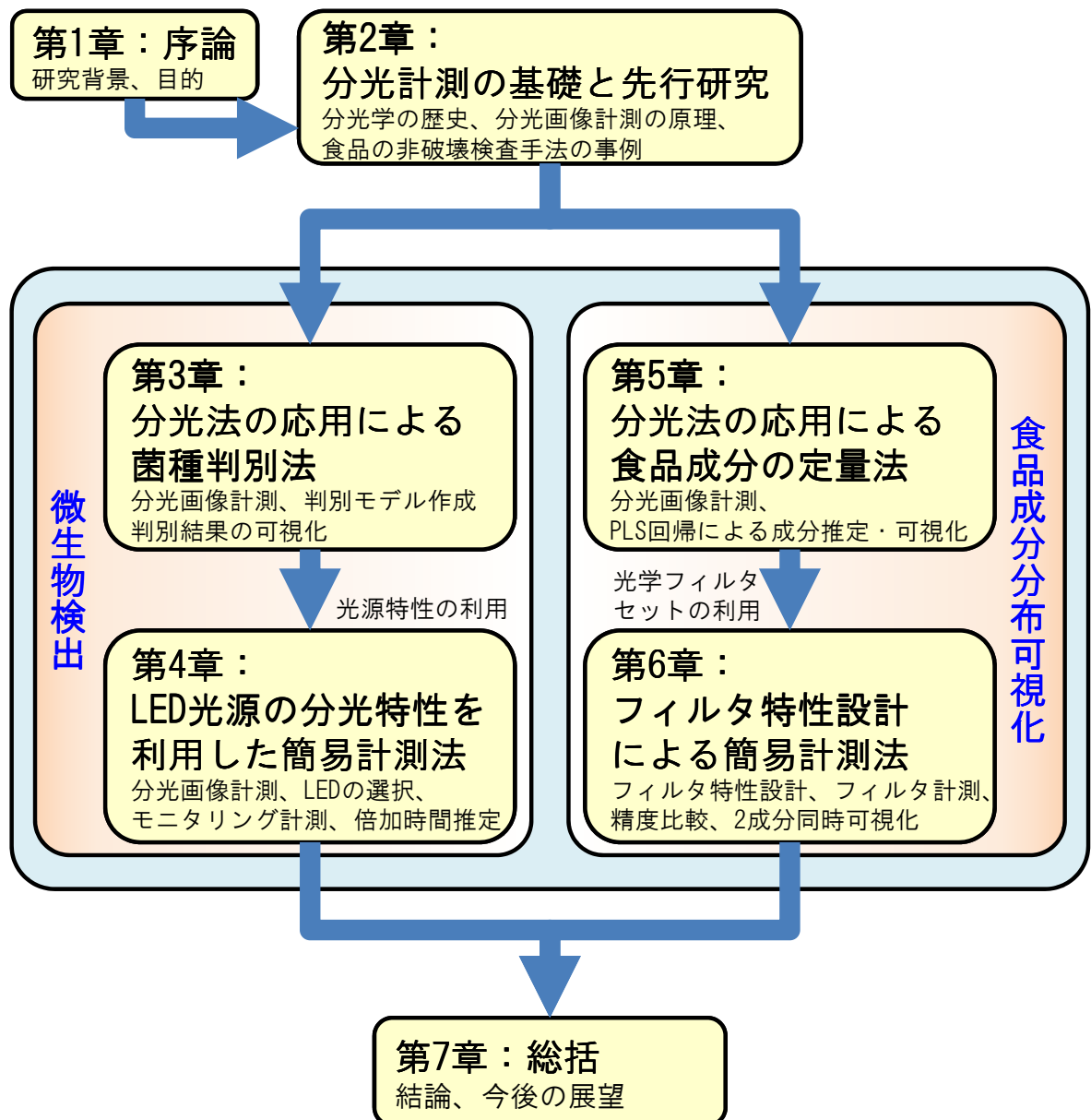


図 1.2 本論文の構成

## 第 2 章

# 分光画像計測法の原理とその応用に 関する先行研究

### 2.1 光とスペクトル

光は電磁波の一種である。狭義にはおおよそ  $\lambda = 380 \sim 780[\text{nm}]$  の波長の放射、即ち CIE(Commission Internationale de l'Éclairage; 国際照明委員会) によって「直接に肉眼に入射して視感覚を起こすことが出来る放射」として定義される可視放射を指す。一方、広義には、上記を「可視光線」と呼び、不可視放射である紫外線(おおよそ  $\lambda = 100 \sim 400[\text{nm}]$ ) や赤外線(おおよそ  $\lambda = 780[\text{nm}] \sim 1[\text{mm}]$ ) を含めて、これを光と呼ぶ [4]。本論文では、光を広義の意味で用いる\*<sup>1</sup>。

光が紫から赤の色に連続的に分かれる様子は、虹などの自然現象を通して有史以前から観察されていたことは確実である。西暦 130 年には、プトレマイオス (*Κλαυδίου Πτολεμαίου*; Claudius Ptolemaios) が光の屈折に関する知見を記しており、1305 年には Theodoric が水を満たしたグラスを雨粒に見立てることで、虹の構造を考察している [5]。

しかし、ニュートン (Isaac Newton) によって科学的な分光実験が初めて行われたのは、17 世紀の中頃であった。彼は、1671 年に発行された学術論文にて、プリズムにより白色光が 7 色に分解できることを示した [6]。この中で彼は、「spectrum」という造語を初めて使用している [7]。

---

\*<sup>1</sup> 近年では、 $\lambda = 30[\mu\text{m}] \sim 3[\text{mm}]$  程度のサブミリ波を含む波長領域をテラヘルツ「光」と呼び、光の領域に含める場合も見られるが、本論文では取り扱わない。

## 2.2 近赤外分光法

### 2.2.1 近赤外光の発見

赤外光 (Infrared; IR) は、その波長によって、可視光に近い方 (波長が短い方) から近赤外光 (Near Infrared; NIR)、中赤外光 (Middle Infrared; Mid-IR)、遠赤外光 (Far Infrared; FIR) に区分される。区分の境界は分野や著述者によってまちまちであるが、本論文では 800 ~ 2500[nm] の波長領域の赤外光を近赤外光と呼ぶ [8]。

近赤外光は、1800 年に **Herschel** が発見したとされる。彼は、プリズムを用いて太陽光を分光し、各スペクトル毎の温度上昇能力を調べ、赤、緑、紫の順で能力が高いことを見出した (図 2.1)。さらに、赤より外側の目に見えない「光」 (invisible light) にも、より大きな温度上昇能力があることを発見し、これを可視光とは別種の放射と捉え熱線 (radiant heat) と呼んだ [9]。

その後の研究で、熱線は可視光よりも波長の長い光の一部であるという考えが起こり、1835 年には **Amperè** によって赤外 (infra-red) という概念が初めて生まれた。その後、**Maxwell** が可視光も赤外光も電磁波として同じ性質を持っていることを理論的に明らかにし、より一般的な解釈が進んだ。1900 年には、**Plank** によって **Kirchoff**、**Stefan**、**Wien** の理論が放射則 (Plank's radiation law) としてまとめられるに至った [5, 8]。

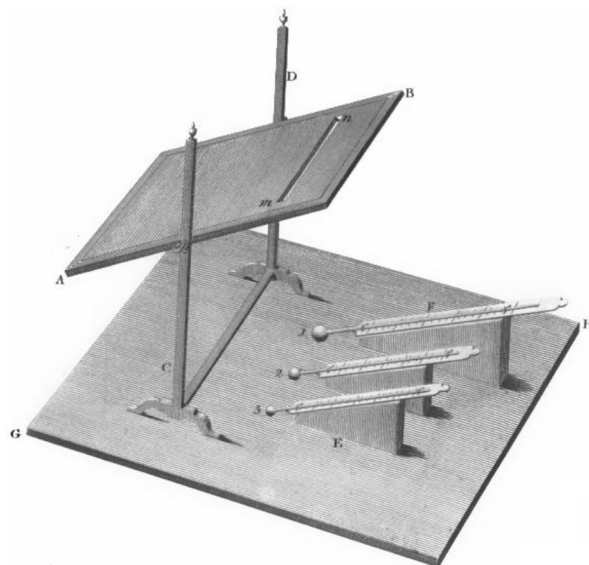


図 2.1 近赤外光の発見 (Herschel の実験; 文献 [9] より)

### 2.2.2 近赤外分光法の歴史

1881 年、48 種類の有機化合物について、波長  $\lambda = 700 \sim 1200[\text{nm}]$  の範囲の吸収スペクトルを測定した結果が、Abney と Festing によって報告された [10]。これが近赤外吸収スペクトルに関しての、最初の報告である。彼らは写真乾板を用いた古典的な方法に頼っていたが、1878 年に Langley によって発明されたボロメータ (bolometer) が改良され実用レベルになったことで、1889 年、1890 年の Ångström による報告を皮切りに、以後ボロメータを用いた研究が活発になされるようになる [11]。1905 年頃には、Coblentz によって数百の物質について  $1000 \sim 1500[\text{nm}]$  の近赤外スペクトルが計測され、一連の論文として発表された。この中で彼は、例え同じ元素から成る物質 (例えば分子式は同一だが構造が異なる異性体) であっても、スペクトルはそれぞれ異なり、特有の「指紋 (fingerprint)」を持つことを発見した。さらに、共通の分子構造 (例えば OH 基) を持つ化合物には、共通の吸収パターンがあることや、調和的な関連の存在についても仮説を立てている。これらの成果により、彼は化学者に化合物の構造的な情報を得ることができる新たなツールをもたらした [5]。

20 世紀の前半は、有機化合物に対応するスペクトルのデータの蓄積が行われたが、赤外スペクトルの計測に適した装置がなかったことから、科学的な興味も失われていた時代であった。1954 年と 1955 年に W. Kaye が [12, 13]、1960 年に R. F. Goddu が [14]、1968 年に K. Whetsel が [15] 当時の研究状況を要約しているが、近赤外に関連した論文は、1970 年までの期間に僅か 50 枚程度しか出ていない。

さて、最初に赤外計測による定量分析を行ったのは、1912 年に大気中の水蒸気を定量した F. E. Fowle とされる [16]。続いて、1938 年には、Ellis と Bath によってゼラチン中の水分量の定量が行われた [17]。1943 年には Barr と Harp が数種類の植物油のスペクトル計測を行なっている [18]。1940 年代の終わりには、近赤外計測によって H. Will がポリマーフィルムの厚さを計測している。

1930 年代には硫化鉛 (PbS) が化合物半導体として研究され始めていたが、第二次大戦中に熱感知 (heat-sensing) を目的とした近赤外検出器として急激に研究が進んだ。1950 年代になると、PbS は  $1 \sim 2.5 [\mu\text{m}]$  の波長範囲に極めて高い感度を持つ検出器として、民間用途としても入手できるようになる。こうして、ようやく近赤外の計測に適した検出器が入手可能な状況となった。

しかし、近赤外スペクトルの研究は、中赤外 ( $\lambda = 2 \sim 15 [\mu\text{m}]$ ) の研究とは対極的に、なかなか進まなかった。近赤外領域のスペクトルには、様々な倍音、結合音が混在しており、多数の微弱なピークが重なり合った非常に複雑な特性となっていること、中赤外に比べて、2 桁から 3 桁程度吸収ピークが弱いことが要因である。

これらの問題を解決したのは、電子計算機の登場に加え、20世紀に考案された主成分分析や重回帰分析などの新たな統計的手法であった。1968年、Ben-Gera と K. Norris は、穀物の分析に重回帰分析を用いた論文を発表している。以降、1970年代から現在に至るまで、近赤外技術は急激な発展を遂げた。分光データの解析を支えたのは、同時期に登場したケモメトリックス (chemometrics) という考え方である。これは、実験で得られた大量のデータに対して、次元の圧縮、回帰、判別、分類などを行うことにより埋もれた情報を発掘する分野一般を指し、先に述べた重回帰分析などが含まれる。当初は小麦などの食品への応用が主であったが、徐々に応用範囲が広がり、今日では繊維、医薬品、ポリマー等の工業製品にまで応用されるようになってきている [19]。更に、近年ではその透過性を生かした、近赤外線光トポグラフィによる脳機能計測や、血中酸素飽和度のモニターに使用されるパルスオキシメーター (pulse oximeter) など、医学分野へも近赤外光が応用されるようになってきており、今後も発展が期待される。

## 2.3 分光画像計測法

分光画像は1つのピクセルが分光情報を持つ画像である。一般的なカラーデジタルカメラの画像が、R、G、Bの3枚の2次元画像から構成されるのに対し、分光画像は通常、数十～数千枚もの2次元画像から構成される。

### 2.3.1 干渉フィルタを用いた計測法

分光画像を計測する最もシンプルで古典的な手法は、狭帯域の干渉フィルタを機械的に切り替えて計測する手法である。典型的な計測システムは、図2.2に示すように、カメラの前にフィルタホイール等のフィルタを切り替える機構を設け、手動または自動でフィルタを切り替えつつ、1枚ずつ分光画像を計測する。この手法は、比較的低コストに構成可能だが、波長数が増えると構成が大型になる、または複雑になること、フィルタの切り替えに時間がかかること、機械的な可動部があることなどの短所がある。

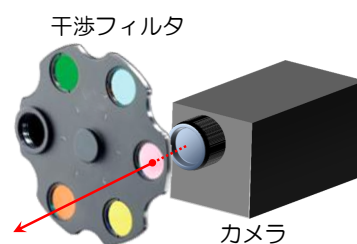


図 2.2 干渉フィルタを用いた計測法



### 2.3.2 回折格子を用いた計測法

回折格子は一般的な分光器 (ポイント計測) にもよく使用されているが、光の回折と干渉を利用して分光を行うものである。画像計測に使用するためには、図 2.3(a) に示すように、物体の像をスリット上に結像させ、このスリットを透過した光を回折格子に入射させる。物体の上の 1 点から発した光は、凹面鏡で平行光となって回折格子に入射し、回折格子によって図中の垂直方向に分散させられる。そして、2 つ目の凹面鏡によって、分散した光は波長ごとに 2 次元センサ (カメラ) 上の異なる高さに集光する。結果的に、2 次元センサ上の水平方向に物体が結像し、垂直方向に波長の異なる光が集まることになる [20]。

同様の原理で、より小型化を実現する方式として、2 個のプリズムと回折格子を組み合わせた光学系も使われており (図 2.3(b))、グリズム (Grism; Grating-prism) とも呼ばれている。この方式は、回折格子による光の偏向をプリズムによって補正し、中心波長の光が元の光軸に戻るような構成になっている。この方式を用いた分光画像計測装置は、本論文の第 5 章でも使用している。

回折格子を用いた手法は、原理的に高い波長分解能が得られる反面、空間的に 2 つの次元を持つ分光画像計測を行うためには、 $y$  軸方向への物体または計測系の走査が必要である。

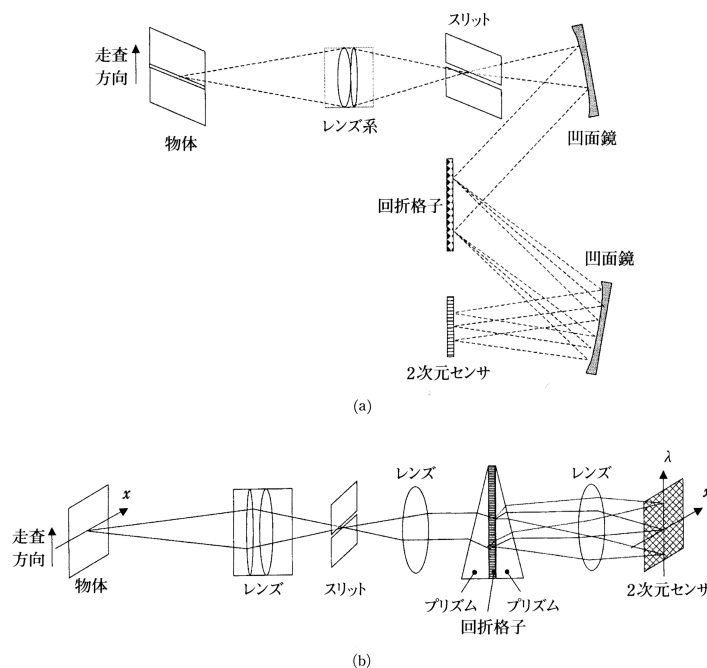


図 2.3 回折格子を用いた計測法 [20]

### 2.3.3 音響光学可変波長フィルタを用いた計測法

音響光学可変波長フィルタ (Acousto-Optic Tunable Filter; AOTF) は、電氣的に制御可能な可変バンドパスフィルタであり、機械的な可動部を持たないという特長がある。動作原理を図 2.4 に示す。TeO<sub>2</sub>(二酸化テルル) は可視 ~ 5 [ $\mu\text{m}$ ] の波長範囲の光に対して吸収のない物質とみなすことが出来、可視から近赤外の範囲で、優れた音響光学特性を持っている。この結晶の片方には、トランスデューサが接合されており、このトランスデューサにラジオ波 (30 ~ 200 [MHz]) を入力すると、同じ周波数の振動 (音響波) が生じる。そして、この振動で音響光学結晶の内部に周期的な屈折率の大小が生じる。これがグレーティングの役割をし、分光が可能となる。

この手法の優れた点は、既に述べた通り、トランスデューサに与える電気信号の周波数を制御することで、電氣的に、高速に透過波長を変化できる点である。波長の選択は走査することも、ランダムに選択することも可能で、波長の切り替えに要す時間は、僅か数 [ $\mu\text{sec}$ ] と極めて短い。

本論文では、第3章において、AOTF を用いた分光画像計測を行なっている。

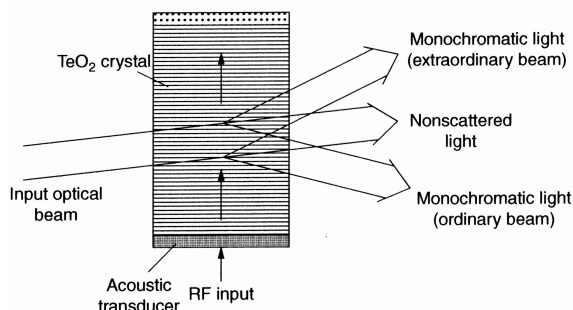


図 2.4 音響光学可変波長フィルタの動作原理 [5]

## 2.4 食品の非破壊評価手法 [21]

非破壊手法は、対象物に何らかのエネルギーを与えるとき、その入力エネルギーと、対象物によって影響を受けた出力エネルギーとの関係を調べることによって、対象物に関わる特性を得ようとする手法である。

一般に、理化学分析手法と比較して以下のような特長がある。

1. 大量の化学薬品を必要としない。
2. 試料の調製が簡単で、迅速な分析が可能。

3. システムが完成すれば、分析に際して熟練した技術者を必要としない。
4. 同一試料を反復して使用し得る。
5. 実時間での分析が可能のため、工程管理を自動化することが出来る。
6. 測定に際しての計量の必要がない。
7. 方法によっては、同時に多項目の分析情報を得ることが出来る。

非破壊手法は、使用するエネルギーによって、光学的方法、放射線的方法、力学的方法、電磁気学的方法などに分類される。

### 2.4.1 光学的方法

光学的方法は、紫外光、可視光、近赤外光、赤外光を利用した方法に分類される。

紫外光を用いた方法では、紫外光の照射で励起状態になった電子が基底状態に戻るときに放射される蛍光を用いる手法がある。微生物汚染卵、ナッツに生えるカビ毒のアフラトキシン、魚フィレー中の残留小骨、ちりめんじゃこの異物などの検出・測定の例や、キュウリの鮮度判定例がある。また、紫外線像を用いた紫外線写真による手法では、家畜臓器の精密写真、柿に含まれる不溶性タンニンの可視化例がある。

可視光を用いた方法は最も古くから行われている。即ち、色彩を用いた、目視による手法である。モノクロカメラや、カラーカメラによる手法もよく使われている。計測手法としては、透過法、表面の拡散反射を用いる反射法、蛍光よりも寿命の長い遅延発光を用いるもの、レーザー光を用いるもの等がある。血卵、精米中の異物、食品用紙容器の欠陥、ワインの等級、青果物の色彩・傷、パインアップルの熟度、柿の渋、玄米の形状の判定・測定など、多数の応用例がある。

近赤外光を用いた方法は、食品に含まれる各種成分の C-H、N-H、O-H 等の原子団 (官能基) による近赤外光の吸収を利用した方法であり、食品のタンパク質、脂質などの化学成分や (図 2.5)、硬度、加工適正等の理化学的な特性の計測が可能である。近赤外スペクトルには複数の成分の情報が重畳して含まれており、一般には、これらのスペクトルから重回帰分析などの統計的手法を用いて情報を抽出する。当初は小麦や大豆など水分の少ない穀物の成分分析に使われたが、現在は青果物などにも適用されている。牛乳、乳製品、畜肉の成分分析や、果実の糖度自動選別機、トマトピューレのカビの測定など、応用例は多岐にわたる。

赤外線を用いた方法は、吸収を用いるもの (赤外分光法) と、赤外放射を用いる方法がある。前者は残留農薬の測定、果汁の成分分析など、後者はリンゴや柑橘類の外傷の検出、受精卵の識別などへの応用例がある。外傷の検出には、損傷部の温度が低いことを利用している。

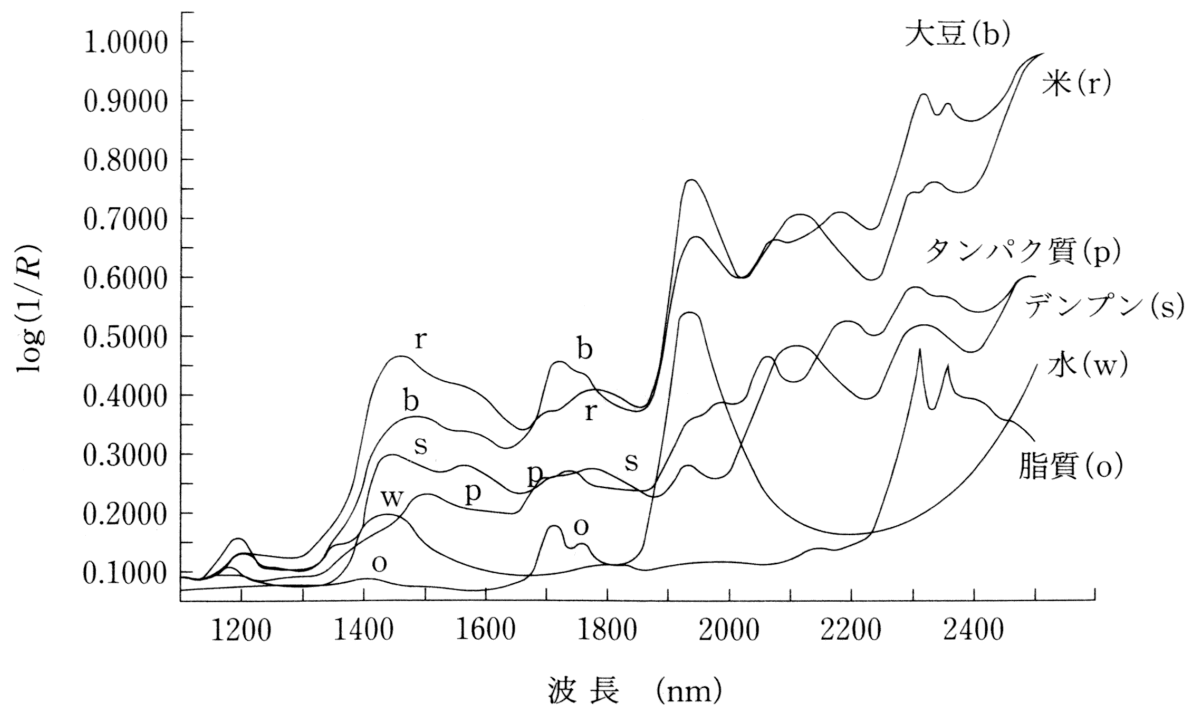


図 2.5 大豆、米、並びに主要成分の近赤外スペクトル [19]

### 2.4.2 放射線的方法

放射線的方法は、放射線 (X 線、 $\gamma$  線、 $\beta$  線) の、物質に対する透過率の違いを利用した方法で、主に青果物、加工食品の内部状態 (空洞、欠陥など) の検出に使われる。むき身アサリ中の残殻の検出などの応用例がある。

### 2.4.3 力学的方法

力学的方法は、音波や振動のエネルギーを用い、食品のテクスチャ、組織構造、粘弾性など、主に食品の力学的特性が関与する品質の評価法として使われる。打音による方法、振動励起による方法、超音波による方法がある。スイカの空洞の検出、リンゴの硬度の計測、メロンの硬度の計測、リンゴの成熟に伴う果肉テクスチャの測定、肉用牛の皮下脂肪や筋肉脂肪の状態の把握などへの応用例がある。

#### 2.4.4 電磁気学的方法

電磁気学的方法は、対象物の持つ電磁気学的特性を利用したもので、インピーダンス、静電容量の他、核磁気共鳴 (Nuclear Magnetic Resonance; NMR) や電子スピン共鳴 (Electron Paramagnetic Resonance; ESR) を利用した計測法が開発されている。インピーダンスを用いた計測法では、キウイフルーツの熟度の測定、バレイショへの  $\gamma$  線照射の有無の判定などの例が、静電容量を利用した計測法では、スイカの空洞・熟度の測定例がある。NMR を用いた計測法としては、ミニトマトの登熟過程の水の分布測定例が、NMR を用いた計測法として、登熟中のイネ穎果内水分分布の測定例がある。



## 第 3 章

# 微生物の分光特性に基づいた コロニーの検出と種判別

### 3.1 本章の概要

食品や薬品等の製造・流通において、微生物の汚染による危害や品質上のリスクは常に存在する。そのため、微生物の迅速な検出や識別は極めて重要である。

本章では、微生物自体が持つ分光的な特徴に着目し、非破壊かつ前処理等が不要な、光学的な計測のみで検査を行う手法について、モデル細菌を用いた実証を行う。本研究では、従来行われていた分光光度計等によるポイント計測をイメージングに拡張した、近赤外分光画像計測法を応用することで、どの程度小さなコロニーまで適用できるかを実験的に確認し、本手法が微生物の迅速検出・識別に適用可能であることを示す。

### 3.2 背景

微生物の検査には、培養法を始め、染色法、抗原・抗体反応を利用した手法、遺伝子を利用した手法など、様々な手法が取り入れられている [22]。しかし、抗原・抗体反応を用いた手法や遺伝子を用いた手法などの新しい手法は、迅速で感度や特異性も高いが、必要な試薬が高価であったり、専用の設備が必要であったりと、一般に広く使用されるには至っていない。最も古くから行われている培養法は、培地の成分や温度、嫌気・好気といった培養条件をコントロールすることで、微生物を選択的に増殖させ、発現したコロニーを目視で観察・計数するものである。この方法は、現在においてもなお主流の方法であり、公定法となっている検査手法の多くは培養法に基づいている。例えば、食品衛生法で定めた一般生菌数検査における公定法も、培養法を用いた手法である。また、微生物の同定を行う際には、多くの検査手法で純粋培養 (分離) と呼ばれる操作が不可欠であり、その際に培

養が必要となる。しかし、培養を行う場合、時間を要するという大きな欠点がある。

もし、複数種類の微生物コロニーが混在した状態で、検出や種類の識別が可能となれば、純粋培養が不要となり、従って検査時間が大幅に短縮可能となる。また、より小さなコロニーが検出可能であれば、培養時間が短縮でき、従って検査時間を短縮することが可能である。

### 3.3 光合成細菌

本研究は、微生物自体が持つ分光特性に着目した、コロニー単位での検出・識別手法の原理確認実験と位置づけ、モデル細菌として光合成細菌を使用した。

光合成細菌は、従来からその多面的な機能が注目されており、農業、畜産、水産分野への応用 [23] や、放射線核種や重金属の除去回収など環境浄化、菌体成分を用いた植物の光合成促進と水質浄化への応用 [24]、エネルギー生産、食品・医薬品の生産への応用 [25] など、多くの分野で研究が行われている細菌である。近年はさらに、循環型社会の構築や、地球環境保全、二酸化炭素固定の機運の高まりを受け、光合成細菌の利用は再び注目されつつある。

光合成細菌は、光合成原核生物の一種で、湖や沼、海洋などの水界嫌気層に広く分布しており、一般的に次のような特徴を持つ [26]。

1. 光合成色素として、バクテリオクロロフィル (BChl) を含有する。
2. 嫌氣的・光照射条件下で光合成的に生育する。
3. 光合成生育過程で酸素を発生しない。

光合成細菌の持つバクテリオクロロフィルは複数種あり [27]、いずれも近赤外領域 (715 ~ 1050 [nm]) に吸収ピークが存在するが [26]、菌種によって含有比率が異なるため、それぞれ特徴的な分光特性を持つ。この特徴を用い、分光光度計を用いた簡易同定が行われていることから [28, 29]、本原理確認実験において適切であると考えた。

本研究では、モデル細菌として光合成細菌 3 種と、それ以外の菌の総称として非光合成細菌 1 種の、合計 4 種の菌を用いた。光合成細菌は、*Rhodospirillum rubrum* DSM123、*Rhodobium rubrum* DSM2698、*Rhodospirillum rubrum* ATCC35703、非光合成細菌は *Paracoccus pantotrophus* JCM6892 を使用した。

図 3.1 に、光学顕微鏡 (Nikon SMZ-10、Nikon LABOPHOT-2) を介してカラーデジタルカメラ (Nikon Coolpix995) により撮影した各菌の画像を示す。大きな方のコロニー (各左) の直径は 1 [mm] 程度だが、この程度の大きなコロニーに成長すると、肉眼でも着色して見える様子がわかる。しかし、これらの 4 種類の菌はいずれも赤色に見えるため、色のみから菌種を見分けることは困難である。さらに、直径 100 [ $\mu$ m] 未満のいわゆるマイク



ロコロニー (図中各右) の場合は、どの菌も無色透明に見え、形状的な特徴も無くなるため、肉眼による菌種の識別はほぼ不可能となる。

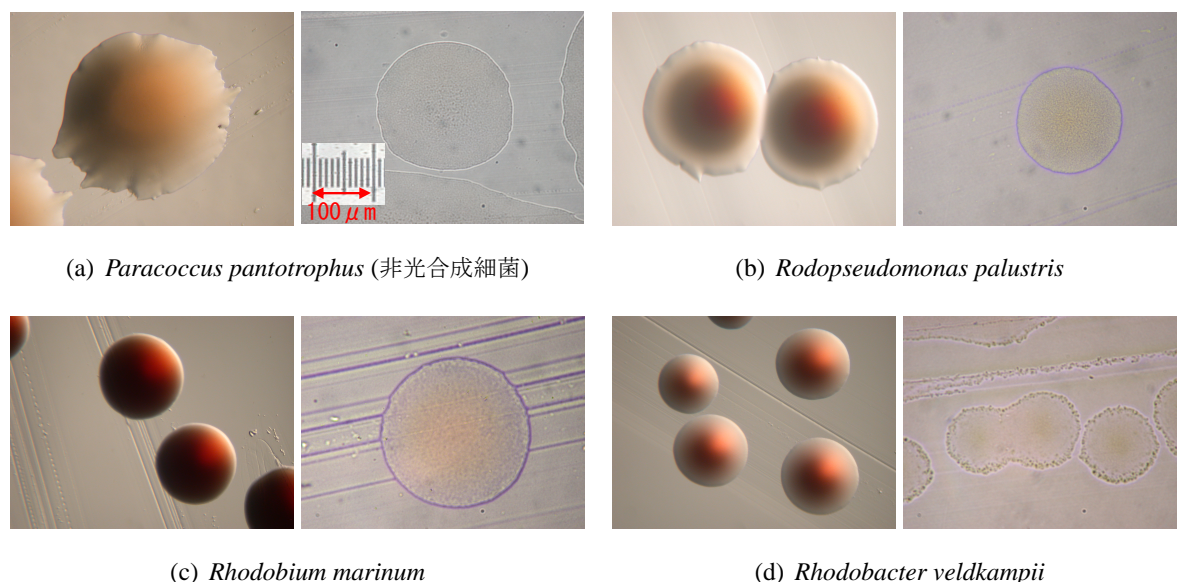


図 3.1 デジタルカメラによるコロニーの画像  
(各左のコロニーは直径 1 [mm] 程度、各右のコロニーは直径数百 [ $\mu\text{m}$ ] )

分光画像計測実験に入る前に、予備実験として、従来法と同様に、分光光度計による吸光度スペクトルの確認を行った。分光光度計を用いた従来法では、菌種の識別までに図 3.2 に示す手順を踏む必要がある。まず、(1) サンプルを培養し、コロニーを形成させる。この段階で、培地や嫌気・好気といった培養条件を適当に選択することで、ある程度成長させる菌を限ることができる。なお、菌があるかないかを調べる検出は、通常、1 [mm] 程度まで成長させたコロニーを肉眼でカウントすることで行われている。その後、(2) 純粋分離を行い、(3) 純粋分離で得られた一種の菌のみを、分光光度計で測定するのに十分な量になるまで培養し、(4) 菌体を超音波で破砕、色素を遠心分離で取り出すなど前処理を施した後に、(5) 分光光度計での測定を行う。光合成細菌の場合には、およそ (1) に 2~7 日、(2) に 1~2 週間、(3) に 2~3 日、(4) に数時間の時間を要する。このように、特に純粋分離には非常に長い時間と手間を要する。分光画像を用いた手法では、(2) 以降の純粋分離などを行わずに、(1) の段階のサンプルをそのまま計測することで、菌種の識別まで可能となるため、時間が大幅に短縮できることになる。

図 3.3 に、本研究で用いた 4 種類の菌について分光光度計で計測した吸光度を示す。3 種類すべての光合成細菌について、近赤外領域に吸収ピークが存在することが確認できる。この中で、805 [nm] , 880 [nm] 付近のピークが、バクテリオクロフィル (BChl-a) によるものと考えられる (図中矢印)。

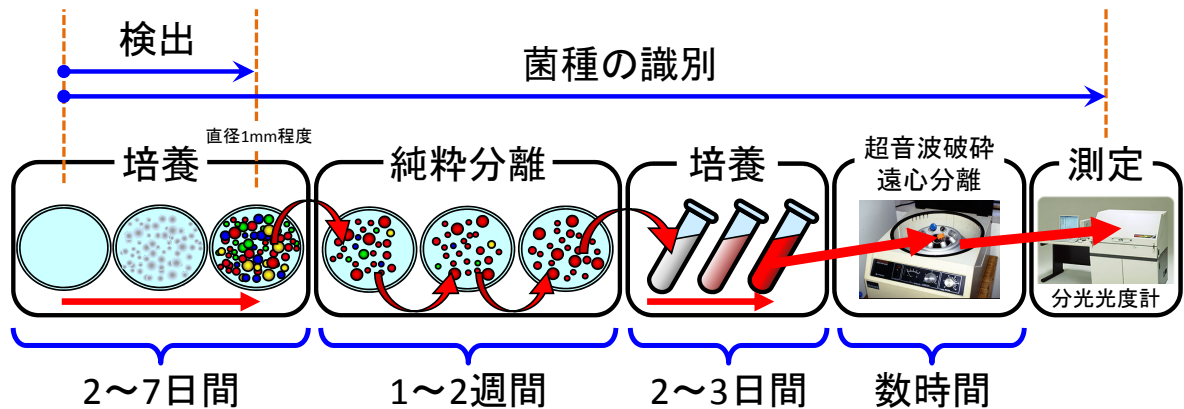


図 3.2 分光光度計を用いた菌種の識別までの手順の例

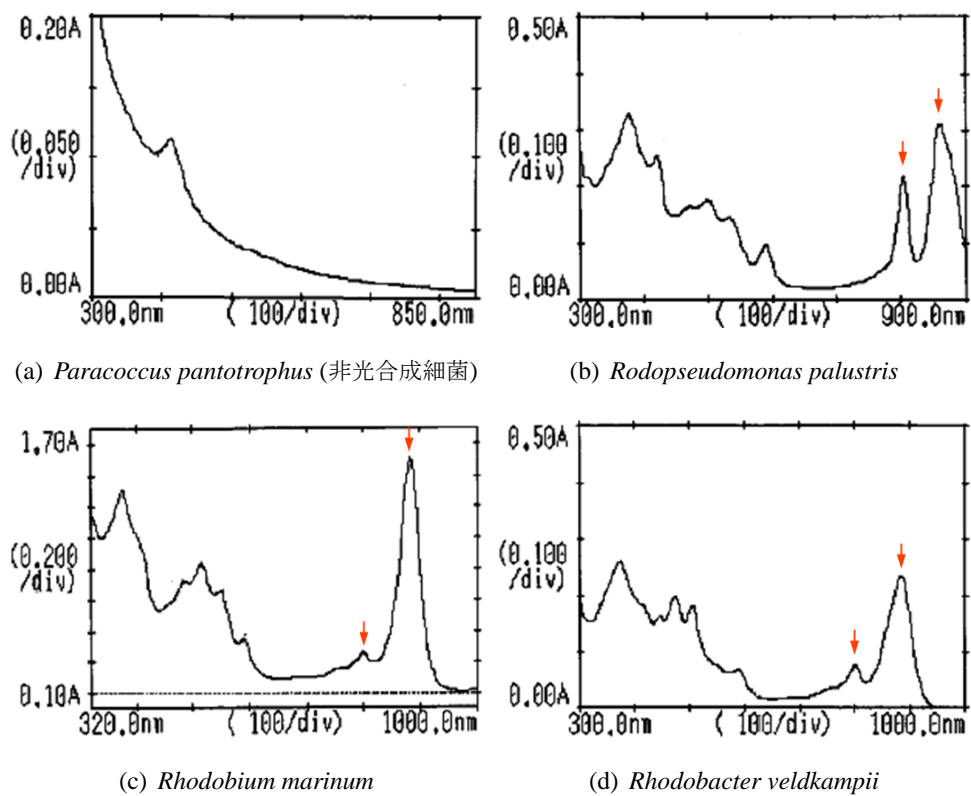


図 3.3 分光光度計により計測した吸光度スペクトル

### 3.4 分光画像計測による微生物種の判別

実験は直径 1 ~ 2 [mm] 程度の大きなコロニーを対象とした場合と、直径 ~ 数百 [ $\mu\text{m}$ ] 程度のマイクロコロニーを対象とした場合の、二段階に分けて行った。

まずは吸収特性を明確に捉えることが可能な、大きなコロニーを対象とした実験で、手法の確立と有効性の確認を行い、次にマイクロコロニーを対象とした実験により、どの程度の大きさまで本手法が適用可能かを調べることで、迅速検査への応用可能性を検討した。なお、測定に用いた顕微鏡を含めた光学系がそれぞれの実験で異なること、大きなコロニーとマイクロコロニーでは極端に吸収の大きさが異なっており、分光特性 (吸光度特性) を同一視することは困難であることから、検出や菌種の識別に用いる推定モデルは、それぞれの実験で別々に作成した。

### 3.4.1 実験条件

分光画像の計測は、顕微鏡と AOTF(Acoust-Optic Tunable Filter; 音響光学可変波長フィルタ)、CCD カメラを用いて行った。測定波長範囲は、バクテリオクロロフィルによる特徴が現れる、 $\lambda = 750 \sim 946$  [nm] の範囲に絞り、波長間隔は 2 [nm] とした。

使用した実験装置の詳細と構成を、表 3.1 および図 3.4 に、計測条件を表 3.2 に示す。

表 3.1 実験装置一覧

顕微鏡	Nikon SMZ-10 Nikon LABOPHOT-2
光源	ハロゲンランプ (透過, 顕微鏡内蔵)
可変分光フィルタ (AOTF)	Brimrose 社, CVA100-0.4-1.0
近赤外冷却 CCD カメラ	浜松ホトニクス, ORCA-ER-1394 システム

計測対象は、単一種類の既知の菌を寒天培地上に純粋培養し、コロニーを発現させたものとした。

分光画像計測は透過計測で行い、対象とするコロニーが含まれるシーン  $T(x, y, \lambda)$  の他に、コロニーが視野に含まれない、背景 (培地) のみのシーン  $T_0(x, y, \lambda)$  をリファレンスとして計測した。この 2 つの分光透過強度画像から、次式により吸光度画像  $A(x, y, \lambda)$  への変換を行った。

$$A(x, y, \lambda) = -\log_{10} \frac{T(x, y, \lambda)}{T_0(x, y, \lambda)} \quad (3.1)$$

式 (3.1) の変換により、光源むらによる影響 (画素値の空間的な不均一性) がキャンセルされると同時に、培地の成分によるスペクトルの影響も除去され、コロニーの吸光度特性のみが残ることになる。

また、吸光度  $A(\lambda)$  は、吸収物質の吸光係数を  $\epsilon(\lambda)$ 、吸収物質の光路長 (厚さ) を  $d$ 、吸

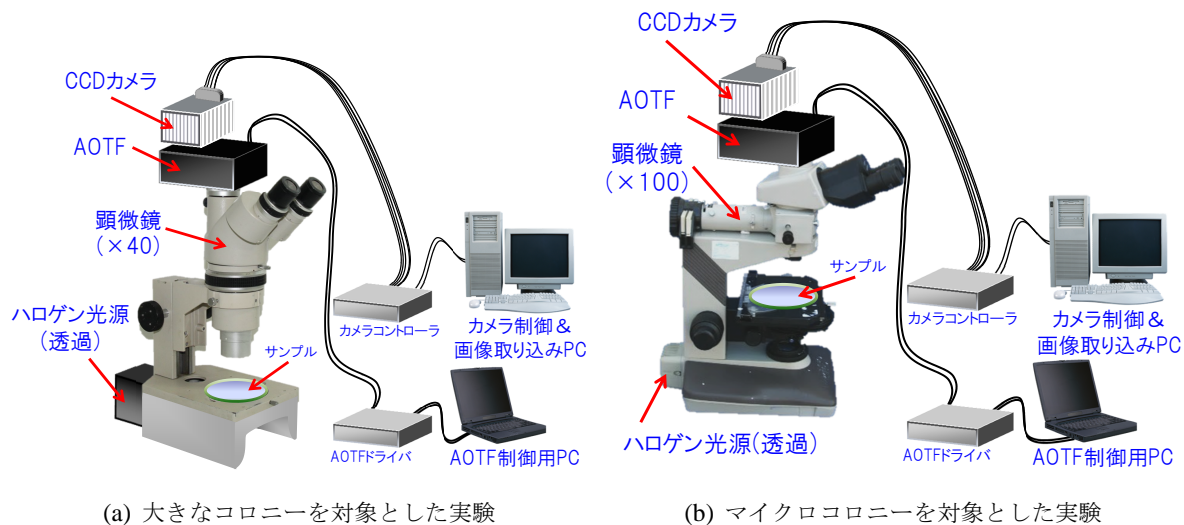


図 3.4 実験装置の構成

表 3.2 計測条件

(a) 大きなコロニーを対象とした実験		(b) マイクロコロニーを対象とした実験	
顕微鏡	Nikon SMZ-10	顕微鏡	Nikon LABOPHOT-2
室温	24 ~ 25 [°C]	室温	24 ~ 26 [°C]
対物レンズ	4 倍 (ズームレンズ)	対物レンズ	10 倍 (PLAN Apo)
波長範囲	750 ~ 946 [nm]	波長範囲	750 ~ 946 [nm]
波長間隔	2 [nm]	波長間隔	2 [nm]
Binning	4 × 4	Binning	4 × 4
⇒ 画像サイズ	⇒ 336 × 256 [pixel]	⇒ 画像サイズ	⇒ 336 × 256 [pixel]
露光時間	200 ~ 600 [ms]	露光時間	30 ~ 40 [ms]
コロニー直径	約 0.2 ~ 2.1 [mm]	コロニー直径	約 50 ~ 300 [μm]

収物質のモル濃度を  $c$  とすると、Lambert-Beer の法則より、次式の関係がある。

$$A(\lambda) = \epsilon(\lambda)cd \quad (3.2)$$

即ち、光路長を一定とすれば、吸光度は吸収物質の濃度に比例する。また、複数の吸収物質が存在する場合も、

$$A(\lambda) = \sum_{i=1}^n \epsilon_i(\lambda)c_i d \quad (3.3)$$

として単純な和で表すことが出来るという利点がある。

本実験の解析は、この吸光度画像を用いて行った。

### 3.4.2 解析の流れ

菌種の識別は、計測された分光画像の個々のピクセルについて、吸光度スペクトルを用いた判別分析により推定することで行った。

まずは、吸光度画像を波長方向に平均して作成した平均吸光度画像を用い、目視により手動でコロニー領域と背景領域を選択することで正解値 (菌種) とする判別結果を作成した。ひとつのサンプル (シャーレ) 内に存在するコロニーの菌種は 1 種類であり、既知であるため、この手順によって正解値の作成が可能である。なお、コロニーであるか、背景であるかが曖昧な部分は選択せず、この領域は評価にも使用しない。ここで、背景領域を 1、*Paracoccus pantotrophus* を 2、*Rodopseudomonas palustris* を 3、*Rhodobium marinum* を 4、*Rhodobacter veldkampii* を 5 ととして番号を割り付け、マスクを作成した。このデータは、評価値を計算する際にも使用する。

次に、判別器を構成するための訓練データを作成した。訓練データは、吸光度と正解値 (菌種) の組であり、これは各菌種ごとに最も大きなコロニーを選び、そのピクセルから抽出した吸光度と、先ほど割り付けた番号を対応付けることで作成した。

この訓練データから、線形判別分析モデルを作成し、計測した分光画像データに対してピクセルごとに判別を行うことで、コロニーの識別を行い、正解値と比較することで評価を行うのが基本的な流れである。

なお、事前の解析により、1～5 番の判別を一度に行った場合、特に背景部分を何らかの菌部分と誤判別するケースが多いことが分かった。そこで、すべての判別を一度に行わず、まずは背景部分と菌部分の分離を行い、その後分離された菌部分のみに対して 2～5 番の何らかの菌に判別するという二段階に分けることで、精度の改善を行った。

この分離は、平均吸光度と、吸光度スペクトルの標準偏差に着目して行った。一般に、菌部分は背景に比べて吸収が強い。しかし、光源の影響やコロニー内での光の屈折が原因で、見かけ上背景よりも吸光度が小さく計測される場合がある。標準偏差はそれを補うものであり、背景には吸収ピークが存在しないのに対し、菌部分には吸収ピークが存在するため、標準偏差の値が大きくなることを利用する。この 2 つのパラメータから、2 次判別関数による判別分析により、背景と菌の分離を行った。

さらに、判別結果の改善手法として、孤立点の除去を加えた。これは、事前の解析により、結果画像にごま塩ノイズ状の誤判別領域が含まれることがあったことから、これを除去するものである。この誤判別領域は、周囲から孤立しており、まとまって存在していなかったこと、本来このような分布は考えにくいことから、多数決フィルタ演算による孤

立点の除去を行った。フィルタサイズは、注目画素を中心とする  $5 \times 5$  の正方形として行った。

以上の解析の流れをまとめると、図 3.5 のようになる。

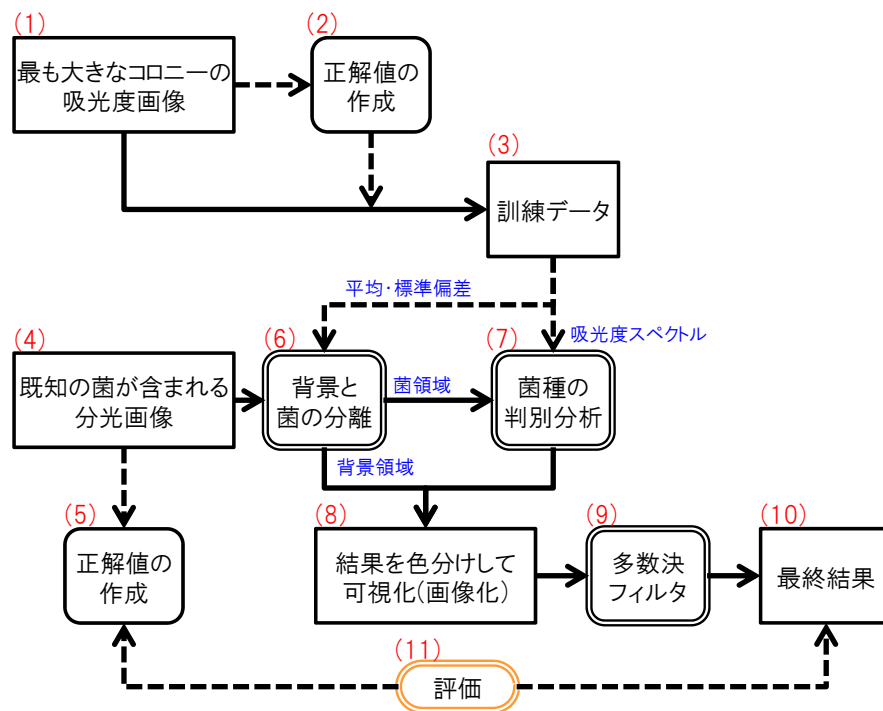


図 3.5 解析の流れ

### 3.4.3 評価方法

評価値はコロニーの検出と、菌種の識別について、それぞれ定義した。

まず検出では、ある菌  $x$  について、正しく菌  $x$  と判別されたピクセルの数を  $n_{11}$ 、菌  $x$  以外の別の菌と判別されたピクセルの数を  $n_{12}$ 、背景領域について、正しく背景と判別できたピクセルの数を  $n_{23}$  としたとき、これらを全て正解とした。(表 3.3 および図 3.6 も参照。)

ここで、コロニー面積と背景の面積が常に同程度であれば、検出率を全面積に対する割合として、

$$D_{all} = (n_{11} + n_{12} + n_{23}) / (n_{11} + n_{12} + n_{13} + n_{21} + n_{22} + n_{23}) \quad (3.4)$$

と定義出来るが、実際にはシーンによってコロニーと背景の面積は大きく異なる。従って、この定義では、仮にコロニー領域が全て背景と誤判別されても、正解値のコロニーの面積が小さければ、 $D_{all}$  は高くなってしまう問題がある。

そこで、コロニー部分と背景部分でそれぞれ検出率  $D_{colony}$ 、 $D_{bg}$  を求め、その平均値を評価値「検出率  $D$ 」と定義した。

$$D_{colony} = (n_{11} + n_{12}) / (n_{11} + n_{12} + n_{13}) \quad (3.5)$$

$$D_{bg} = n_{23} / (n_{21} + n_{22} + n_{23}) \quad (3.6)$$

$$D = (D_{colony} + D_{bg}) / 2 \quad (3.7)$$

同様に、評価値「識別率  $C$ 」は、以下の式により定義した。

$$C_{colony} = n_{11} / (n_{11} + n_{12} + n_{13}) \quad (3.8)$$

$$C_{bg}(= D_{bg}) = n_{23} / (n_{21} + n_{22} + n_{23}) \quad (3.9)$$

$$C = (C_{colony} + C_{bg}) / 2 \quad (3.10)$$

表 3.3 混同行列 (Confusion Matrix)

		判別結果		
		菌 x	他の菌	背景
正解値	菌 x	$n_{11}$	$n_{12}$	$n_{13}$
	背景	$n_{21}$	$n_{22}$	$n_{23}$

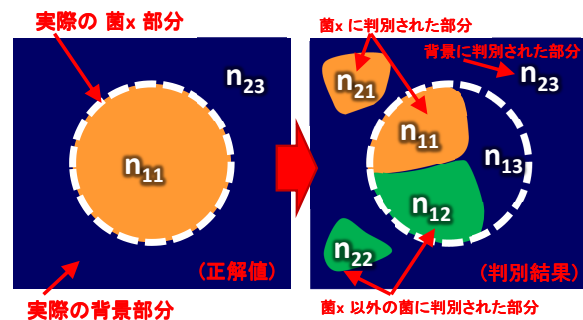


図 3.6 判別結果のイメージ

### 3.4.4 計測結果

図 3.7、3.8 に、訓練データに使用したコロニーについて作成した正解値と、割りつけた番号について示す。前述の通り、大きなコロニー用とマイクロコロニー用の判別器を別々に作成するため、訓練データはそれぞれで作成する。

図 3.7、3.8 に示した各領域から抽出し、判別分析の訓練データとして使用した吸光度スペクトルの平均を、図 3.9 に示す。マイクロコロニーでは、大きなコロニーの吸光度に比べて全体的に吸収が小さく、またピークもあまり目立たないなど、特徴が大きく異なっており、それぞれの光学系 (倍率、光源の違いを含む) ごとの判別器の作成は妥当であると言える。

### 3.4.5 判別結果とまとめ

計測した分光画像を元に、各ピクセルの吸光度スペクトルを用いて、背景と菌の分離、菌種の判別、孤立点の除去までを行った最終結果の例を、それぞれの正解値画像とともに図 3.10 に示す。



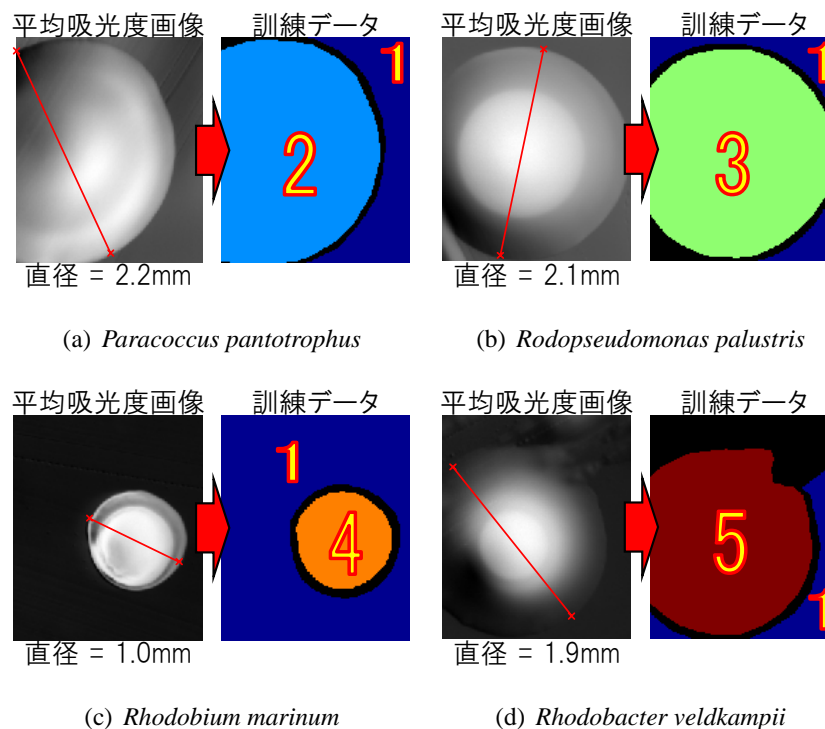


図 3.7 正解値の作成と訓練データ (大きなコロニー)

大きなコロニーでは、ほぼ解答と一致する結果が得られていることが確認できる。誤判別のある部分は陰のように見える部分とそうでない部分の境界付近に多く見られた。また、菌領域であると識別された領域について、他の種類の菌であると誤判別された領域は極めて小さく、背景と菌の分離の後の、菌種の判別は十分に可能であることが確認できた。

一方、小さなコロニーでは、大きなコロニーの場合に比べて誤判別の領域が大きくなるが、全ての判別結果において、背景が菌であると誤判別された部分はほぼ 0 [%] であった。即ち、検出率が 50 [%] を僅かに超えてさえいれば、例えば 60 [%] 程度であっても、判別結果の画像を見れば、「そこに菌が存在する」ことは容易にわかるといえる。

図 3.11 に、大きなコロニーとマイクロコロニーの結果をまとめて、コロニーサイズに対する検出率と判別率を示した。菌種により差があるが、検出であれば 100 ~ 150 [nm] 程度から可能であることが分かる。また、どの菌種についても、コロニーの直径が 300 [ $\mu\text{m}$ ] 以上あれば、80 [%] 以上の高い識別率で、菌種の識別が可能であることが分かる。

### 3.5 本章のまとめ

本章では、微生物自体が持つ分光特性に着目し、分光画像計測で得た詳細なスペクトル情報と、判別分析を用いた手法により、コロニー単位での検出とその種類の識別が可能で



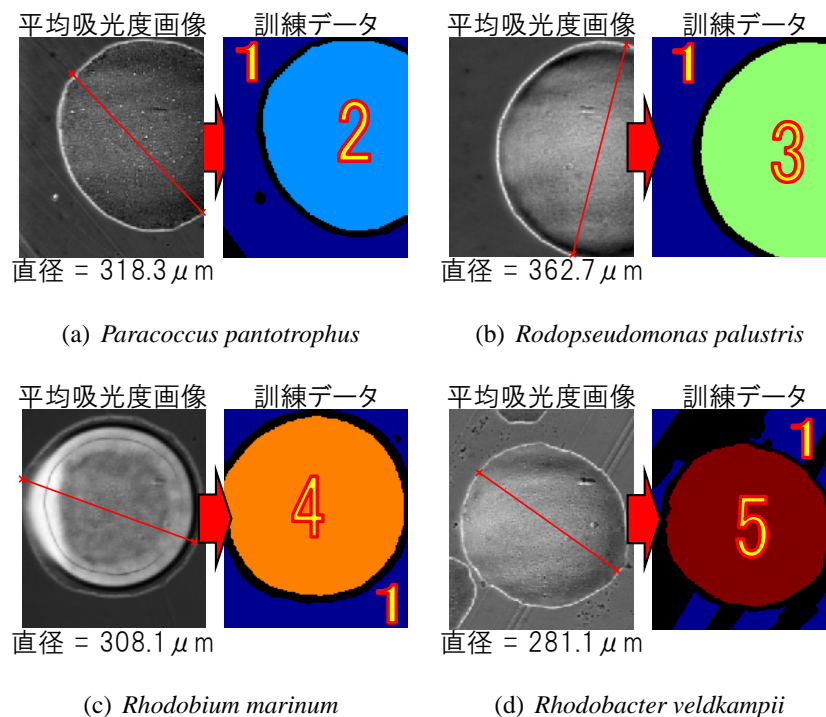


図 3.8 正解値の作成と訓練データ (マイクロコロニー)

あることを示した。

本手法では、予め想定した 4 種類の菌について、検出であれば、直径 100 ~ 150 [ $\mu\text{m}$ ] 程度、菌種の識別であれば、直径 300 [ $\mu\text{m}$ ] 程度まで可能であることを確認した。従って、直径 数百 [ $\mu\text{m}$ ] 程度のマイクロコロニーに対しても、十分適用可能であるといえる。

このことは、図 3.12 に示すように、分光光度計を用いた従来の手法に比べて、極めて迅速に検出・識別が可能であることを意味する。また、純粹分離や遠心分離などが不要となり、人手による操作の手間を大幅に省くことも可能となる。さらに、非破壊で、そのままの状態 (*in-situ*) での検査が可能であるという大きな特徴がある。この特徴を活かし、例えば、各菌の増殖の様子をリアルタイムでモニタリングするなど、これまでの破壊的な手法では不可能であった計測が本手法によって実現できるため、研究用途への応用も期待できる。

本手法では、微生物自体が持つ分光特性を利用することで菌種の識別を実現したが、小さなコロニーになるほど吸収が小さく、より透明となるため、微生物自体の吸収特性を捉えることは困難となる。

次章では、実際に飲料製品の品質を劣化することで問題となっている微生物を具体的なターゲットとして、より迅速な、即ちより小さなコロニーの検出を目的とした手法について述べる。

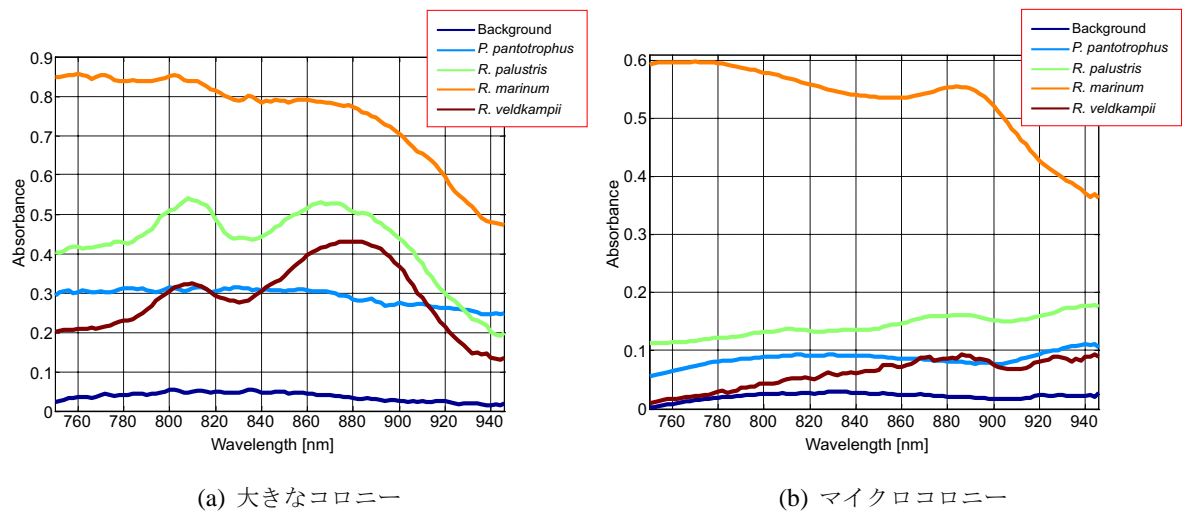


図 3.9 コロニーの平均吸光度スペクトル (訓練データ)

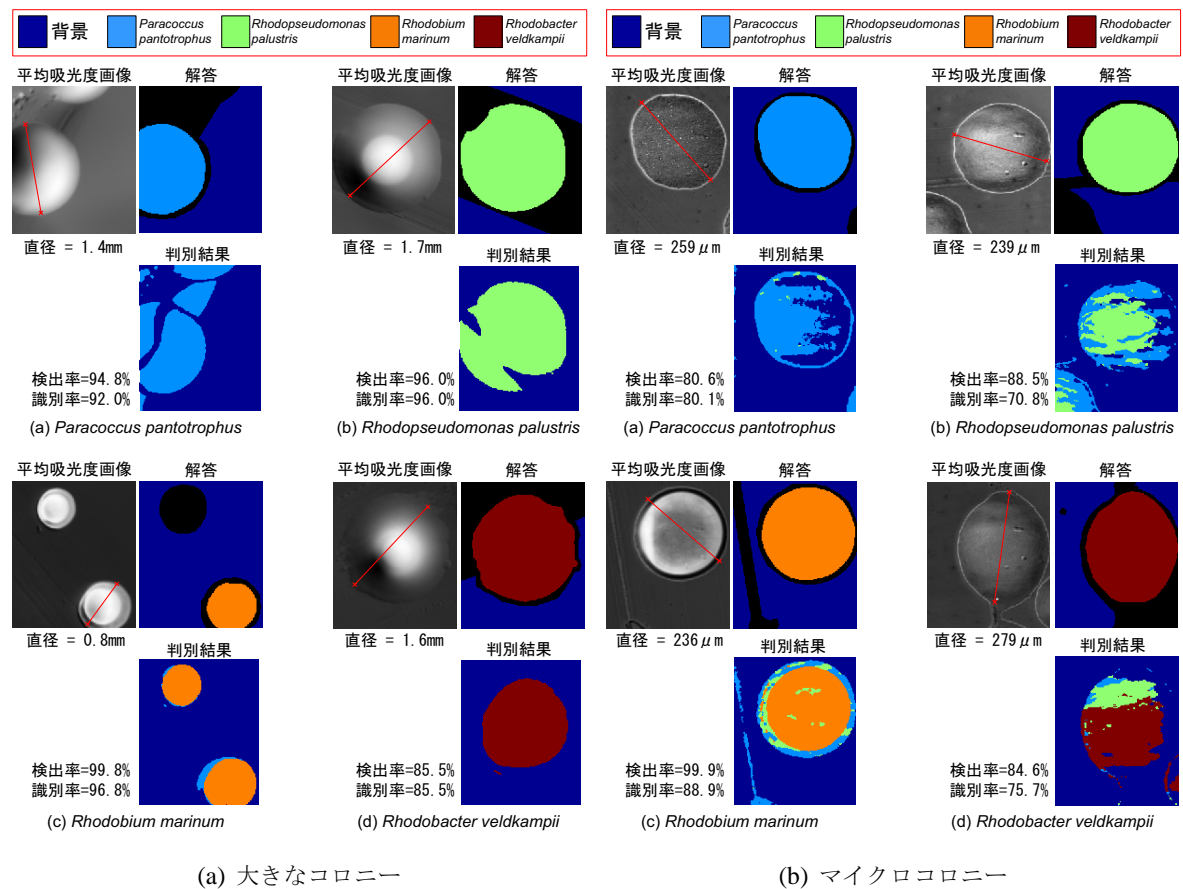


図 3.10 判別結果の例

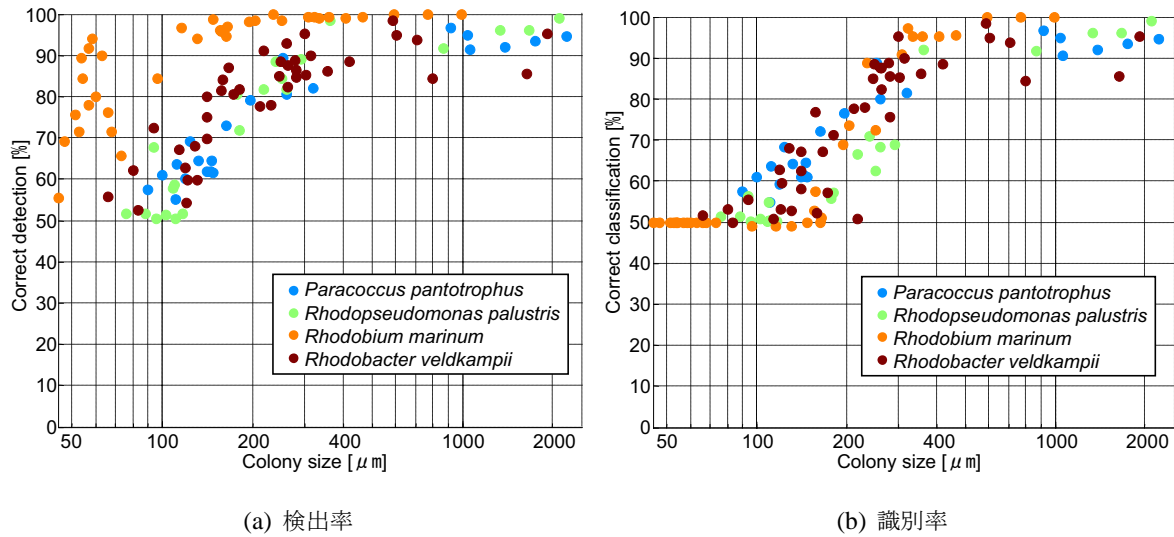


図 3.11 コロニーサイズに対する検出率と識別率

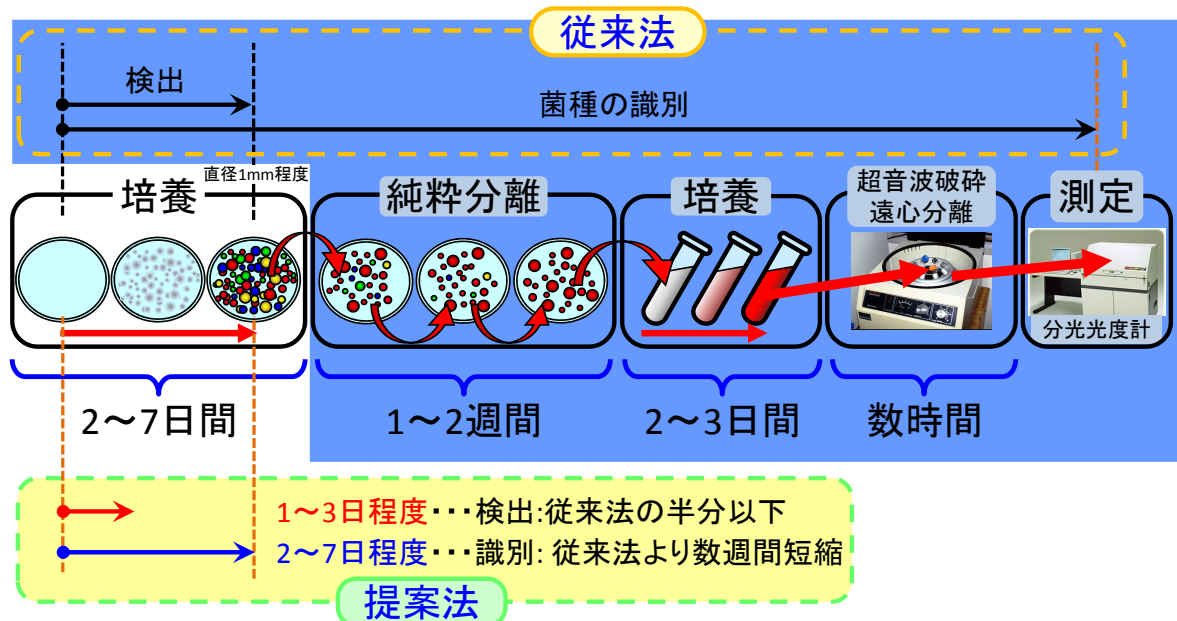


図 3.12 検出・識別時間の短縮



## 第 4 章

# 分光特性に基づいた光源の選択と 微生物の迅速検出への応用

### 4.1 本章の概要

第 3 章では、微生物を対象として、対象そのものが持つ詳細な分光特性に着目し、空間的に分布する微生物の種類を、コロニー単位で識別することを目的とした。この方法では、一定の条件下での菌の非破壊モニタリングなどの特定の用途や、研究手段として、これまでに不可能であった計測を可能にするが、分光画像計測装置が必要であることから、一般に高コストとなる問題がある。

本章では、比較的狭帯域の LED(Light Emitting Diode; 発光ダイオード) 光源が持つ分光特性をそのまま用いることで、AOTF 等の特殊で高コストな可変分光デバイスの使用や、多数の干渉フィルタ切り替えによる分光計測のように機械的な可動部を含む複雑な構成を用いることなく、電気的な ON/OFF のみで計測を可能にするシンプルなシステムの開発を行う。近年、LED 光源の分光放射特性を用い、光源側での分光による汎用の分光画像計測装置として、例えば 20 種類のハイパワー LED と積分球を用いた計測装置が製品化されている [30]。

本章では汎用的な分光画像計測手法ではなく、検出対象を具体的に定めた上で、予め詳細に計測した対象の分光特性と LED 光源の分光放射特性を基に、その検出に特化した最適な LED 光源の選択を行う。これにより、分光的な特徴を十分に活かした、シンプルかつ極めて低コストな計測を実現する。

## 4.2 分光特性に基づいた光源選択手法の原理

光源として使用する LED 選択の基本的な考え方は、以下の通りである。まず、対象および背景の分光反射率を計測し、候補とする LED 光源の分光放射輝度から各 LED 下での反射光の分光強度を計算する。次に、計算された各 LED 下での反射光強度値を複数組み合わせることで計算した評価値から、対象とそれ以外の部分のコントラストを最も大きく出来る複数の LED を選択する。

具体的には、2 種類の LED 光源を用いることを想定し、以下のように定式化した。まず、標準白色板 ( $I_{ref}(x, y, \lambda)$ ) と、検出対象と背景が含まれるシーン ( $I_{obj}(x, y, \lambda)$ ) の分光画像計測を行い、以下の式により分光反射率画像  $R_{obj}(x, y, \lambda)$  に変換する。

$$R_{obj}(x, y, \lambda) = \frac{I_{obj}(x, y, \lambda)}{I_{ref}(x, y, \lambda)} \quad (4.1)$$

ここで、 $(x, y)$  は空間座標、 $\lambda$  は波長を示す。式 (4.1) の変換により、各ピクセル値は 0 ～ 1 の範囲に正規化され、画像中の光源むらの影響も除去される。

次に、反射率画像  $R_{obj}(x, y, \lambda)$  の中から、検出対象の部分と背景の部分について、それぞれ領域を抽出して平均の分光反射率  $R(\lambda)$ 、 $R_0(\lambda)$  を求める。この時、カメラの分光感度特性を  $S(\lambda)$ 、 $i$  番目の LED の分光放射特性を  $I_i(\lambda)$  とすれば、 $i$  番目の LED 照射時の検出対象部分および背景部分の (平均的な) カメラ出力値  $C_i$ 、 $C_{0i}$  は、以下の式で求められる。

$$\begin{aligned} C_i &= \int I_i(\lambda) R(\lambda) S(\lambda) d\lambda \\ C_{0i} &= \int I_i(\lambda) R_0(\lambda) S(\lambda) d\lambda \end{aligned} \quad (4.2)$$

同様に、もう一種類の  $j$  番目の LED 照射時のカメラ出力値を  $C_j$ 、 $C_{0j}$  とする。

ここで、検出対象部分だけは 2 つの照明でカメラ出力値間に大きな差が生じ、逆に背景部分では 2 つの照明でカメラ出力値間の差がほとんど無くなるような照明の選択を考え、下記に示す評価関数  $v$  を定義した。

$$v = \frac{C_i/C_j}{C_{0i}/C_{0j}} = \frac{C_i \times C_{0j}}{C_j \times C_{0i}} \quad (4.3)$$

式 (4.3) において、 $j$  番目の LED 下に比べて、検出対象部分では  $i$  番目の LED 下でのカメラ出力値がより大きいほど、逆に背景部分では  $i$  番目の LED 下ではより小さいほど、評価値  $v$  は大きくなる。また、LED の分光放射特性  $I_i(\lambda)$ 、 $I_j(\lambda)$  は、絶対値 (分光放射輝度) であっても、最大値を 1 として正規化したような相対値であっても、評価値  $v$  は同

一となる。この評価関数  $v$  を最大化する 2 つの LED  $i$  と  $j$  の組を、検出に最適な照明として選択する。

次節では、本手法の実問題への応用例として、微生物の検出装置に適用した結果について述べる。

## 4.3 微生物リスクに関する研究背景

近年、輸入食品に混入された農薬の検出 (2007 年、2008 年)、乳製品による集団食中毒事件 (2000 年)、重症者・死亡者が出た肉の生食による食中毒事件 (2011 年)、多数の死者を出した腸管出血性大腸菌 *O-157* の汚染による、浅漬製品による集団食中毒事件 (2012 年) など、消費者に身近な食品に重大な事件・事故が多発している。また、2011 年の東日本大震災 (東北地方太平洋沖地震) を発端とした原子力発電所の事故は、これまで注目されることの少なかった、食品を介した内部被曝への懸念という新たな問題を引き起こした。以上のような、事件・事故を背景に、社会における食の安全・安心に対する意識と関心は、これまでに無いほどに高まっている。

実際、日本政策金融公庫の調べ (2011 年 9 月発表) によれば、「今後の食の志向」として、「安全志向」が非常に高まっていることが分かる (図 4.1)[31]。さらに、厚生労働省の調べ (2012 年 3 月発表) によれば、2011 年中に発生した食中毒の原因となった病因物質は、微生物 (細菌とウイルス) によるものが圧倒的に多く (図 4.2)、患者数で全体の 91 [%] に達する [32]。従って、食品や飲料製品の製造・加工現場では、様々なリスクの中でも、微生物の迅速な検出が非常に重要であるといえる。

製造者側の立場から見れば、一度でも事故を起こした場合、社会的に与えるマイナスイメージは甚大であり、その業者が手がける全ての商品にまで、さらには他の企業の同様の製品全体にまで影響が及ぶことも珍しくないなど、影響が非常に大きい。例えば農林漁業金融公庫による購買行動に関する調査 [33] によれば、細菌汚染の問題が報じられた場合、「当該商品は買わないが、他の商品は買う」がわずか 24.3 [%] で、「当該商品以外もその業者の商品は買わない」が 75.7 [%] と 3/4 以上を占める。また、安全性が確認された後でも、「しばらく当該商品は買わない」が 57.3 [%] で、「ずっと買わない」との回答も 19.9 [%] を占め、影響が長く続くことを示唆する。一般的に、技術的・科学的な「安全」は、必ずしも社会的・心理的な「安心」とイコールではないと言われるが [34, 35]、特に食品に関する意識としてはその図式は明白であり、消費者は非常に敏感な購買行動を起こすことが窺える。

以上のような背景から、従来の後追いの検査方式だけではなく、食品事故を“未然に”防ぐための手法として、HACCP(Hazard Analysis and Critical Control Point; 危害分析重要管理点) システム [36] を取り入れる業者も増加している。これまでの食品業界の衛生管理

手法は、製造工程中の汚染原因となる微生物をいかに排除し、増殖させないかに細心の注意を払いつつ、出来上がった製品を事後的に抜き取り検査によってチェックするという方式であった。このような事後的チェック（主に微生物学的・化学的検査）では、時間がかかりすぎ、検査結果の判明が製品の出荷後であったりするなど、決して現実的、効率的ではなかった。これに対し、HACCPは農場から食卓まで一貫して食品の安全性を確保するための重要な手法の一つとして、近年特に注目されている食品の衛星管理手法であり、全ての製造工程において重点的に、かつプロセスごとに順次チェックを行う「プロセス・チェック方式」を採用したものである。この方式の重要な特徴は、工程ごとにモニタリングを行うことでリアルタイムで品質管理をし、重要管理点での効率的なチェックと管理が行われるという点にある。食品の場合は工業製品と異なり、最終製品の全数検査は不可能であるため、このシステムが適しているといわれている。

いずれの方式においても、微生物の検査は必須であり、早期に発見できれば、それだけ被害を限定的にすることが可能である。汚染の判明が製品出荷後であるか、出荷前であるかは、事故に発展するかどうかという意味で非常に重要だが、特に大量生産の行われる工場では、出荷前であっても、時間を追うごとに汚染が拡大するため、大量の中間製品の廃棄、ラインの洗浄と停止などに伴う経済的な損失が著しく増加することになる。逆に言えば、少しでも早く汚染が判明すれば、損害はかなり抑えられることになる。このようなことから、大量生産・大量輸送が行われる今日では、微生物を迅速に検査する技術が、以前にも増して強く求められている。

## 4.4 検出ターゲットとする微生物とその検査技術

検出対象とする微生物として、飲料製品の品質を劣化することから、汚染が問題となっている *Alicyclobacillus* 属細菌を選択した。この菌は、耐熱性好酸性細菌として知られ、主に酸性の果実・果汁を原料とした飲料等の製品において、その汚染が問題となっており、迅速で確実な検出が課題となっている。

なお、現在の画像計測を用いた汎用のコロニー検出装置の検出限界が、直径 0.05 ～ 0.3 [mm] 程度であることから [37]、本研究では、直径 100 [ $\mu\text{m}$ ] 以下のマイクロコロニーを検出目標とした。

### 4.4.1 *Alicyclobacillus* 属細菌の特徴

*Alicyclobacillus* 属細菌の最も重要な特徴は、耐熱性好酸性細菌と呼ばれるとおり、高温・酸性環境下で生育するという点である。この性質を持つため、市販酸性飲料中の芽胞は一般的な酸性飲料の殺菌方法（90 ～ 95 [°C] , 15 ～ 20 [sec]）では殺菌できず [38]、りんご



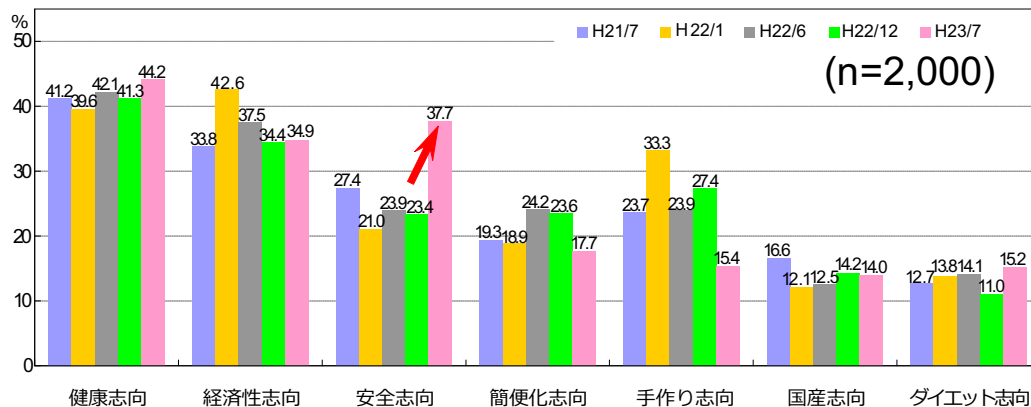


図 4.1 今後の食の志向 (日本政策金融公庫、2011 年 9 月発表資料 [31] より作成)

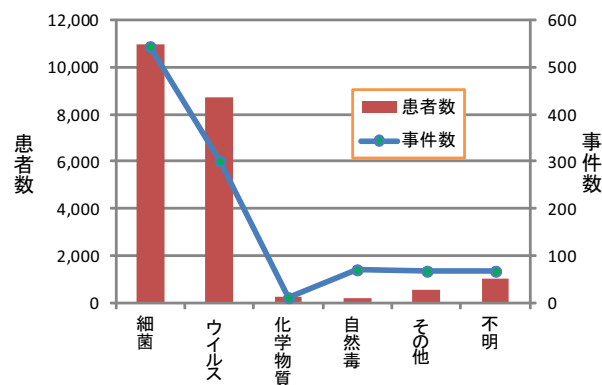


図 4.2 2011 年中に発生した食中毒の病因物質 (厚生労働省、2012 年 3 月発表資料 [32] より作成)

ジュースやオレンジジュース等の飲料製品中で増殖する [39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46]。*Alicyclobacillus* 自体には病原性はないが [47]、異臭の原因となるグアイアコールを産出する種が存在し、これが飲料等の製品品質を劣化させる原因となる [48]。また、ガス非産生菌であるため、製品中で増殖した場合でも、容器の外観には膨張等の変化が見られない。さらに、非常に少ない数の芽胞が混入しただけで、品質を著しく劣化するのに十分な異臭を引き起こす場合がある [48, 49, 50, 51]。

現在で *Alicyclobacillus* 属細菌は 9 種 (1 亜種を含む)、2 遺伝種および 1 提案種が確認されており、一般的な形状は幅  $0.7 \sim 1 \mu\text{m}$ 、長さ  $3 \sim 5 \mu\text{m}$  の桿状である (桿菌)。運動性はあまり見られず、栄養細胞の末端側に耐熱性の芽胞を形成する [52, 53]。

コロニーは YSG 寒天培地上で  $2 \sim 5 \text{ mm}$  程度 (さらに大きくなる場合もある) に生育する。基本的には丸い形状となり、色調は白～ベージュ色 (培養後期には若干色調が濃くなる) で、光沢はほとんどない [38]。寒天培地表面に成長し、寒天内部ではあまり旺盛に生育しない ( $1 \text{ mm}$  程度)。

生育温度域は  $25 \sim 60 [^{\circ}\text{C}]$ 、pH 域は  $\text{pH}2.5 \sim 6.0$  (至適生育温度は  $40 \sim 60 [^{\circ}\text{C}]$ 、至適

生育 pH 3.5 ~ 4.5) という酸性の環境下で良好な発育を示す [49, 54, 55]。好気性であり、酸素がなくなると生育 (増殖) が止まる。しかし、微量の酸素でも生育可能である。酸素が無い場合、例えば栄養素が豊富であっても、徐々に栄養細胞は死滅し、最終的には芽胞だけが残る。

また、アルコール耐性があり、芽胞はほとんどアルコールの殺菌作用を受けない<sup>\*1</sup>。高い水分活性条件下 ( $A_w = 0.9$  以上<sup>\*2</sup>) でなければ発育できないと考えられており、果汁飲料においては Brix 10% 前後<sup>\*3</sup>であれば生育がみられ、Brix 18 ~ 25% が上限である。しかし、Brix 60% 以上、例えば冷凍濃縮果汁においても、増殖はしないが芽胞は死滅しない。しかも、高い Brix 条件下ほど、芽胞の耐熱性は上昇する。そのため、濃縮果汁中の芽胞の殺菌は 100% 果汁より困難である。また、芽胞は低温に対しても極めて安定であるため、氷点下以下を保持するような設備においても、二次汚染の原因となる可能性がある。なお、近年の研究では、りんご表面における *Alicyclobacillus* 芽胞に対し、二酸化塩素ガスを適用することで、抑制効果が確認されたという報告 [56] や、りんごジュース中の *Alicyclobacillus* 芽胞に対する高温高压による抑制効果に関する報告 [57] などがなされている。

#### 4.4.2 汚染事故の事例

*Alicyclobacillus* 属の細菌を原因とする製品事故は、りんご果汁飲料製品に異臭と濁りを生じた、1982 年の西ドイツの事故事例 [58] が最初とされる。その後も、*Alicyclobacillus* 属の細菌が関与した変敗事故は、散発的に報告されていたが、近年になって、日本を始め世界中で汚染が報告されるようになり、飲料変敗の原因菌として注目されるようになった。その理由としては、地球の温暖化、酸性雨、大量生産などが関与していると言われていたが、いずれも推測の域を出ない。報告されている主な汚染事故の事例を、いくつか以下に示す [38]。

- 1982 年 無菌充填りんご果汁で大規模な汚染事故 (ドイツ)
- 1989 年 酸性飲料での変敗事故 (日本)
- 1990 年, 1995 年 40% りんご果汁で異臭問題 (オーストラリア)
- 1991 年 変敗事故の報告 (日本) …以降日本でも注目を集めるようになった
- 1997 年 25% トロピカルフルーツドリンクから高濃度のグアイアコール検出 (オーストラリア)。汚染源はりんご果汁

<sup>\*1</sup> 6 [%] 以上のアルコール (エタノール) が存在すると生育が阻害されるという報告はある。

<sup>\*2</sup> 水分活性 ( $A_w$ ): 食品を入れた密封容器内での蒸気圧  $P$  とその温度における最大水蒸気圧  $P_O$  との比を示したもので、 $A_w = P/P_O$  と表される。

<sup>\*3</sup> 可溶性固形分濃度 (Brix): 水溶液の中に含まれる可溶性固形分の重量パーセント濃度。

### 4.4.3 微生物の検査手法について

*Alicyclobacillus* 属細菌の迅速検出法として、DNA 情報に基づく PCR(Polymerase Chain Reaction) 法を用いた手法 [59, 60, 61, 62, 63] が提案されている。これらの手法は、正確に *Alicyclobacillus* 属細菌を同定できる一方で、DNA の抽出プロセスや、分子生物学的な知識と操作に関する技術、設備が不可欠である。また、定量が難しいことや、生菌と死菌の区別がつかないという原理的な短所がある。

産出されるグアイアコール等の異臭原因物質を検出する手法 [39, 50, 51] など提案されている。この手法も、化学的な知識と操作に関する技術、設備が不可欠である。

また、微生物を検出する手法として、画像計測を応用した手法が提案されている。例えば、カラーカメラを使用した手法 [64]、分光カメラを用いた手法 [65]、形状の経時的な変化に着目した手法 [66]、あるいはコロニーの影を捉える手法 [67] などである。菌などの微視的な量の定量とその変化を捉えることが可能な手法として、近年、定量位相顕微鏡を用いた手法も応用され始めた [68, 69, 70]。

本研究では、画像計測を利用する手法のひとつとして、簡易・低コストな光学系で、より高い検出感度を目指す。

### 4.4.4 微生物の増殖について

最適な条件下の液体培地中で、微生物の培養を行った場合、増殖の様子は、一般に図 4.3 のようになる [71]。この図のように、生菌数を培養時間に対して対数で示した曲線を増殖曲線 (growth curve) と呼び、初めの停滞期 (lag phase)、対数増殖期 (logarithmic phase)、定常期 (stationary phase)、死滅期 (death phase) の 4 期に分けることが出来る。ここで、最も活発な増殖を示す対数増殖期において、以下の式から倍加時間 (DT; doubling time) が求められる。

$$\begin{aligned}
 N_2/N_1 &= 2^{DT(t_2-t_1)} \\
 \log_2 N_2/N_1 &= DT(t_2 - t_1) \\
 \therefore DT &= \frac{\log_2 N_2/N_1}{t_2 - t_1} \quad \left[ \begin{array}{ll} t_1, t_2 & : \text{生菌数を数えた時刻} \\ N_1, N_2 & : t_1, t_2 \text{時点の生菌数} \end{array} \right] \quad (4.4)
 \end{aligned}$$

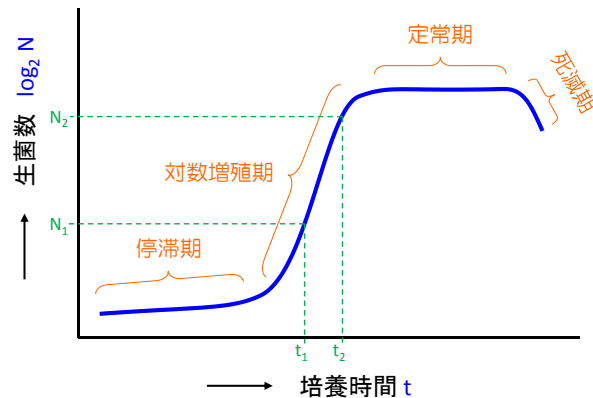


図 4.3 微生物の一般的な増殖曲線

## 4.5 実験 1: LED 光源の選択

### 4.5.1 計測サンプル

早期の検出を行うためには、マイクロコロニーの検出が必要である。しかし、第3章でも述べた通り、マイクロコロニーはほぼ無色透明であり、そのままでは検出が困難である。

そこで、生菌のみに反応する発色試薬を適用し、その反応を捉える構成とすることで、検出感度の向上を狙った。

試薬は、酸化還元系発色試薬の一種である、INT (2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazolium chloride, 和光純薬工業株式会社) を使用した。INT は無色透明だが、生菌の呼吸活性に基づいて反応し、赤紫色を呈する INT ホルマザン (Formazan) に還元される。INT ホルマザンは光に対して安定であり、また細胞の中での拡散が少ない。

計測サンプルとして、2 [mM] の INT を 50 [mL] 添加した LB 培地<sup>\*4</sup>上に *Escherichia coli* (大腸菌; *Escherichia coli* strain IAM 12119<sup>T</sup>) を植菌し、1 [mm] 程度の大きさのコロニーになるまで培養したものを使用した。また、比較のため、INT 試薬を添加しないサンプルも用意した。

### 4.5.2 計測条件

検出対象とする試薬反応部分の分光特性を得るため、サンプルの分光画像計測実験を行った。計測に使用した機器を表 4.1 に、計測装置の配置を図 4.4 に示す。

<sup>\*4</sup> LB 培地の組成: 10.0 [g/L] peptone, 5.0 [g/L] yeast extract, 5.0 [g/L] NaCl, これに 1.5 [%] の agar を添加することで、平板培地としたものを使用。

表 4.1 使用機器

分光画像計測装置	Nuance system for VIS, Cambridge Research and Instrumentation Inc. 計測波長範囲：420 ～ 720 [nm] (波長間隔：10 [nm]) 空間解像度：928 × 688 [pixel]
ハロゲン光源 ×2	Tropical TL-500, LPL Co., Ltd.
白色板	硫酸バリウム ( $\text{BaSO}_4$ ) と光学用石英ガラスで構成

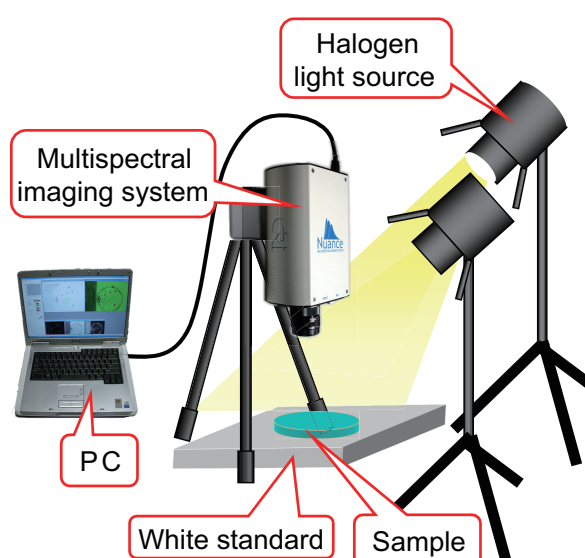


図 4.4 計測装置の配置

### 4.5.3 計測結果と LED 選択

計測した分光画像から、式 (4.1) により反射率に変換し、それぞれの領域ごとに抽出した分光反射率を平均した結果を図 4.5 に示す。INT を適用したサンプルでは、培地部分とコロニー部分で反射率が大きく異なり、特に波長 650 [nm] 以下の領域での吸収が大きい事がわかる。一方、INT を適用していないサンプルでは、コロニー部分においても培地部分とほぼ並行でフラットな分光反射率となっており、特に目立った吸収は見られない事が分かる。

従って、INT の添加により、培地部分とコロニー部分を分光スペクトル上でより明確に分離できることが確認できた。

照明に使用する LED として、図 4.6 に示す分光放射特性を持つ、5 種類の単色 LED(‘B’、

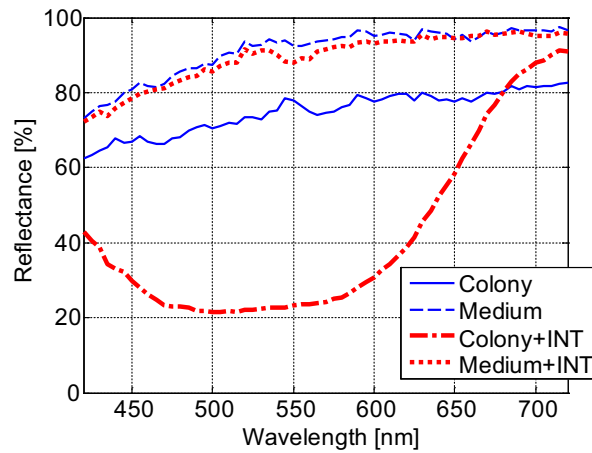


図 4.5 コロニー部分と培地部分の分光反射率計測結果

‘BG’、‘A’、‘O’、‘R’)、および3種類の白色LED(‘NW’、‘DW’、‘WW’)の、合計8種類を候補とした。

ここで、カメラ感度をフラット ( $S(\lambda) = 1$ ) と仮定し、式 (4.2) によりカメラ出力値を計算した結果を図 4.7 に、これらの値から式 (4.3) を用いて、2種類のLEDの全組み合わせについて評価値  $v$  を計算した結果を、図 4.8 に示す。この中で、最も評価値  $v$  が高い組み合わせとなった、‘BG’と‘R’のLEDを選択した。

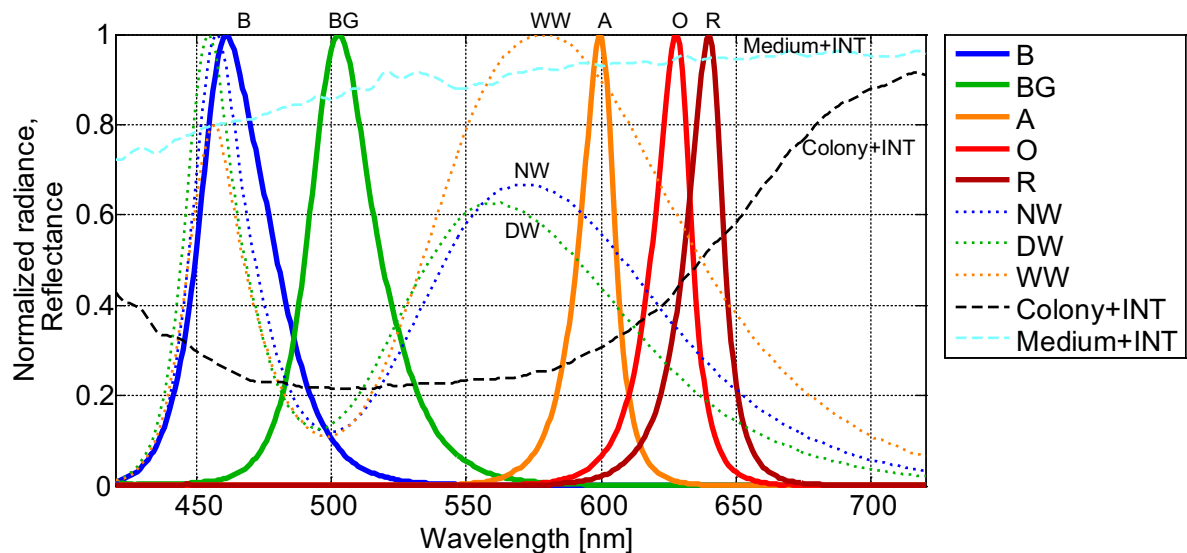


図 4.6 候補としたLED光源の相対分光放射特性

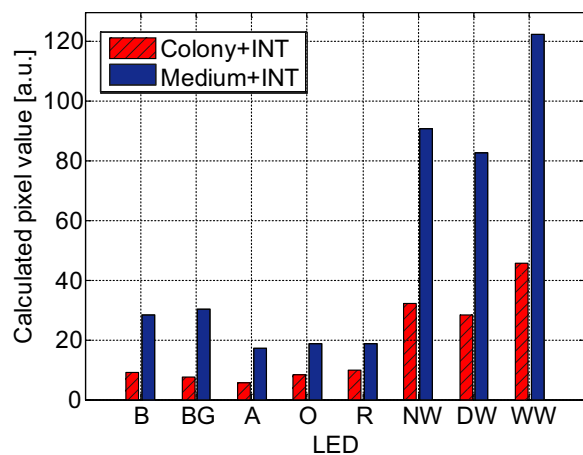


図 4.7 カメラ出力値の計算結果

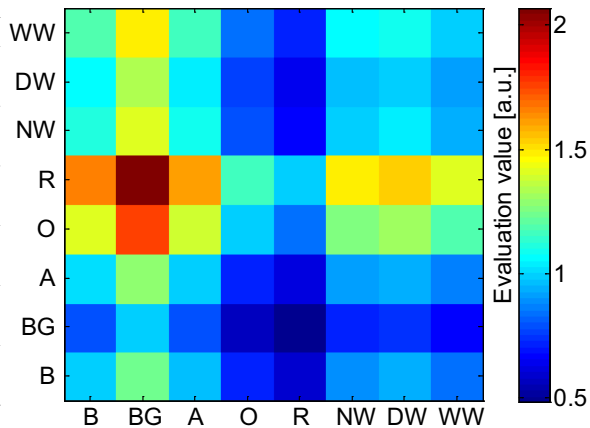


図 4.8 LED2 個の全組み合わせに対する評価値の計算結果

## 4.6 実験 2: 選択した LED を用いたモニタリング計測

### 4.6.1 モニタリング計測装置

選択した 2 種類の LED を用い、培養しながら継続して計測が可能なモニタリング装置を試作し、検出性能の評価を行った。試作した装置は、簡易な小型インキュベータ (P-BOX, 株式会社サンプラテック) を改造して細かく温度管理が出来るようにしたものをベースに、内部にサンプルとするシャーレを置く台を設け、さらにインキュベータの外部に置いた CMOS カメラで計測できるようにし、同じく外部に置いた LED 光をライトガイドで導入し、サンプルを照明するよう構成した (図 4.9)。試作装置に使用した構成要素の詳細を表 4.2 に示す。

カメラと 2 種類の LED 光源は、PC 上のソフトウェアで同時に制御し、一定の時間間隔でそれぞれの LED の点灯と画像計測を行うことで、経時的な変化の記録を行った。

### 4.6.2 計測サンプル

微生物として、ターゲットとした *Alicyclobacillus* 属細菌の基準株である *Alicyclobacillus acidocaldarius* (*Alicyclobacillus acidocaldarius* subsp. *acidocaldarius* strain ATCC 27009<sup>T</sup>) に加えて、モデル細菌として大腸菌 (*Escherichia coli* strain IAM 12119<sup>T</sup>) を使用した。

サンプルは、まず、それぞれ前培養を行った菌液を用いて、50 [mM] のリン酸緩衝液 (MOPS; pH7.5、和光純薬工業株式会社) により段階希釈を行い、それぞれ 2 種類の濃度 ( $10^3$  および  $10^6$  希釈) の菌液を、メンブレンフィルタ (A045A047A、孔径 0.45 [ $\mu\text{m}$ ] ADVANTEC) でトラップしたものを用意し、2 [mM] の INT 溶液を 50 [ $\mu\text{L}$ ] 滴下した LB

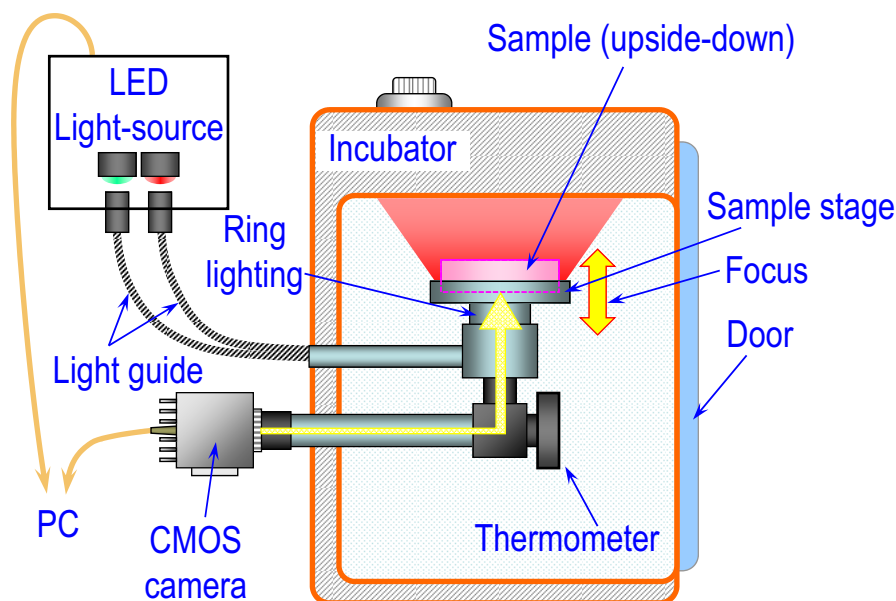


図 4.9 モニタリング計測を行う試作装置の構造

表 4.2 試作機に使用した構成要素の詳細

恒温器	P-BOX、株式会社サンプラテック
カメラ	モノクロ CMOS カメラ FUC-130BW、有限会社 FIT CMOS センササイズ：0.5 型 ( 6.65 × 5.32 [mm] ) 解像度：1280 × 1024 [pixel] 画素サイズ：約 5.20 × 5.20 [μm]
照明	超高輝度 LED ‘BG’、‘R’ ライトガイド、リングライト

平板培地 (*E. coli*) および YSG 平板培地 (*A. acidocaldarius*)<sup>\*5</sup> 上に置いたものを使用した (図 4.10)。また、サンプルは、計測装置の中で蓋をしたまま裏返した状態 (シャーレの蓋側を下にした状態) でセットし、30 [°C] (*E. coli*) および 45 [°C] (*A. acidocaldarius*) に保った状態で培養しつつ、一定時間間隔で経時的に計測を行った。

また、検出閾値を設定するため、ブランクのサンプル (メンブレンフィルタに菌液ではなく、同量の純水を通し、それぞれの培地に載せたもの) も作成し、同じ条件で計測を行った。

<sup>\*5</sup> YSG 培地: 2.0 [g/L] yeast extract, 2.0 [g/L] soluble starch, 1.0 [g/L] glucose, 15.0 [g/L] agar, pH4.5 [72]



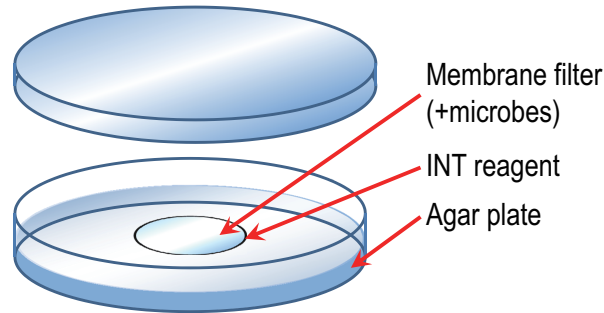


図 4.10 モニタリング計測に使用したサンプル

### 4.6.3 サンプルの計測とデータ処理

メンブレンフィルタを平板培地上に置いてサンプルの作成が完了した時点を 0 [min] として、計測装置にセットしてからは 10 [min] 間隔で計測を行った。

計測開始時には、コロニーはまだ発現していないことから、初期画像 (計測開始時点の最初の画像) を用いた正規化を行うことで、光源むらの影響の除去と同時に、変化した部分、即ち発現したコロニー部分のみの強調を行った。さらに、カメラ出力値に加算的に乗るダークノイズの影響を除去するため、各計測時点においてカメラへの入射光が全くない状態、即ち LED を全て消灯した状態での画像計測を行った。

ここで、2 種類の LED を、LED1、LED2 とし、初期画像を計測した時点を  $t_0$ 、その他の任意の計測時点を  $t$  とし、LED1 照明下でのカメラ画像を  $C_1(x, y, t)$ 、LED2 照明下でのカメラ画像を  $C_2(x, y, t)$  と置く。また、各時点の計測の直後に、LED を全て消した状態で計測したダーク画像を  $C_D(x, y, t)$  と置くと、初期画像を用いた正規化とダークノイズ補正を行った画像  $C'_1(x, y, t)$ 、 $C'_2(x, y, t)$  は、以下の式により求められる。

$$\begin{aligned} C'_1(x, y, t) &= \frac{C_1(x, y, t) - C_D(x, y, t)}{C_1(x, y, t_0) - C_D(x, y, t_0)} \\ C'_2(x, y, t) &= \frac{C_2(x, y, t) - C_D(x, y, t)}{C_2(x, y, t_0) - C_D(x, y, t_0)} \end{aligned} \quad (4.5)$$

以上の式 (4.5) によって求められた正規化画像  $C'_1(x, y, t)$ 、 $C'_2(x, y, t)$  を用いて、検出画像  $D(x, y, t)$  を以下のように定義する。

$$D(x, y, t) = \frac{C'_2(x, y, t)}{C'_1(x, y, t)} \quad (4.6)$$

菌の検出は、検出画像  $D(x, y, t)$  に閾値を設定することで行い、検出ピクセル数の経時的な変化の記録も行った。また、検出閾値は、ブランクのサンプルの計測結果を参考に、出

来るだけ感度が高くなるよう、かつブランクのサンプルではほとんど検出されないよう菌種毎に調節した。

なお、ランダムノイズの低減のため、実際にはすべての計測 ( $C_1(x, y, t)$ 、 $C_2(x, y, t)$ 、 $C_D(x, y, t)$ ) において、5 枚計測を行い、平均したものを用いた。

#### 4.6.4 実験結果と検出性能の評価

図 4.11 に、計測画像の例として、サンプル作成から 15 [hour] 後の時点で計測した  $10^5$  希釈の *E. coli* サンプルの画像  $C_1(x, y, 15 \text{ [hour]})$  と  $C_2(x, y, 15 \text{ [hour]})$ 、および正規化後の画像  $C'_1(x, y, 15 \text{ [hour]})$  と  $C'_2(x, y, 15 \text{ [hour]})$  を示す。LED 毎に光源むらが異なっているが、正規化後はその影響が除去されている様子がわかる。これらの正規化後の画像を用いて生成した検出画像  $D(x, y, 15 \text{ [hour]})$  を図 4.12 に示す。このように、コロニーの部分のみを強調して検出することが出来た。

ブランク試料との比較により、検出閾値を *E. coli* については 1.15、*A. acidocaldarius* については 1.22 とした。検出されたピクセル数の経時変化をプロットした結果を、図 4.13 に示す。このプロットより、*E. coli* について、 $2^2$  ピクセルが検出された時点を検出可能とみなせば、 $10^3$  希釈の場合は 4.9 [hour]、 $10^6$  希釈の場合は 11.1 [hour] が検出までの時間と解釈することが出来る。

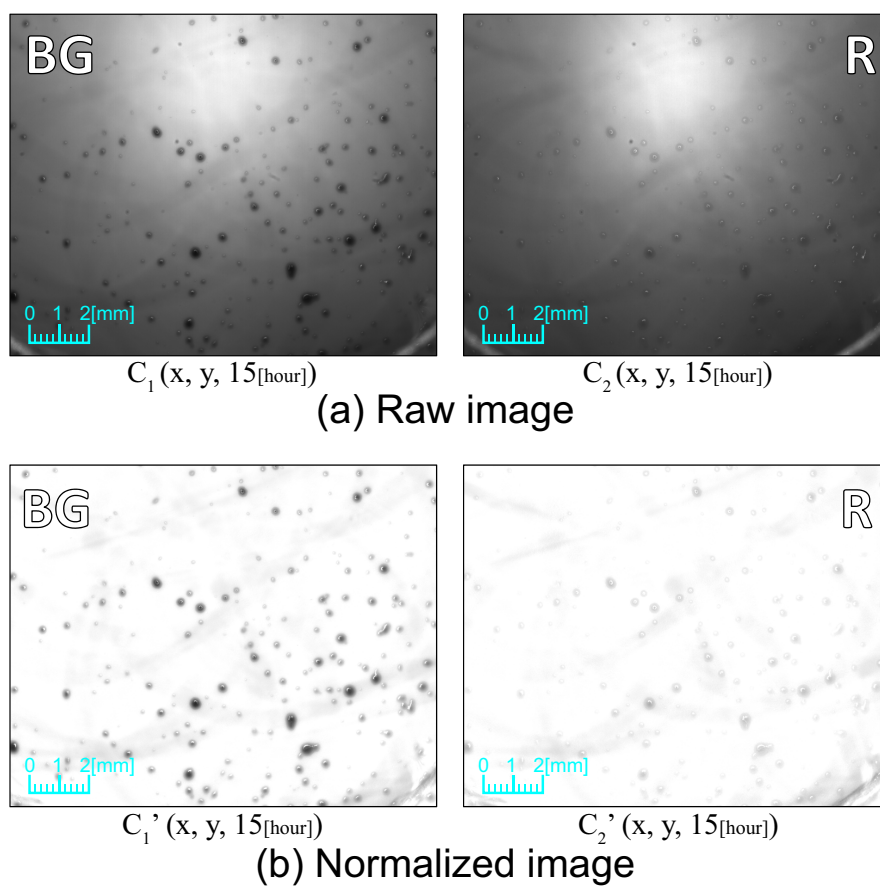
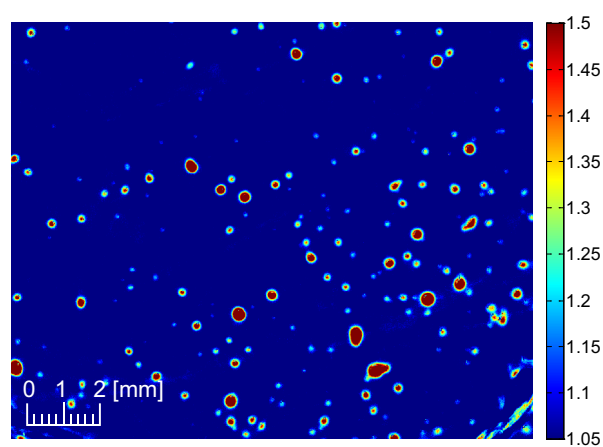
同様に、*A. acidocaldarius* について、 $2^5$  ピクセルが検出された時点を検出可能とみなせば、 $10^3$  希釈の場合は 10.7 [hour]、 $10^6$  希釈の場合は 15.0 [hour] が検出までの時間と解釈することが出来る。

さらに、このプロットから、菌の増殖速度について考察する。コロニーの成長は水平方向だけではなく、垂直方向にも進行するが、一般に、垂直方向の成長は、水平方向に比べてかなり遅い [73]。そこで、コロニーがメンブレンフィルタ上で水平方向のみに成長するとみなし、菌の数がコロニーの面積に比例すると仮定して、対数増殖期であるとみなせる期間のプロットの傾きの逆数から、増殖速度 (倍加時間) を推定した。増殖速度の推定値は、どの期間を使用して求めるかに依存するが、同じ種類の菌に対しては、菌の濃度 (希釈段階) に依らず、近い値が算出された (表 4.3)。

### 4.7 実験 3: 検出されたコロニーサイズの比較

様々な大きさのコロニーに対して、光学顕微鏡 (SMZ-10, Nikon) と通常の RGB のデジタルカメラ (E995, Nikon) で撮影した場合と、同一のコロニーについて試作装置で検出した場合について、検出されるコロニーのサイズについて比較を行った。

比較を行ったのは、INT を添加した *A. acidocaldarius* のコロニー 62 個である。一例を

図 4.11 画像計測結果の例 (*E. coli*、 $10^5$  希釈、15 時間後)図 4.12 検出画像の例 (*E. coli*、 $10^5$  希釈、15 時間後)

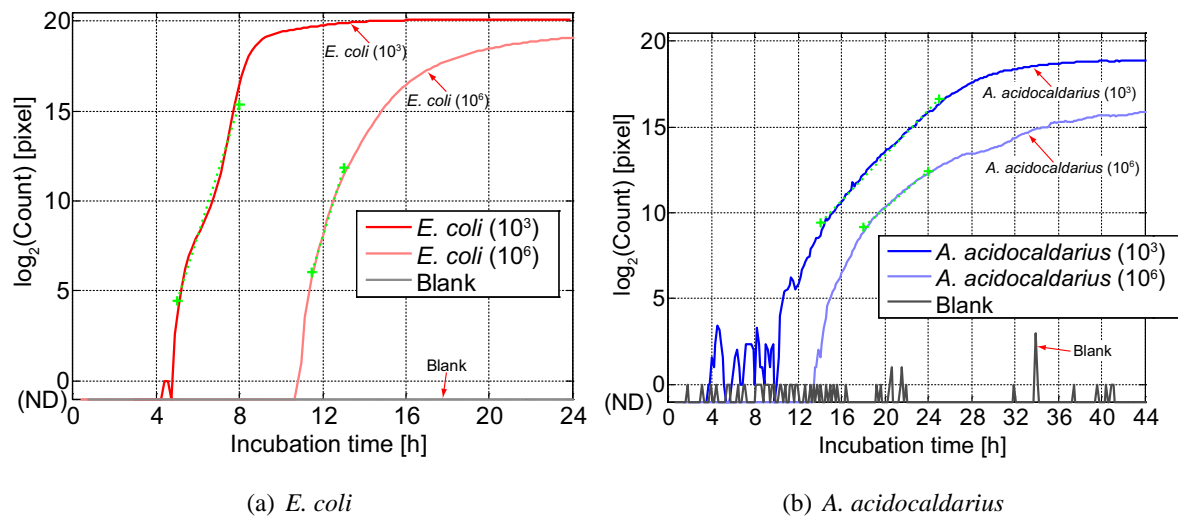


図 4.13 検出ピクセル数の経時変化

表 4.3 倍加時間の推定結果

	Dilution level	Time region	Estimated doubling time
<i>A. acidocaldarius</i>	$10^3$	14 – 25 h	91 min
	$10^6$	18 – 24 h	108 min
<i>E. coli</i>	$10^3$	5 – 8 h	16 min
	$10^6$	11.5 – 13 h	15 min

図 4.14 に示す。この図は、上下で同一のコロニーについてそれぞれの方法で撮影・検出し、水色の線の部分を直径として、大きさを求めたものである。図から分かる通り、本手法による検出の方が、より大きな領域を検出している事が分かる。

全コロニーについて同様に大きさを求め、それぞれの方法により求められるコロニーサイズについて比較した結果が図 4.15 である。外れ値とみられる 1 つのデータ点を除き、全ての場合において、提案法のほうが大きな領域を検出している。このことは、検出という目的においては有利であり、RGB カメラでは捉えられない変化が、提案法では検出できている可能性が高い。

検出画像中で、直径が 5 [pixel] 程度に検出されたコロニーであれば、その後の経時的な変化を確認することで、ほぼ確実に生きたコロニーの領域であると判断することが可能であった。5 [pixel] の直径は、撮像素子のピクセルサイズから実寸に換算すると、約 26 [ $\mu\text{m}$ ] に相当する。この検出画像中での 26 [ $\mu\text{m}$ ] というサイズは、図 4.15 の関係を考慮すると、通常の顕微鏡観察による目視検査における、20 [ $\mu\text{m}$ ] 以下のサイズに相当すると解釈する

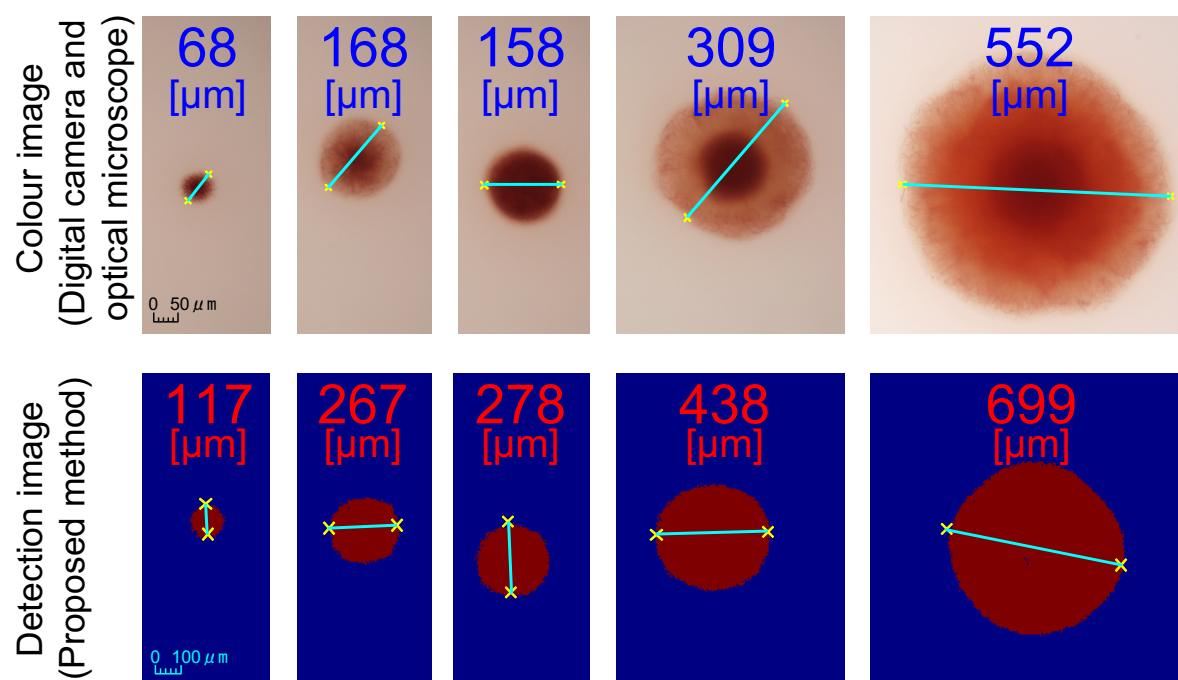


図 4.14 直径計測の例 (上下は同一のコロニー)

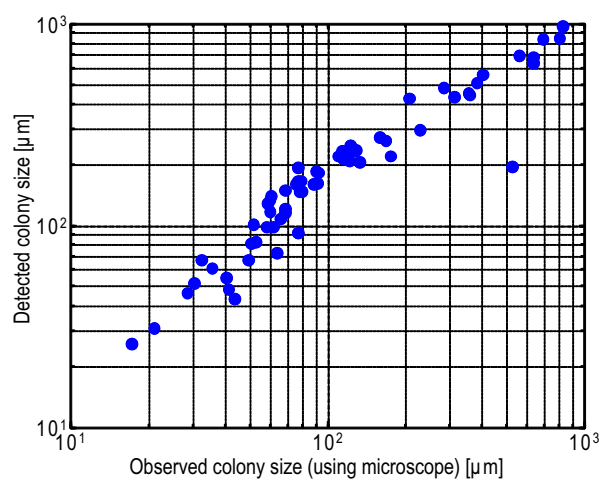


図 4.15 コロニーサイズの比較

ことが可能である。即ち、他の方法と比較する場合には、本手法では  $20 [\mu\text{m}]$  程度のマイクロコロニーまで検出することが可能な性能を持つ、と結論できる。

## 4.8 本章のまとめ

本章では、飲料製品に変敗を引き起こす原因となる *Alicyclobacillus* 属細菌をターゲットに、発色試薬 INT と LED を用いた簡易で低コストなモニタリング計測装置を試作した。

LED の選択にあたっては、候補とした LED の分光放射輝度特性と、検出対象とする試薬発色部分の分光反射率特性を用いることで、検出部分とそれ以外の部分のコントラスト比を最大化するよう選択した。

試作した装置を用いたモニタリング計測により、検出された面積の経時的な変化から、菌の倍加時間の推定も行った。倍加時間は、培養条件や菌種によって異なるため、これを用いることで、菌種の推定が出来る可能性がある。

本研究では、LED を用いることで、非常に簡易で低コストな構成で、分光的な特徴を捉えることが可能であることを実証した。また、試薬を併用し、その反応部分を検出ターゲットすることで、感度の向上に成功した。試作した装置では、顕微鏡等を使わず、カメラの撮像素子に倍率 1.0 [倍] で投影するような構成としている。撮像素子のピクセル一つ一つは、検出対象 (数十 ~ 数百 [ $\mu\text{m}$ ]) に対して十分小さいことから、個々のピクセルをそのまま検出器のアレイに見立て、あえて拡大しないことで、広い範囲を一度に検査可能とした。

提案する手法では、試薬の反応を捉えていることから、今回実験に用いた *A. acidocaldarius* や *E. coli* に限らず、培地の変更や培養温度の調整だけで、そのまま他の微生物にも応用可能であると考えられる。さらに、LED を変更して波長条件を変えるだけで、他の試薬への対応や、微生物そのものに分光的な特徴がある対象などにも、応用が可能である。

提案手法では、寒天培地 (平板培地) 上での増殖の様子を、連続して経時的に捉えることが可能であるという特徴を持つ。微生物の研究において、液体培地での増殖の様子を捉える方法などは既にあるが、平板培地上での変化を捉える一般的な方法は知られていないため、本手法は新しい実験・研究手段としての応用も期待できる。

## 第 5 章

# 近赤外分光画像を用いた食品中の 特定成分含量の推定と分布可視化

### 5.1 本章の概要

前章までは、食の安全に関連する分野への応用を具体的な目標として、可視及び 1000 [nm] 未満の近赤外波長帯の光を用いた、微生物コロニーの識別や迅速検出手法について述べた。

本章からは、特定の食品 (牛肉) を具体的なターゲットとして、近赤外のより長い波長帯、1000 ~ 2500 [nm] の光を用いて、食品成分の含量を推定することで、食品品質評価への応用を目指す。この波長帯の光は、ヒトの眼が捉えることの出来る波長範囲 (~ 780 [nm]) から大きく離れているため全く不可視であるが、食品に含まれる水、タンパク質、脂質、デンプン等の成分に特有の官能基に基づいた、多数の吸収バンドが存在する [19]。そこで、食品品質評価への応用を目的として、近赤外分光画像計測による食品成分含量の空間分布の可視化を行う。

本章では 数 [nm] 間隔の詳細な分光情報を計測 (Hyperspectral imaging と呼ばれる) し、これらの情報を全て用いた回帰分析により、含有成分の推定を行う。

### 5.2 牛肉の品質評価に関する背景

日本における牛肉に対する嗜好は独特なものがあり、欧米の圧倒的な赤身嗜好に対し、日本では世界でも類例のない独特の繊細な風味、食感、外観を持つ“霜降り和牛”を生み出してきた [74]。即ち、赤身よりもやわらかく口溶けの良い霜降り肉が珍重され、松阪牛や神戸牛、近江牛を始めとするいわゆる銘柄牛の多くも、こういった嗜好に合わせて肉質の改良が進められてきた。

全国を統一した共通の規格として、公益社団法人日本食肉格付協会が定める牛枝肉取引規格がある。これは、格付けを行うことにより、牛枝肉の品質を **A5**、**B3** などの2文字の記号で表した「等級」で表すものである。等級は **A5** を最も高い品質として、3段階 (**A** ~ **C**(**A** が最良)) の歩留まり等級と、5段階 (5 ~ 1(**5** が最良)) の肉質等級から成る。いずれも、枝肉の第6~第7肋骨間を切開し、切開面における胸最長筋(ロース芯)、並びに背半棘筋及び頭半棘筋の断面(図 5.1) を格付け員が目視することで判定する。(歩留まり等級に関しては、枝肉重量も使用する。)

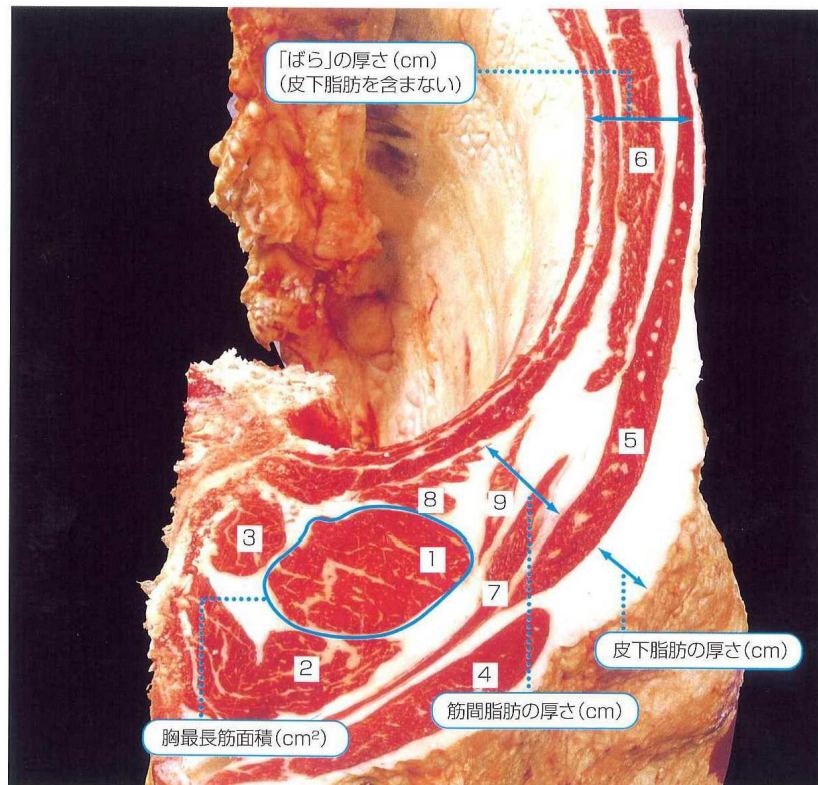
肉質等級については、「脂肪交雑」「肉の色沢」「肉の締まり及びきめ」「脂肪の色沢と質」の4項目の等級から判定される。まず、「脂肪交雑」は、*No.1* ~ *No.12* の脂肪交雑基準 (**Beef Marbling Standard; BMS**) によって判定される(図 5.2(a))。この **BMS No.** から、表 5.1(a) のように等級が決定される。「肉の色沢」は、肉色については、*No.1* ~ *No.7* の牛肉色基準 (**Beef Color Standard; BCS**)(図 5.2(b)) を用いて、光沢は“肉眼で判定して”、表 5.1(b) の等級区分によって決定される。「肉の締まり及びきめ」は、“肉眼で締まり及びきめを判定”することで、表 5.1(c) の等級が決定される。「脂肪の色沢と質」は、脂肪色については *No.1* ~ *No.7* の牛脂肪色基準 (**Beef Fat Standard; BFS**)(図 5.2(c)) を用いて、光沢及び質は、“肉眼で判定して”、表 5.1(b) の等級区分によって決定される。以上の4項目の等級のうち、最も低い値が、「肉質等級」として決定される [74, 75]。

この肉質等級の格付けにおいては、目視評価のみに頼った判定が実施されており、例えば実際に食味に関連する含有成分などは考慮されていない。また、肉質等級は、わずか5段階の単一指標であり、しかも1個体に対して1つの等級のみが付けられている。従って、判定を行う部位以外がどのような品質であるかに関しては、実際には全く考慮されない。また、目視検査であるため、格付け員によって判定結果が異なる場合もあり、より客観的な評価手法も求められている。

本研究では、品質に大きく関わる成分として、脂肪分と脂肪を構成する脂肪酸の組成に注目した。脂肪は、肉質等級の判断においても、重要な要素であり、食味に大きく関与することが知られている。また、脂肪酸の組成によって、脂肪の硬さや融点、肉のやわらかさ、多汁性などが変化することも分かっている。こういった成分の分析は、従来は理化学的な手法により行われてきたが、分析にはある程度の量のサンプルが必要で、破壊検査であることから、実際に食べる部分を分析することは不可能である。また、理化学分析は、結果を得るまでに時間を要すること、様々な薬品等の消耗品が必要であり、しかも有毒であるなど取り扱いには注意を要すること、分析に必要な器具や機器が複数必要であること、分析操作に関する知識や技術、熟練が必要であることなどから、大量のサンプルを分析するのには不向きであり、格付け時の指標として導入することも難しい。

そこで本研究では、近赤外分光画像計測を用いて、脂肪分、脂肪酸について推定・可視化することで、食味に直接的に関与する含有成分に基づいた、新たな評価指標となりう





筋肉の名称  
 1…胸最長筋 2…背半棘筋 3…頭半棘筋 4…僧帽筋 5…広背筋  
 6…腹鋸筋 7…菱形筋 8…腸肋筋 9…前背鋸筋

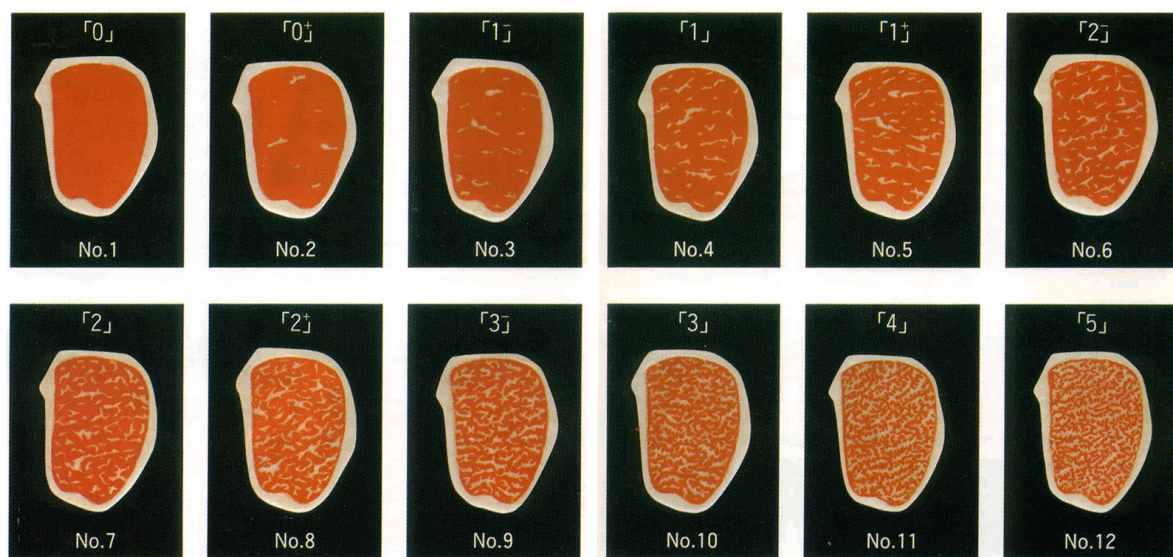
図 5.1 第 6～第 7 肋骨間切開面の測定部位 [75]

る、客観的な検査手法を提案する。なお、格付けに用いる部位だけではなく、それ以外の部位についても適用可能な推定モデルを作成することにより、牛一頭体ごとであった等級付けに対し、カット肉単位での評価をも想定した手法を構築する。

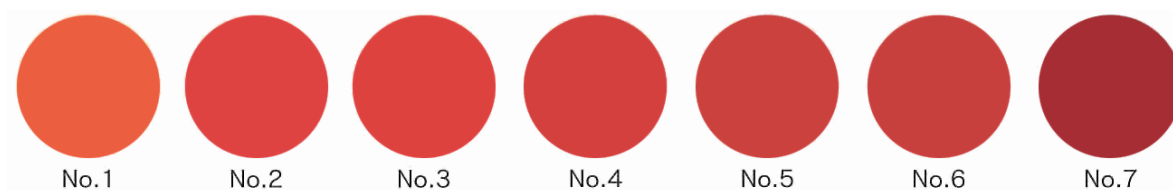
### 5.3 成分含量推定モデルの構築と可視化の手順

含有成分の推定は、分光情報を説明変数、成分値を目的変数とした回帰モデルを作成することで行った。そのために、まずは多数のサンプルについて分光特性の計測を行い、それに対応する成分値を従来法により分析する。計測した分光スペクトルは、Lambert-Beer の法則 (式 (3.2)) に従う吸光度スペクトルに変換し、その後、上下シフトに相当する加算的な因子と、散乱などによる乗算的な因子を除去する MSC (Multiplicative Scatter Correction) の適用により、分光スペクトルの補正を行う。

次に、成分推定のための回帰モデルを構築する。ここで、分光スペクトルは、一般に隣接する波長点のデータ間に非常に強い相関があることから、全スペクトルデータを単純に



(a) 脂肪交雑基準 (BMS)



(b) 牛肉色基準 (BCS)



(c) 牛肉脂肪色基準 (BFS)

図 5.2 評価に使用する基準 (文献 [74, 75] より一部加工)

説明変数として使用すると、多重共線性 (multicollinearity) の問題が顕著に現れ、生成されるモデルが不安定になりやすい。そこで、本研究では、回帰モデルに PLS 回帰 (Partial Least Squares Regression; 部分最小二乗回帰) を採用した [76]。PLS 回帰では、主成分分析に似た方法で説明変数の次元数を削減し、説明変数と目的変数の相関を最大化する。(主成分分析では、説明変数間の分散を最大化するように新しい変数 (主成分) を選択するのに対し、PLS では目的変数との共分散を最大化するよう潜在変数を選択する。) PLS 回帰モデルにおいて、使用する潜在変数の数  $n_f$  は、Leave-One-Out 法による Cross-Validation (交差検定) において、PRESS (Prediction Residual Error Sum of Squares; 予測残差平方和) が

表 5.1 各基準と等級区分の対応

(a) BMS と等級区分			(b) BCS と等級区分		
等級		BMS	等級	肉色(BCS)	光沢
5	かなり多いもの	No.8～No.12	5	かなり良いもの	No.3～No.5 かなり良いもの
4	やや多いもの	No.5～No.7	4	やや良い物	No.2～No.6 やや良い物
3	標準のもの	No.3～No.4	3	標準のもの	No.1～No.6 標準のもの
2	やや少ないもの	No.2	2	標準に準ずるもの	No.1～No.7 標準に準ずるもの
1	ほとんどないもの	No.1	1	劣るもの	等級5～2以外のもの

(c) 「肉の縮まり及びきめ」の等級区分			(d) BFS と等級区分		
等級	縮まり	きめ	等級	脂肪色(BFS)	光沢と質
5	かなり良いもの	かなり細かいもの	5	かなり良いもの	No.1～No.4 かなり良いもの
4	やや良い物	やや細かいもの	4	やや良い物	No.1～No.5 やや良い物
3	標準のもの	標準のもの	3	標準のもの	No.1～No.6 標準のもの
2	標準に準ずるもの	標準に準ずるもの	2	標準に準ずるもの	No.1～No.7 標準に準ずるもの
1	劣るもの	粗いもの	1	劣るもの	等級5～2以外のもの

最小となる時の数を用いた。

生成した回帰モデルの性能は、決定係数  $r^2$  や  $RPD$  (後述) などの指標で評価し、最後に分光画像の個々のピクセルのスペクトルに回帰モデルを適用することで、成分値の空間分布を可視化する。

## 5.4 従来法による成分分析と画像計測実験

### 5.4.1 計測サンプル

サンプルとして、3頭の牛(いずれも黒毛和種、肥育期間 25 ヶ月、年齢 40 ヶ月)の様々な部位(ウデ、サーロイン、トウガラシ、マル、ラム、リブローズ、外バラ、外ヒラ、三角バラ、前スネ、前バラ、中バラ)から作成した、合計 90 枚のカット肉を使用した。格付けに使われるロース芯(リブローズなどが含まれる)だけではなく、全身の様々な部位を用いたのは、本研究が等級の推定を目的としたものではなく、個々のカット肉の特性を評価することを目的としているためである。

なお、ひとつの部位(例えば「サーロイン」の部位)からは、1～5枚のカット肉サンプルを作成し、それぞれ大きさは、およそ 80 [mm] × 120 [mm]、厚さは約 5 [mm] とした。

サンプルのもととなる枝肉は、屠畜後まず 0～5 [°C] で 60 [日間] 熟成を行った後、計測を行うまでの期間は脂肪の特性が変化しないよう、-25 [°C] 下で冷凍保管を行った。冷凍保管したサンプルは、0～5 [°C] になるまで室温にて解凍した後に計測した。

なお、成分値の分析と分光画像計測には、同一のサンプルを使用することが理想的だが、実験を同時に行うことが困難であったため、実際には約 10 [mm] の厚さで切り出した

カット肉を、厚さ方向に半分に割ることで5 [mm] 厚の隣接サンプルを2枚作成し、それぞれを成分値分析用と分光画像計測用に用いた\*1。

推定モデルの構築と、その評価のため、サンプル群をモデル作成に使用するキャリブレーションセットと、モデル評価に使用するバリデーションセットの2群に分割した。分割はサンプル数が2:1となるよう(キャリブレーションセットのサンプル数は $n_c = 60$ 、バリデーションのサンプル数は $n_v = 30$ になるよう)、全サンプルをランダムに振り分けた。

### 5.4.2 脂肪分と脂肪酸組成の理化学分析

参照値とする成分値は、理化学的な手法により、脂肪分と脂肪酸組成に分けて、それぞれ分析した結果を用いた。脂肪分は、細かくすりつぶしたサンプルを用いて、全自動ソックスレー装置 (Soxtherm416、Gerhardt GmbH & Co. KG、ドイツ)[77] を用いたソックスレー抽出法 [78] により、サンプル重量に占める粗脂肪分重量の割合として求めた。

脂肪酸組成は、細かくすりつぶした約10 [g] のサンプルから Folch 法 [79] により抽出した脂質を、ガスクロマトグラフィー法 (GC-14B、株式会社 島津製作所; 使用キャピラリーカラム: Ulbon HR-SS-10、信和化工株式会社) にて分析することで、脂質重量に占める各種脂肪酸の割合として求めた。実際の分析操作は、図 5.3 に示すように非常に煩雑で、全サンプルの分析には数日を要した。

なお、脂肪酸は不飽和脂肪酸に分類される、ミリストレイン酸、パルミトレイン酸、オレイン酸、リノール酸と、飽和脂肪酸に分類されるミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸の、合計7種類を分析対象とし、これらの合計が100 [%] になるものとして組成値を求めた\*2。

推定モデルは、これら個々の脂肪酸7種類と「脂肪分」に加え、不飽和脂肪酸4種類の合計として「総不飽和脂肪酸」、飽和脂肪酸3種の合計として「総飽和脂肪酸」を加えた合計10項目について、それぞれ作成した。

ところで、Lambert-Beer の法則によれば、吸光度は成分の濃度に比例するが、脂肪酸の分析値は、脂質に占める各種脂肪酸の割合として定義された“組成値”である。そこで、脂肪分の分析値を用いて、サンプル全体の濃度相当に換算した値を“脂肪酸含量 ( $C_i$ )”と

\*1 この意味では、使用したサンプルは合計180枚であるが、隣接サンプルは同一のものとみなすため、 $n = 90$  として扱う

\*2 厳密にはこれ以外の脂肪酸も含まれるが、極めて微量であることから、主要な7種類のみを取り扱った



## 脂肪酸組成の理化学分析手順

1. サンプル約 10 [g] を包丁を用いて細かくすり潰す。
2. 6 ～ 10 倍量の Folch 液 (クロロホルム:メタノール=2:1 となるよう混合したもの) でホモジナイズ。
3. 濾過後、生理食塩水を加え、振盪・冷蔵・上澄み除去の操作を 3 回繰り返す。
4. 無水硫酸 Na で脱水する。
5. 濾過後、減圧蒸留を経ることで、安定した油状の抽出液が得られる。(以上が抽出作業。)
6. 抽出液 1 滴程度に、0.5N ナトリウムメチラート 2 [ml] を加え、60 [°C] で 5 [min] 振盪撹拌する。
7. 水冷 10 分後、2 [%] 酢酸 4 [ml] を加えて反応を停止。
8. n-ヘキサン 3 [ml] を加えて強振盪後、上層をガスクロマトグラフィーにて分析。
  - キャリアガス: ヘリウム
  - 温度設定
    - カラム槽 : 初期 150 [°C]、昇温 3 [°C/min]、最終 220 [°C] (定温 2 分) (計 25 分)
    - 気化室 : 250 [°C]
    - 検出器 (FID) : 250 [°C]



図 5.3 理化学分析の手順 (一部)

して、以下のように定義し、これを目的変数とした。

$$C_i = F \times K_i \quad (5.1)$$

$$\left[ \begin{array}{l} F: \text{脂肪分} \\ i: \text{ミリストレイン酸、パルミトレイン酸、...、ステアリン酸} \\ K_i: \text{脂肪酸組成} \\ C_i: \text{脂肪酸含量} \end{array} \right]$$

理化学分析により得られた脂肪分、および脂肪酸組成の統計量を表 5.2 に示す。また、式 (5.1) により脂肪酸含量に変換後の統計量を表 5.3 に示す。

表 5.2 脂肪酸組成の理化学分析値に関する統計量

Entire set (n = 90)										
	Fat content(%)	Total SFA(%)	Total UFA(%)	Myristic acid(%)	Palmitic acid(%)	Stearic acid(%)	Myristoleic acid(%)	Palmitoreic acid(%)	Oleic acid(%)	Linoleic acid(%)
min	5.25	27.91	57.80	1.57	19.38	4.77	0.82	3.48	50.14	1.89
max	64.14	42.20	72.09	4.52	28.70	12.47	2.93	9.14	63.13	4.66
mean	30.26	33.94	66.06	2.29	24.16	7.49	1.66	6.04	55.89	2.47
SD	13.60	2.95	2.95	0.37	2.03	1.43	0.51	1.41	2.74	0.45
Calibration set (n <sub>c</sub> = 60)										
min	5.25	27.91	58.97	1.57	19.38	4.77	0.82	3.48	50.66	1.89
max	63.50	41.03	72.09	2.87	27.62	12.47	2.78	8.93	63.13	4.66
mean	29.67	33.81	66.19	2.24	24.09	7.47	1.65	6.04	56.00	2.50
SD	13.65	2.96	2.96	0.28	2.00	1.45	0.48	1.41	2.71	0.51
Validation set (n <sub>v</sub> = 30)										
min	11.14	28.66	57.80	1.84	19.78	5.05	0.82	3.82	50.14	1.91
max	64.14	42.20	71.34	4.52	28.70	10.92	2.93	9.14	62.02	2.93
mean	31.46	34.19	65.81	2.37	24.29	7.53	1.69	6.04	55.67	2.41
SD	13.63	2.97	2.97	0.50	2.10	1.43	0.55	1.42	2.84	0.29

SD: standard deviation

### 5.4.3 近赤外分光画像計測実験

近赤外分光画像計測システムの外観と構成を、図 5.4 に示す。図 5.4(b) に示すように、使用した分光カメラは回折格子を用いたラインセンサ型であり、一度の計測で  $X$  軸 (位置)、と  $\lambda$  軸 (波長) の情報を持つ 2 次元画像が取得される。これに  $Y$  軸を加えて空間的に 2 次元となる分光画像を得るために、 $Y$  軸方向に直線移動するスライドテーブルを備えた構成となっている。このスライドテーブルを一定速度で移動させながら計測を繰り返すことで、 $X, Y, \lambda$  の 3 次元の情報を持つ分光画像計測を実現する。システムを構成する装置の詳細は、表 5.4 に示す。

画像サイズは 320 [pixel]( $X$  軸)  $\times$  350 [pixel]( $Y$  軸) とし、実際に計測される範囲は、120 [mm]( $X$  軸)  $\times$  130 [mm]( $Y$  軸) となるよう調整した (図 5.5)。従って、空間解像度は

表 5.3 脂肪酸含量へ変換後の統計量

Entire set (n = 90)

	Fat content(%)	Total SFA(%)	Total UFA(%)	Myristic acid(%)	Palmitic acid(%)	Stearic acid(%)	Myristoleic acid(%)	Palmitoleic acid(%)	Oleic acid(%)	Linoleic acid(%)
min	5.25	1.79	3.46	0.11	1.33	0.34	0.09	0.36	2.76	0.24
max	64.14	20.09	44.50	1.58	14.35	5.00	1.41	4.14	39.23	1.46
mean	30.26	10.13	20.13	0.69	7.17	2.27	0.51	1.81	17.11	0.71
SD	13.60	4.25	9.50	0.31	2.91	1.10	0.27	0.85	8.26	0.27

Calibration set ( $n_c = 60$ )

	Fat content(%)	Total SFA(%)	Total UFA(%)	Myristic acid(%)	Palmitic acid(%)	Stearic acid(%)	Myristoleic acid(%)	Palmitoleic acid(%)	Oleic acid(%)	Linoleic acid(%)
min	5.25	1.79	3.46	0.11	1.33	0.34	0.09	0.36	2.76	0.24
max	63.50	20.09	43.70	1.58	14.35	4.96	1.41	4.14	38.44	1.46
mean	29.67	9.90	19.77	0.67	7.01	2.22	0.49	1.77	16.80	0.70
SD	13.65	4.33	9.47	0.32	2.96	1.11	0.27	0.85	8.21	0.28

Validation set ( $n_v = 30$ )

	Fat content(%)	Total SFA(%)	Total UFA(%)	Myristic acid(%)	Palmitic acid(%)	Stearic acid(%)	Myristoleic acid(%)	Palmitoleic acid(%)	Oleic acid(%)	Linoleic acid(%)
min	11.14	3.93	7.21	0.24	2.91	0.76	0.17	0.75	5.97	0.30
max	64.14	19.64	44.50	1.31	13.63	5.00	1.12	3.72	39.23	1.25
mean	31.46	10.58	20.87	0.73	7.49	2.36	0.53	1.88	17.72	0.73
SD	13.63	4.10	9.68	0.30	2.82	1.07	0.28	0.86	8.47	0.26

SD: standard deviation

$X$  方向、 $Y$  方向共に約 380 [ $\mu\text{m}/\text{pixel}$ ] である。

表 5.4 実験装置

分光カメラ	Spectral Camera SWIR, SPECIM Spectral Imaging Ltd, Finland 波長範囲: 910 ~ 2518 [nm] 波長間隔: 6.3 [nm] 空間解像度: 320 [pixel] ( $X$ 軸) 露光時間: 3 [ms]
光源	ハロゲン光源 (MH-M15, 150W, Hataya Ltd, Japan) $\times 3$ 台

サンプルの計測の前に、分光画像計測システム自体の特性の確認を行った。まずは、光源の特性を分光放射計 (FieldSpec3、ASD Inc.) により計測した。図 5.6(a) に、最大値を 1 に正規化した相対分光放射輝度特性を示す。図より、1100 [nm] 付近をピークとして、波長が長くなるのに伴い輝度は単調減少していき、2500 [nm] では最大値の 30 [%] 未満にまで低下する事が分かる。

次に、分光画像計測システムを用いて、計測波長全域における分光反射率が 94.8 [%] 以上 [80] である標準白色板 (SRS-99 Spectralon Reflectance Standards, Labsphere Inc., USA) の計測と、カメラのレンズにキャップをして完全に入射光を遮断した状態でのダークノイズの計測を行った。標準白色版については 201,600 [pixel] (= 5 [frame]  $\times$  320 [pixel]  $\times$

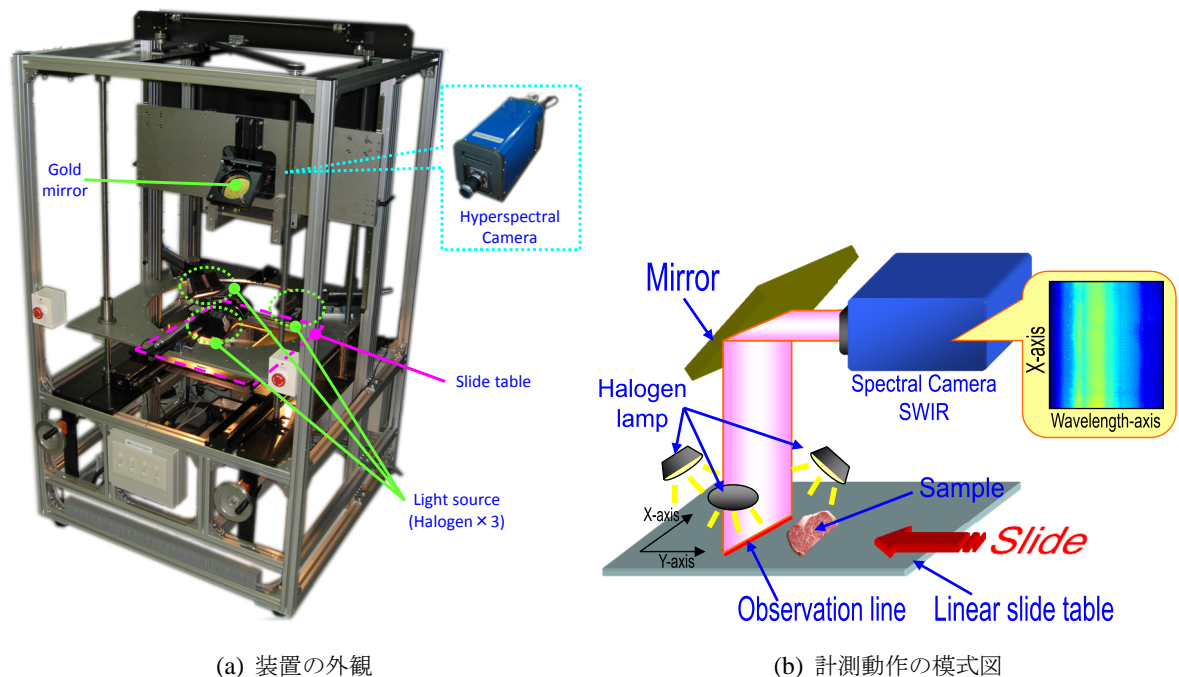


図 5.4 近赤外分光画像計測装置 (Specim 社 SWIR)

126 [sample]) 点、ダークノイズについては 1,572,480 [pixel](= 39 [frame] × 320 [pixel] × 126 [sample]) 点の平均と標準偏差を求めてプロットした結果を図 5.6 に示す。計測波長範囲の下限付近と上限付近では、ダークノイズに対して極めて小さな値しか得られておらず、非常に S/N 比が悪い事が分かる。この特性は、光源とカメラの分光特性の積として考えられるものであり、長波長側では前述の通り光源が暗いこと、短波長側ではカメラの分光感度が悪いことが原因と考えられる。

以上の結果から、本研究では、一定の S/N 比が得られる 1000 ~ 2300 [nm] の波長範囲のデータのみを使用して、解析を行った。

計測した分光強度画像は、以下の手順で吸光度画像  $A(\lambda)$  に変換した。まずサンプルの計測画像  $I_{subject}(\lambda)$  と標準白色板の計測画像  $I_{Reference}(\lambda)$ 、レンズキャップをした状態で計測したダーク画像  $I_{dark}(\lambda)$  を用いて、反射率画像  $R(\lambda)$  を以下の式により計算する。

$$R(\lambda) = \frac{I_{subject}(\lambda) - I_{dark}(\lambda)}{I_{white}(\lambda) - I_{dark}(\lambda)} \quad (5.2)$$

この反射率画像  $R(\lambda)$  を用いて、以下の変換式から吸光度画像  $A(\lambda)$  を求める。

$$A(\lambda) = -\log_{10} R(\lambda) \quad (5.3)$$



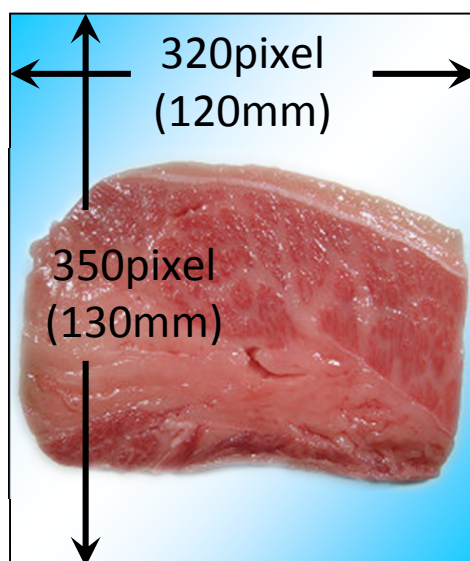
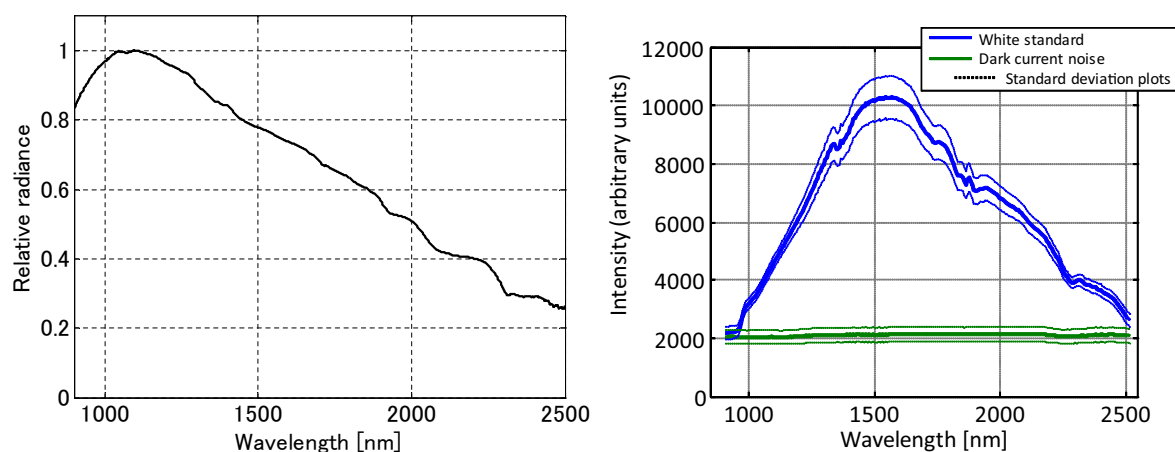


図 5.5 計測領域のサイズと解像度



(a) 光源（ハロゲン）の相対分光放射特性 (ASD 社 Field-Spec3)

(b) 標準白色板およびダーク計測時の出力値

図 5.6 分光画像計測装置の特性測定

## 5.5 成分含量推定モデルの構築

### 5.5.1 スペクトルの抽出と前処理

サンプルの分光画像計測により、サンプルの分光スペクトルはピクセルの数だけ得られるが、対応付ける理化学分析値は、1つのサンプル(カット肉)に対して、1つの分析値(平均値)しか得られない。さらに、理化学分析では、1枚のサンプルすべてを使用するので

はなく、図 5.7 の丸で囲んだ領域のように、一部のみを使用して分析した。(これは、脂肪の塊の部分等を避けるためである)そこで、理化学分析に使用した領域と出来るだけ同じになるように、理化学分析に使用した領域を写真で記録したものと見比べることで、平均反射率画像上で領域を手動で選択し、その領域から抽出したスペクトルを平均したものを、理化学分析値と対応付けた (図 5.8)。以上により、1 サンプルについて対応する 1 つのスペクトルを作成した。

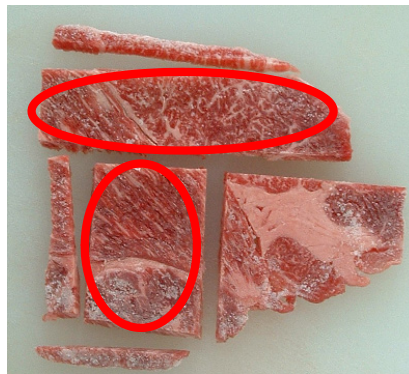


図 5.7 理化学分析に使用した領域の例

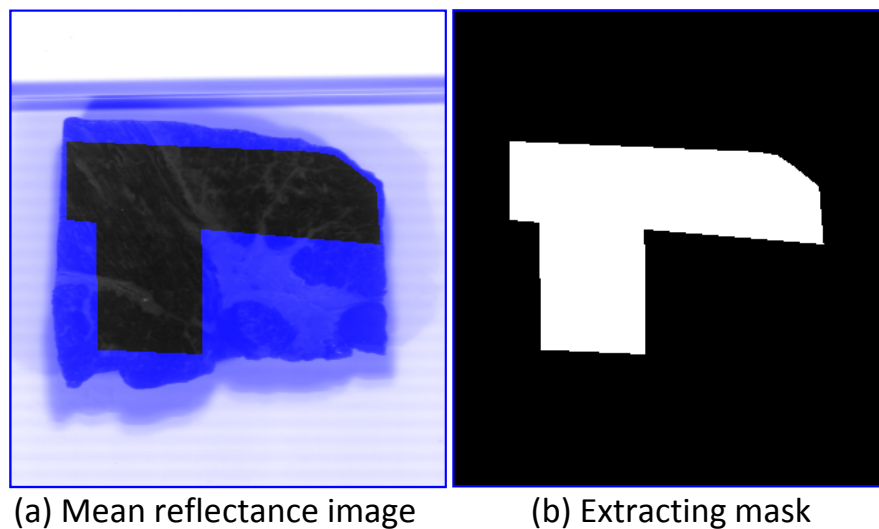


図 5.8 分光画像からのスペクトル抽出マスクの例

図 5.9(a) に、各サンプルに対応するスペクトルを、キャリブレーション群とバリデーション群に分けてプロットした。このスペクトル群を、MSC を用いて補正する。MSC は、まず、計測されるスペクトルを以下の式のように基準となる粒度のスペクトル  $A_0(\lambda)$  に、乗算的散乱因子  $\alpha$  と加算的散乱因子  $\beta$  が加わったものと仮定する。

$$A(\lambda) = \alpha A_0(\lambda) + \beta + e(\lambda) \quad (5.4)$$

$[e(\lambda) : \text{成分の違いによるスペクトルの差や、ランダムノイズ}]$

そして、 $\alpha$  と  $\beta$  を最小二乗法により推定し、この推定した  $\hat{\alpha}$  と  $\hat{\beta}$  を用いて、以下の式により仮想的な基準粒度のスペクトル  $\hat{A}_0(\lambda)$  に変換するものである。

$$\hat{A}_0(\lambda) = \frac{A(\lambda) - \hat{\beta}}{\hat{\alpha}} \quad (5.5)$$

$$(5.6)$$

ここで、基準とするスペクトル  $A_0(\lambda)$  には、キャリブレーションセットの平均スペクトルを使用した。この変換により、計測上のアーチファクトとして含まれていた、加算的な変動と乗算的な変動を除去することが可能である。

MSC の適用により補正を行った結果を図 5.9(b) に示す。本研究では、この補正後のスペクトルを用いて成分推定モデルの生成を行う。

計測された吸光度スペクトルには、いくつかの共通した吸収ピークが見られる。この中で、1460 [nm] と 1960 [nm] に見られるピークは、主に水に由来する  $OH$  基の伸縮振動の第 2 倍音と第 1 倍音であると考えられる。また、1200 [nm] 付近の吸収帯は、 $CH$  基の第 2 倍音と考えられる。さらに、1738 [nm] に見られる吸収帯は、脂質や脂肪酸の両方に関連する  $CH_2$  伸縮振動の第 1 倍音と考えられる [81]。

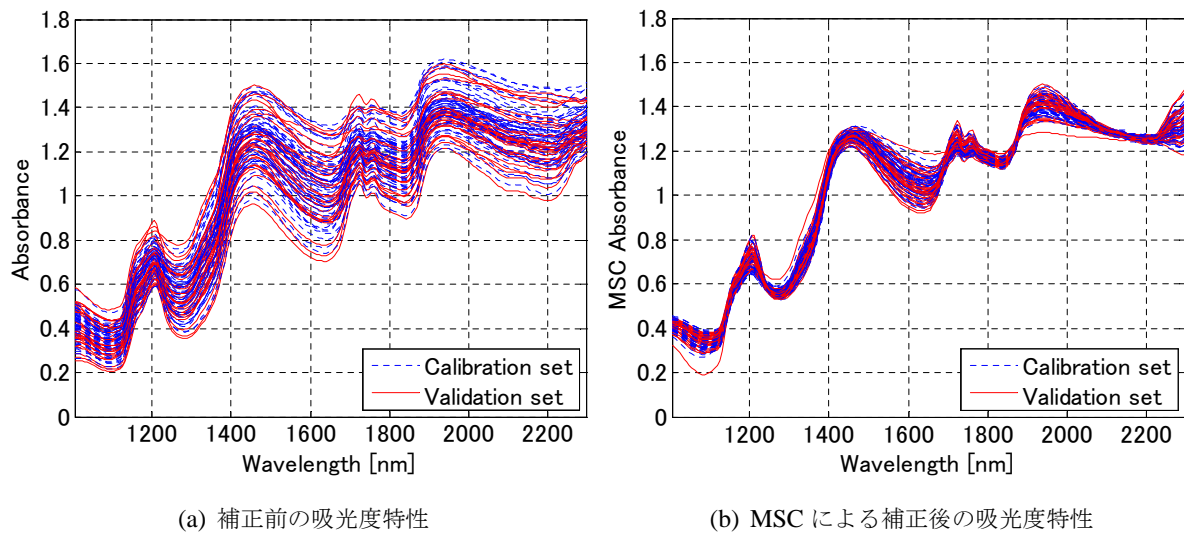


図 5.9 全サンプルの吸光度計測結果 (1 本の線が、1 サンプルの抽出領域の平均スペクトルに対応する)

### 5.5.2 PLS 回帰による成分推定モデルの構築

成分の推定モデルは、10 項目の成分それぞれについて個々に作成した。PLS の潜在変数の数  $n_f$  を決定するため、PRESS の値を  $n_f = 1 \sim 40$  の範囲で求めた結果を図 5.10 に

示す。PRESS が最小となる数は推定する成分によって異なるが、 $n_f = 3 \sim 6$  が選択された。 $n_f$  は、モデルの自由度に対応することから、約 200 次元 (波長点) の情報を持つ元の分光データと比較して、極めて少ない次元で推定が可能であることを意味する。

## 5.6 推定モデルの性能評価と成分分布の可視化

### 5.6.1 推定モデルの性能評価

それぞれの成分毎に生成した PLS 回帰モデルにより、推定を行った結果を表 5.5 に、理化学分析値に対する推定値をプロットした散布図を図 5.11 に示す。

表 5.5 推定モデルの評価値

	Fat content	Total SFA	Total UFA	Myristic acid	Palmitic acid	Stearic acid	Myristoleic acid	Palmitoleic acid	Oleic acid	Linoleic acid
R	0.938	0.918	0.940	0.917	0.922	0.874	0.896	0.905	0.938	0.890
r	0.949	0.935	0.945	0.892	0.928	0.898	0.824	0.880	0.945	0.926
factor $n_f$	3	4	3	4	4	4	6	6	3	3
$R^2$	0.879	0.842	0.883	0.840	0.850	0.764	0.803	0.819	0.880	0.792
$r^2$	0.901	0.874	0.894	0.796	0.862	0.807	0.679	0.775	0.893	0.857
SEC	4.87%	1.78%	3.32%	0.13%	1.19%	0.56%	0.13%	0.38%	2.91%	0.13%
SEP	4.81%	1.69%	3.41%	0.15%	1.20%	0.52%	0.17%	0.43%	2.98%	0.12%
RPD	2.84	2.43	2.84	1.94	2.36	2.04	1.69	2.01	2.85	2.22

R: coefficient of correlation (for calibration set); r: coefficient of correlation (for validation set);  $n_f$ : factor number of PLS;  $R^2$ : coefficient of determination (for calibration set);  $r^2$ : coefficient of determination (for validation set); SEC: standard error of calibration; SEP: standard error of prediction; RPD: ratio of standard error of prediction to standard deviation (for validation set).

表中に示した  $RPD$  (ratio of the  $SEP$  (standard error of prediction) to the  $SD$  (standard deviation)) 値は、推定モデルの評価指標のひとつであり、以下のように定義される。

$$RPD = SD/SEP \quad (5.7)$$

$RPD$  値は高いほど良いモデルであると解釈できる。例えば  $RPD = 1.0$  の場合は、全く推定ができていない状態を意味し、 $RPD > 2.5$  であれば、スクリーニング検査には十分使用可能である [82]。

表 5.5 に示した通り、ミリスチン酸とミリストレイン酸の  $RPD$  値は 2.0 より低く、検査に十分なモデルであるとは言えない一方で、脂肪分や総不飽和脂肪酸、オレイン酸に関しては  $RPD$  値が 2.5 を大きく超えており、スクリーニング検査には十分使用可能であるといえる。ミリスチン酸とミリストレイン酸の  $RPD$  値が低かった原因には、表 5.3 に示したように、他の成分に比べて含量が極めて微量であることに加え、計測したサンプルの

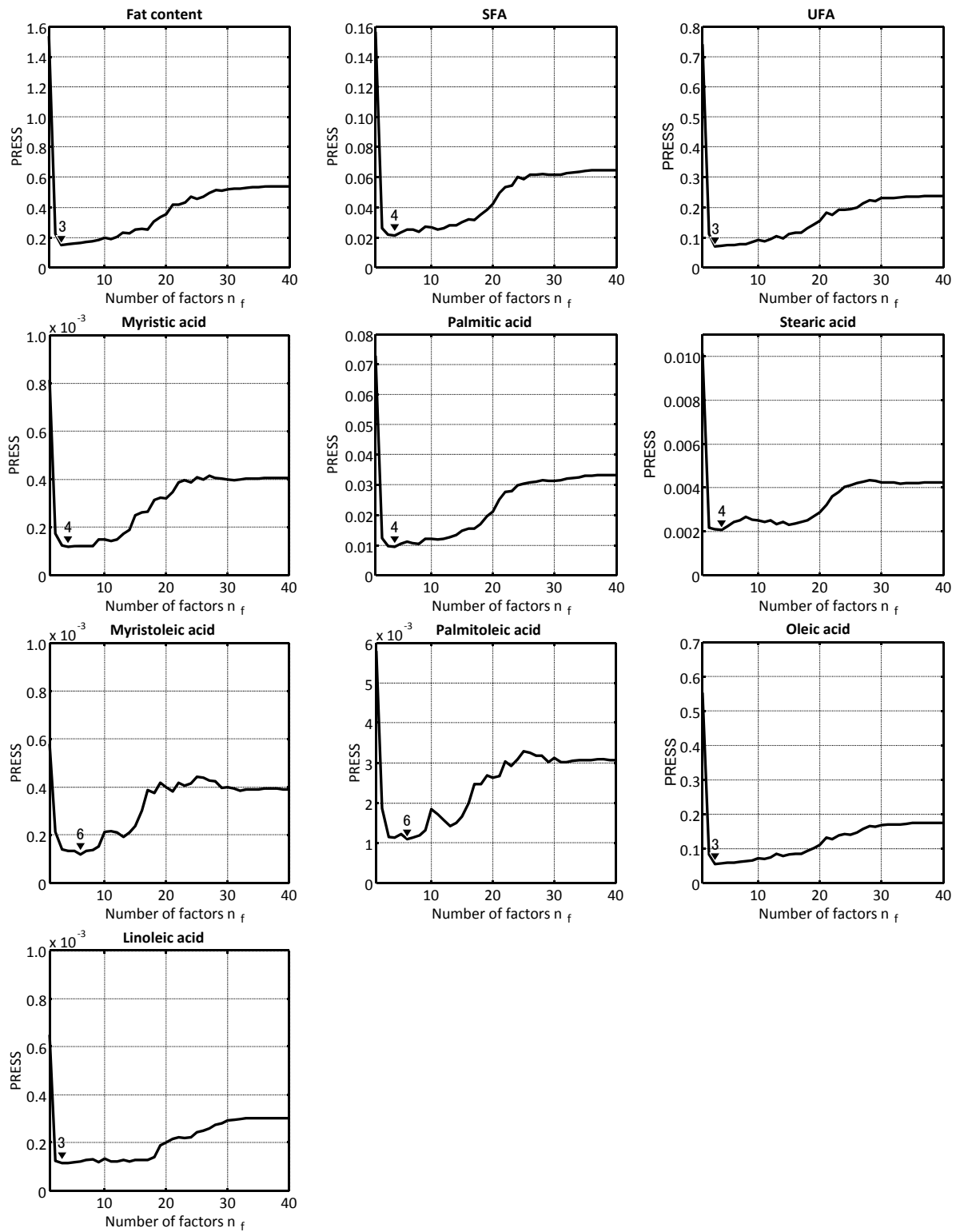


図 5.10 使用する潜在変数の数に対する PRESS(予測残差平方和) の算出結果

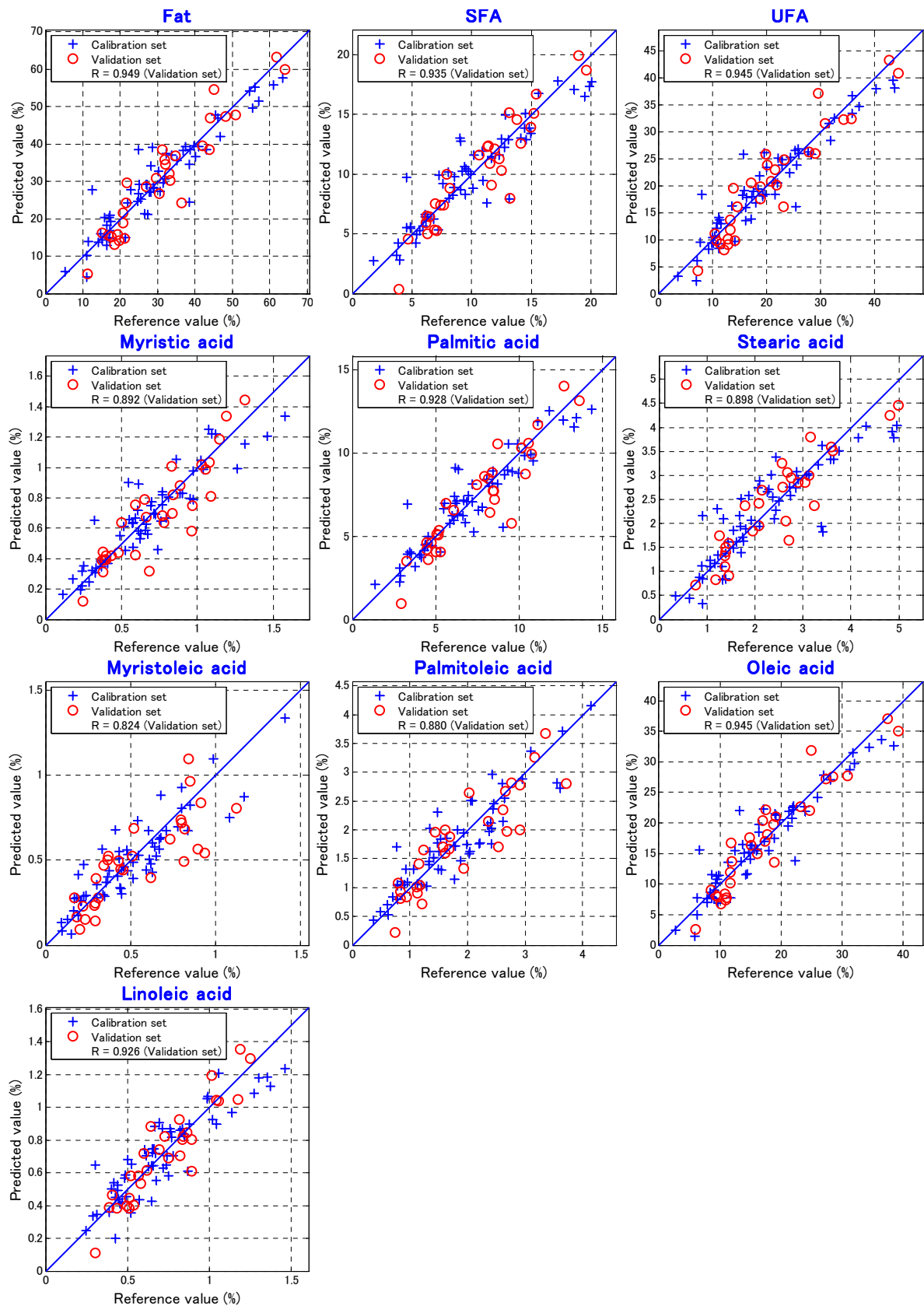


図 5.11 理化学分析値 (参照値) に対する推定値の分布

成分値の分布範囲が狭いことが考えられる。従って、モデルの改善のひとつの方法としては、より広範囲な成分値分布となるキャリブレーションサンプルの追加が考えられる。

また、近赤外分光計測と PLS 回帰により牛肉の総飽和脂肪酸、パルミチン酸、オレイン酸を推定した Windham らの報告 [83] における  $r^2$  値と、本研究により得られた  $r^2$  値を比較すると、本研究のほうがわずかに高く、またこれらの 3 成分に対しての  $r^2$  値の傾向 (オレイン酸 > 総飽和脂肪酸 > パルミチン酸) も同様であった。なお、他の先行研究と比較しても、多くの研究がすりつぶした状態のサンプルを計測対象としているのに対し、本研究ではカット肉の状態のサンプルを計測対象としていながら、同等かそれ以上の推定精度が得られている。このことは、本手法が有効であることを裏付ける結果であるといえる。

### 5.6.2 成分分布の可視化結果

作成した推定モデルを分光画像の各ピクセルに適用し、各成分毎に空間分布の可視化を行った。図 5.12 は、部位“ウデ”の可視化結果の一例である。

理化学分析では、ある程度の量のサンプルが必要であるため、可視化の結果を厳密に確認・評価することは困難であるが、少なくとも目視で脂肪に見えている部分 (皮下脂肪や筋間脂肪の領域) については、各推定脂肪酸含量値は高い値を示していることが確認できる。また、これまでの牛肉の品質評価に画像計測を用いた先行研究では、脂肪部分とそれ以外に分けて二値化して評価するものが多いが、本研究では、ひとつのピクセルがある範囲の値を持つという大きな違いがある。

図 5.13 に別の例を示す。可視化結果では、左下の部分がそれ以外の赤身部分に比べて総不飽和脂肪酸の含量が少なく推定されているが、通常の RGB 画像 (可視画像) では、この違いを見分けることはほぼ不可能である。

なお、図 5.12 において、各脂肪酸含量の分布は互いに似通っているが、これは脂肪酸含量の値と脂肪分との相関が高いためである。そこで、推定した脂肪分  $\hat{F}$ 、および推定した脂肪酸含量  $\hat{C}_i$  を用いて、式 (5.1) を変形することで、脂肪酸組成推定値  $\hat{K}_i$  を

$$\hat{K}_i = \hat{C}_i / \hat{F} \quad (5.8)$$

として求めた。図 5.12 と同じ部位について、式 (5.8) により、脂肪酸組成の分布を可視化した結果を図 5.14 に示す。なお、式 (5.8) による変換では、脂肪分が少ない部分では著しく精度が悪化するため、可視化の対象は脂肪分が多い部分 (脂肪分が 30 [%] 以上と推定された部分) のみに限った。

和牛のサーロイン部位を、1 [cm] 角に分割し、脂肪の融点の分布を調べた小林らの研究によれば [84]、脂肪融点は不均一に分布していること、体表側で融点が高く、深部側で融点が高い傾向があることを報告している。また、融点と不飽和脂肪酸組成の間には、強い



負の相関があると報告している。即ち、体表側では不飽和脂肪酸組成の値が高く、深部側では低い傾向にあると言い換えることが出来る。図 5.14(c) に示した不飽和脂肪酸組成の可視化結果では、体表側 (画像上方) で値が高く、深部側 (画像下方) で値が低くなる傾向が見られることから、前述の知見と一致する。この結果は、本手法による可視化結果の妥当性を強く支持するものであり、本手法が、理化学分析手法では不可能な、非常に高い解像度での成分分布可視化を行う手法として有用であることを裏付ける結果であるといえる。

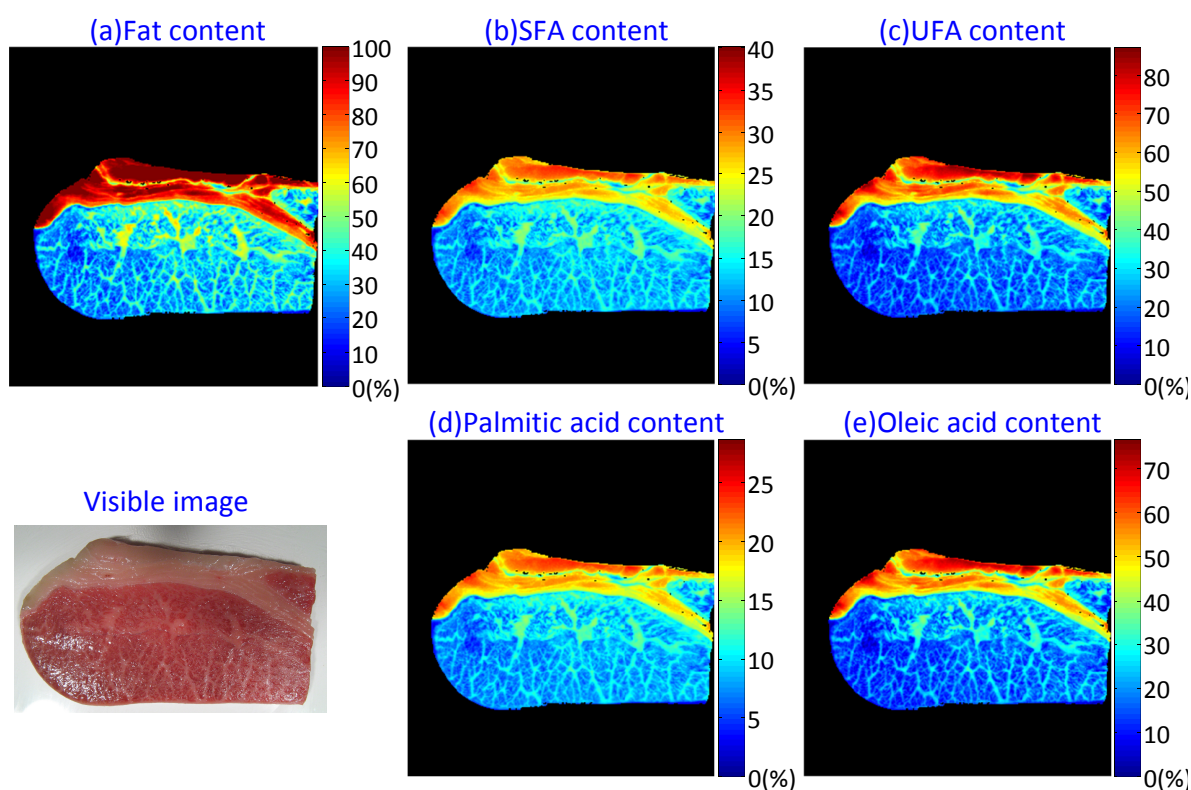


図 5.12 脂肪分および各種脂肪酸含量の可視化結果例

## 5.7 本章のまとめ

本章では、近赤外分光画像計測法と PLS 回帰分析を用いることで、牛肉の品質に大きく関わる成分である、脂肪分と、各種脂肪酸を推定する回帰モデルを生成した。また、分光画像の各ピクセルにモデルを適用することで、各成分の空間分布の可視化を行った。その結果、先行研究と同様の、体表側で不飽和脂肪酸の組成が高く、体心側では不飽和脂肪酸の組成が低くなるという傾向が確認できた。

本章では、近赤外分光画像計測法を応用することで、理化学分析手法では実現困難な非常に高い解像度 (  $380 [\mu\text{m}/\text{pixel}]$  ) で、食品中の成分を可視化することが可能であること



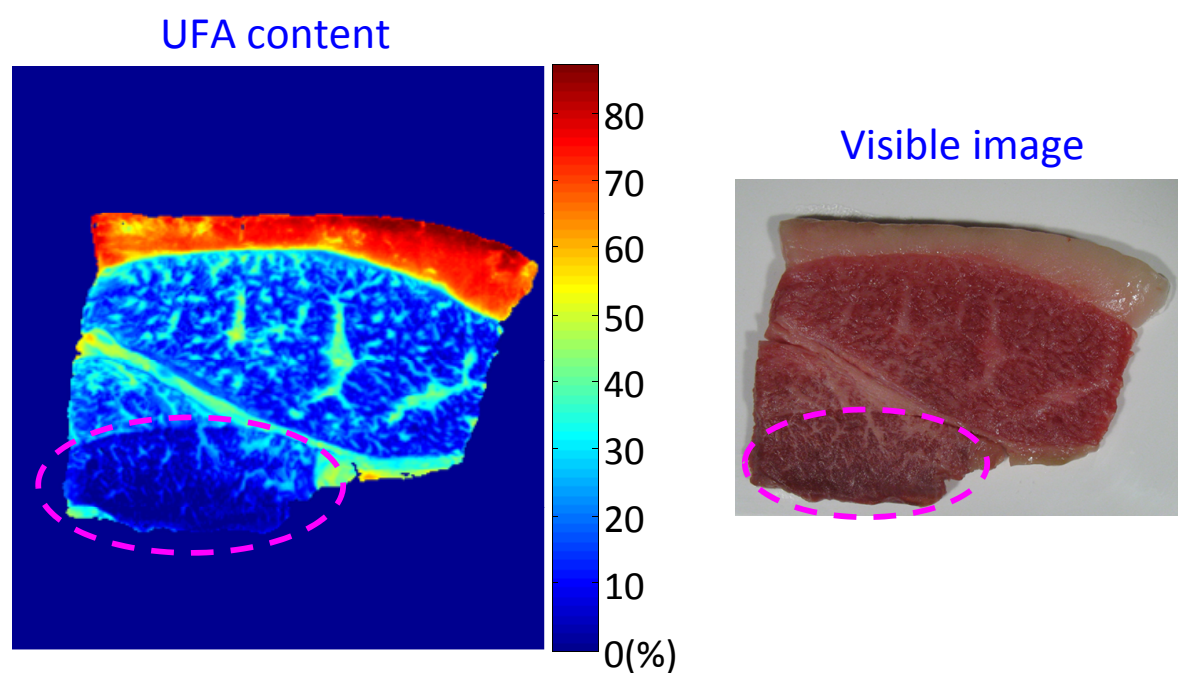


図 5.13 総不飽和脂肪酸含量の可視化結果例

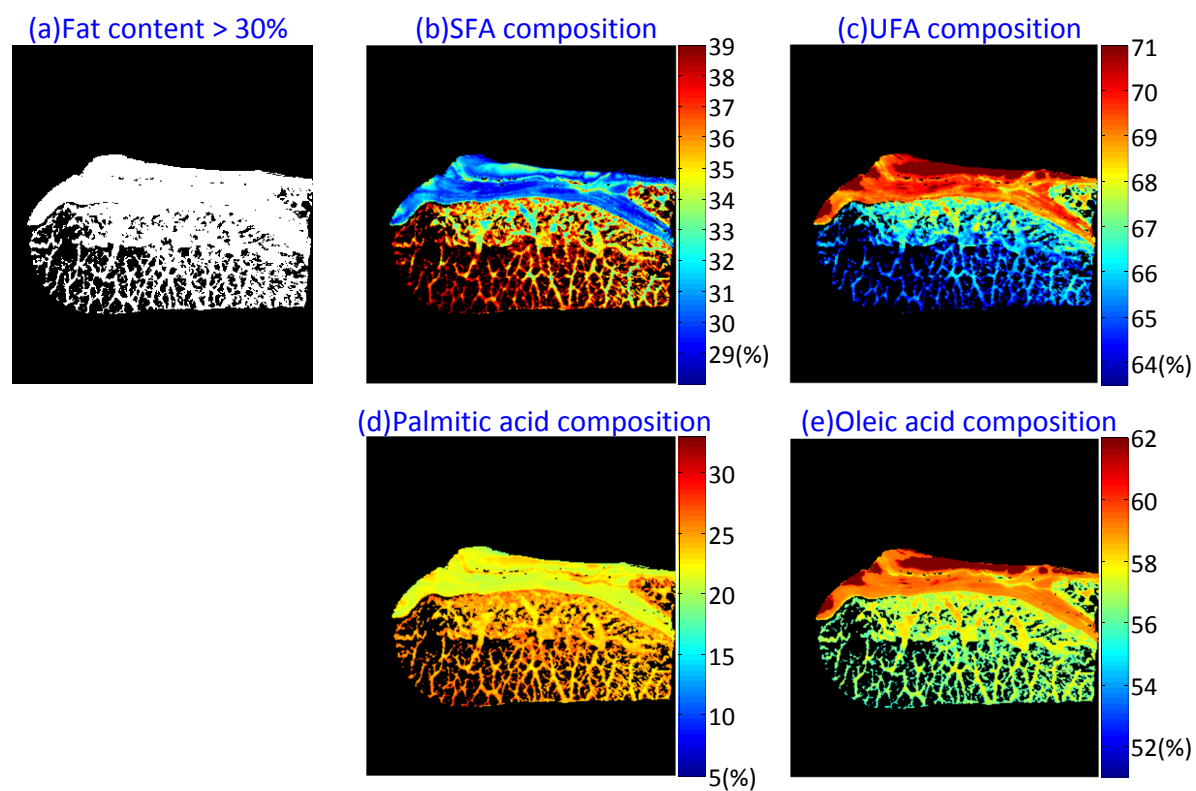


図 5.14 脂肪酸組成の可視化結果例

を示した。本手法では、約 200 次元の分光データを用い、PLS 回帰分析の際に 3 ～ 6 次元まで削減した情報 (潜在変数) から成分の推定を行なっているが、この手法では、推定・可視化時にもサンプルの分光画像計測が必須である。

次章では、分光情報を背景にしつつ、成分の推定・可視化時には、サンプルの分光計測が不要なシンプルな計測を実現する方法について述べる。

## 第 6 章

# 数枚組の帯域透過光学フィルタを用いた分光情報の抽出と食品成分分布可視化への応用

### 6.1 本章の概要

第 5 章では、近赤外波長帯の詳細な分光情報を全て用いた回帰分析により、食品に含まれる特定成分の含有量を推定し、その空間的な分布を可視化した。詳細な分光スペクトルは、非常に多くの情報を含んでおり、広範囲な目的に使用可能な情報を抽出できるポテンシャルを持っているが、特に画像計測に適用しようとした際には、分光を行うデバイスが非常に高価であることが、実応用上の大きな障壁になっている。

本章では、詳細な分光情報をベースに、複数枚の光学フィルタ特性を設計することで、ターゲットとした情報の抽出に特化した計測システムを実現する。本手法では、光学フィルタ特性の設計時には詳細な分光計測が必要だが、実応用時には、設計した数枚の光学フィルタを通して画像計測を行うことで、分光画像計測と同等の結果が得られることになり、簡易で低コストな実応用が可能となる。

本章では、フィルタの理論設計と設計値による理論評価を行った後、設計特性を光学フィルタとして実装し、実計測による性能評価までを行った結果について述べる。

### 6.2 背景

従来、分光情報を用いた応用では、ダイレクトに分光計測を使用するもの、あるいは二波長法に代表されるような、狭帯域の干渉フィルタ等を用いて特定の波長成分のみを抽出して分析する方法が主流であった。前者は分光法をそのまま応用したものであるが、分光

装置が必要であり、特に画像計測へ応用する場合には、コストの問題や計測時間の問題、データ量の問題が顕著になり、実用化が困難である。後者の場合は計測が簡易で、コストや計測時間等の問題もないが、抽出できる情報量が極端に制限されるため、推定モデルの精度や頑健性が犠牲になりやすい。また、どちらの手法についても、特定の波長のみを透過するような狭帯域のフィルタが用いられるため、像が暗くなり、S/N 比を上げにくいという問題がある。

しかし、分光情報を使った応用を行う際には、必ずしも上記のようないわゆる一般的な分光計測手法に準じた計測を行うことが最良とはいえない。即ち、応用の際には、等しい波長間隔で計測を行う必要はないし、ピンポイントで特定の波長を狙った計測を行わずとも、広帯域のフィルタで捉えるようにすることで、S/N 比も改善し、推定精度も向上できる可能性がある。また、前章で述べた分光情報を全て使用した手法でも、推定モデルではわずか 3 ～ 6 次元程度の情報しか使っていなかったことから、結局のところ、約 200 波長もの計測データは大部分が有効に使用されないともいえる。

以上のような発想から、本研究では、帯域幅を持った数枚の光学フィルタセットを使用した計測手法を提案し、使用するフィルタの透過特性の設計を行った。なお、本手法では、分光情報を全て使用する手法と比較した場合の制限として、スペクトル情報が必要な MSC による補正や微分処理等の前処理が適用できない点が挙げられる。

### 6.3 帯域透過光学フィルタの設計方法

本研究では、使用する光学フィルタの特性を、理想的な帯域透過フィルタとして設計を行った。1 枚の光学フィルタ特性は、透過帯域の中心波長 ( $\lambda_c$ ) と、帯域幅の  $1/2$  ( $w_h$ ) の 2 つのパラメータでモデル化した。ここで、最小の帯域幅と、最大の帯域幅の制約を考慮すると、フィルタ特性として選択可能な範囲は、(後述の図 6.2 のように) 平面上の台形領域として表すことが出来る。

フィルタの特性は、次に示す手順によって設計した。

#### フィルタ特性の設計手順

1. 始めに、フィルタ枚数  $n$  を決める。
2.  $m$  番目のフィルタ ( $m = 1 \sim n$ ) の特性を、下記手順の繰り返しによって決定する。
3.  $m$  番目のフィルタ用の、評価値マップと条件試行回数のカウントマップを 0 に初期化する。  
このマップは、フィルタ特性を決める 2 つのパラメータの値を各軸にとり、平面上に表したもので、ひとつのフィルタ特性がひとつの座標点に対応する。
4.  $\{m, m+1, \dots, n\}$  番目のフィルタ特性を、ランダムに発生する。
5. 各サンプルの分光反射率データと、既に固定している  $\{1, 2, \dots, m-1\}$  番目のフィルタ特性および前ステップで発生したフィルタ特性から、各サンプルをこれら合計  $n$  枚のフィルタを通して計測した際の出力値を計算により求める。
6. 求めたフィルタ出力値を説明変数、理化学分析値を目的変数として、重回帰分析により推定モデルを作成し、モデルの評価値  $v$  を求める。
7.  $n$  枚のフィルタ特性に対応する、評価値マップ上の  $n$  点に、評価値  $v$  の値を加算する。
8. 同様に、カウントマップ上の  $n$  点についても、条件試行回数を記録するため 1 だけ加算する。
9. 「4.」から「8.」について、十分な試行回数  $t$  になるまで繰り返す。
10. 評価値マップをカウントマップで除算することにより、平均評価値マップを生成する。
11. 平均評価値マップ上で、最大 (または最小) 値を示す座標点のフィルタ条件を選択し、 $m$  番目のフィルタ条件として固定する。
12. (以降、 $n$  番目のフィルタが選択されるまで、「3.」以下を繰り返す。)

ステップ「5.」において、フィルタ出力値  $f'$  は、波長  $\lambda$  におけるサンプルの分光反射率を  $R(\lambda)$  として、以下の式により求めた。

$$f' = \frac{\int_{\lambda_c - w_h}^{\lambda_c + w_h} R(\lambda) d\lambda}{2 \times w_h} \quad (6.1)$$

この選択手法の特徴は、各試行において、常に使用するフィルタの枚数  $n$  枚を組み合わせ使用した状態で、評価値を求めている点である。様々な特性の組み合わせを試行した結果、ある条件と組み合わせた際に、平均的に高い評価値が得られるならば、その条件を使用するという方針で選択が行われる。

## 6.4 牛肉の品質評価への適用

第5章と同様に牛肉の品質評価を目的として、牛肉中のオレイン酸含量、総不飽和脂肪酸含量、脂肪分の3成分をターゲットに、複数枚の光学フィルタを用いた手法を適用した。

設計に使用するデータは、第5章で使用した90サンプルに新たに計測した36サンプルを加えた、合計126サンプルから抽出した分光反射率を使用した。これをサンプルセット1として、全数をフィルタの設計に使用した。

これとは別に、新たに65のサンプルを同様に計測・分析した。これをサンプルセット2として、設計された光学フィルタを用いた実計測による評価に使用した。(なお、理化学分析上の問題があったため、不飽和脂肪酸については、使用出来るデータ数は62である) サンプルセット2は、23頭の牛(黒毛和種、年齢28～37[ヶ月](平均年齢30.3[ヶ月]))の様々な部位(リブロース、ラムイチ、ロインロース、カタロース、ウチヒラ、ウデ、サーロイン)から作成されたものであり、厚さも10～20[mm]程度であるなど、サンプルセット1に比べ、サンプルの大きさは様々で、不揃いであるものを使用した。

分光画像計測システムの構成、計測条件、スペクトルデータの抽出方法、および理化学分析の方法は、5.4節で述べたものと全く同一である。また、サンプルの作成法についても同様である。

表6.1に、全サンプルの理化学分析値に関する統計量を示す。

表 6.1 理化学分析値の統計量

		Fat content (% wet sample weight)	Fatty acid content (% wet sample weight)		Fatty acid composition (% of fat weight)	
			Total UFA	Oleic acid	Total UFA	Oleic acid
Sample set 1	n	126	126	126	126	126
	Mean	30.92	20.81	17.69	66.76	56.60
	SD	14.66	10.41	8.96	3.02	2.84
	Min	5.25	3.46	2.76	57.80	50.14
	Max	71.23	51.49	43.64	72.52	63.13
Sample set 2	n	65	62	65	62	65
	Mean	30.74	19.65	17.07	64.02	55.42
	SD	9.44	6.20	5.48	4.40	4.21
	Min	6.82	4.11	3.63	53.31	46.18
	Max	59.26	40.05	35.02	75.96	67.86

また、図6.1に、サンプルセット1の分光反射率特性を、脂肪分の理化学分析値に応じて色付けして示す。光学フィルタを用いた計測では、得られるデータがスペクトルではないため、実計測時に第5章で用いたMSC等のスペクトルの補正手法は適用できない。

従って、設計で用いるスペクトルに関しても、補正は行わずに得られた分光反射率をそのまま使用する。

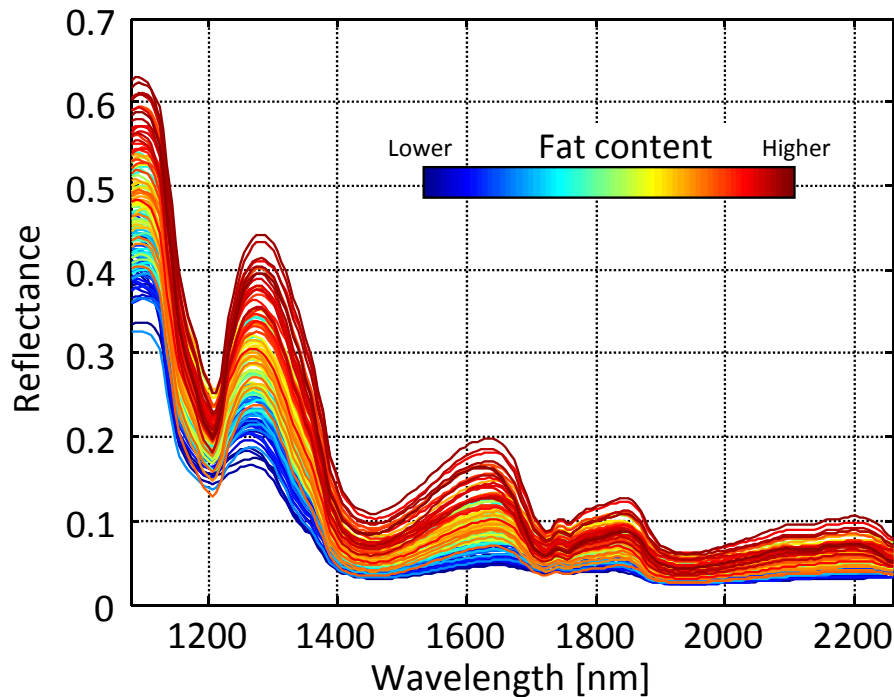


図 6.1 全サンプルの分光反射率スペクトル

#### 6.4.1 フィルタ特性の理論設計

分光画像計測で得られたデータの S/N 比 (5.4.3 節を参照) に加え、フィルタ計測に用いる近赤外モノクロカメラの分光特性を考慮し、使用する波長帯を 1080 ~ 2259 [nm] とした。また、光学フィルタ実装上の制限から、最大帯域幅を 1000 [nm] ( $w_h = 500$  [nm]) とし、最小帯域幅はカメラに入射する光量を一定以上にして、S/N 比を高く保つため、50 [nm] ( $w_h = 25$  [nm]) に制限した。以上の制約をフィルタモデルに使用する 2 変数平面上で図示すると、選択可能な特性は図 6.2 の台形内の座標点として示される。

フィルタセットの枚数は、フィルタ実装時のコストや計測時間、設計時の計算量と推定精度のトレードオフを考慮し、各成分ごとに 3 枚とした。フィルタ設計では、サンプルセット 1 を 84 サンプルと 42 サンプルに 2:1 に分割し、試行条件下で 84 サンプルを用いて重回帰モデルを作成し、評価値  $v$  として、作成した重回帰モデルを 42 サンプルに適用して求めた決定係数  $r^2$  を使用した。また、1 枚のフィルタ特性を選択する際の繰り返し試行回数  $t$  は 1,000,000 回とした。

図 6.3 に、各成分用に設計した個々のフィルタセットについて、1 枚目、2 枚目、3 枚目

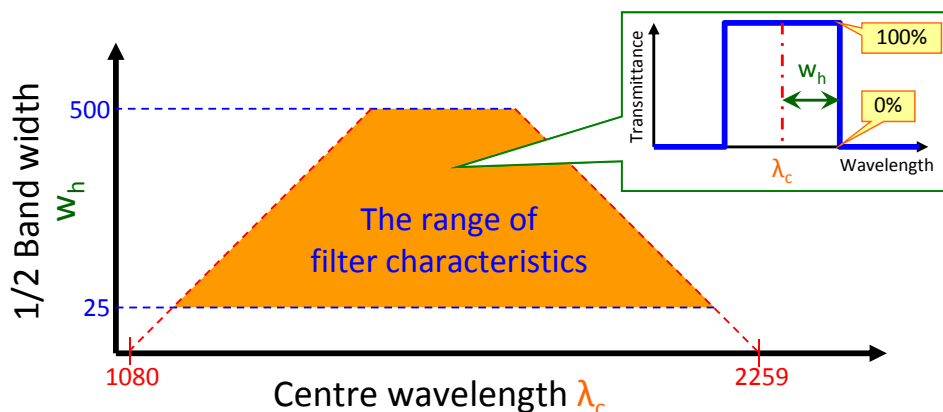


図 6.2 フィルタモデルと選択可能な特性の領域

の特性を選択する際に使用した平均評価値マップを示す。いくつか興味深いパターンが見られる。例えば、既に選択されたフィルタ条件 (2 枚目選択時のマップにおける 1 枚目の条件や、3 枚目選択時における 1 枚目と 2 枚目の条件) の周辺は、局所的に評価値が悪くなっている傾向が確認できる。マップ中の近傍のフィルタ条件は互いに似た特性であるため、同じサンプルに対して共通の変動をすると考えられることから、この傾向は妥当であると考えられる。また、オレイン酸含量推定用の 3 枚目のマップ (図 6.3(a) 最下段) を見ると、選択可能な特性の範囲である台形の左の脚にほぼ平行する形で、評価値が大きく変化する境界が確認できる。これは、ある波長以下を透過するようにすると、急激に評価値が悪化することを意味する。

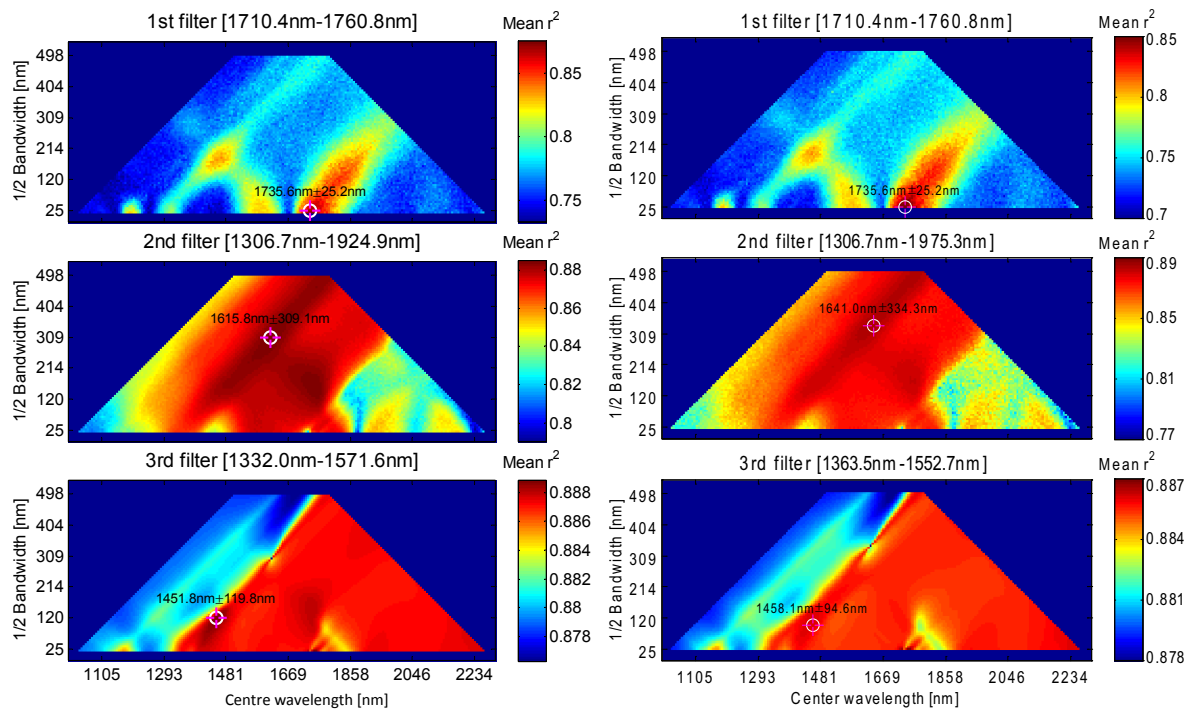
図 6.4 に、設計に使用した分光反射率スペクトルに重ねて、設計した帯域透過フィルタの透過域を示す。設計特性は破線と矢印で示した帯域を透過するフィルタである。この図には、設計値をもとに、多層膜蒸着技術により実際に作成した、光学フィルタの透過特性の実測値も同時に示している (後述)。

オレイン酸含量用のフィルタの透過帯域として、1 枚目は 1710.4 ~ 1760.8 [nm]、2 枚目は 1306.7 ~ 1924.9 [nm]、3 枚目は 1332.0 ~ 1571.6 [nm] が選択された。同様に、総不飽和脂肪酸含量用の透過帯域として、1 枚目は 1710.4 ~ 1760.8 [nm]、2 枚目は 1306.7 ~ 1975.3 [nm]、3 枚目は 1363.5 ~ 1552.7 [nm] が、脂肪分用の透過帯域として、1 枚目は 1710.4 ~ 1760.8 [nm]、2 枚目は 1628.4 ~ 1905.9 [nm]、3 枚目は 1313.0 ~ 1426.6 [nm] が選択された。

ここで、1 枚目のフィルタは全て同一の特性が選択される結果となった。この透過帯域には、前章で述べた 1738 [nm] の脂質や脂肪酸に関連する  $CH_2$  による吸収帯域が含まれている。

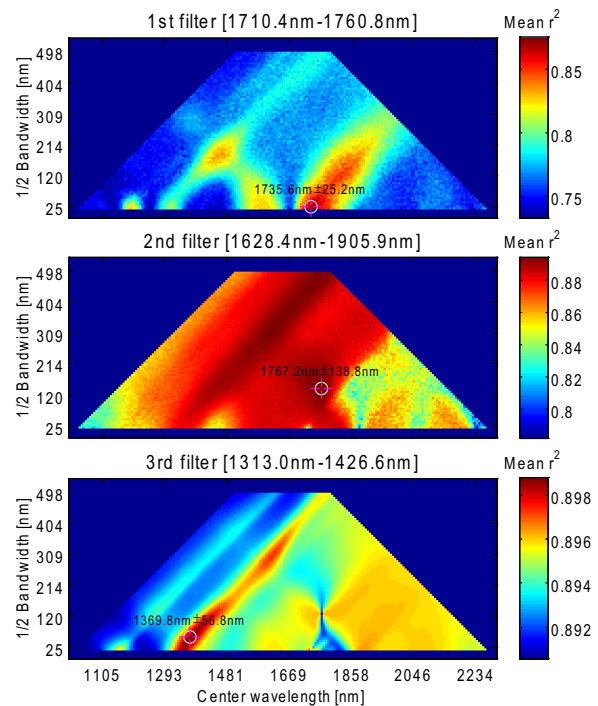
また、いずれのフィルタセットも、透過特性がお互いに完全にオーバーラップする、入





(a) オレイン酸含量推定用

(b) 総不飽和脂肪酸含量推定用



(c) 脂肪分推定用

図 6.3 フィルタ特性の選択に使用した平均評価値マップ

れ子型のフィルタが選択されている。これは、広帯域のフィルタでバイアス状の全体的なシフトを捉え、狭帯域のフィルタで局所的な違いを捉えるような構造になっていると考えられる。

#### 6.4.2 シミュレーションによる評価

実計測による評価を行う前に、設計した理論特性 (理想的な帯域透過フィルタ) と特性の設計に使用した分光反射率のデータを用いて、推定精度の理論評価を行った。

サンプルセット 1 について、サンプルの分光反射率と設計したフィルタ特性値 (理論値) から、計算により求めた 3 つのフィルタの出力値を用いて、重回帰分析により各成分含量を推定した結果を図 6.5 と表 6.3(B) に示す。

比較のため、表 6.3(A) には、全く同じデータ (サンプルセット 1 の分光反射率) から、PLS 回帰分析 (潜在変数の数は、フィルタ数と同じ 3 とした) により各種成分含量を推定した結果を示した。

この結果からは、少なくとも、詳細な分光反射率スペクトルを計測する必要がある PLS 回帰分析に対して、わずか 3 バンドの帯域透過フィルタを通して計測した反射率から、ほぼ同等の精度での推定が可能であることが確認できる。

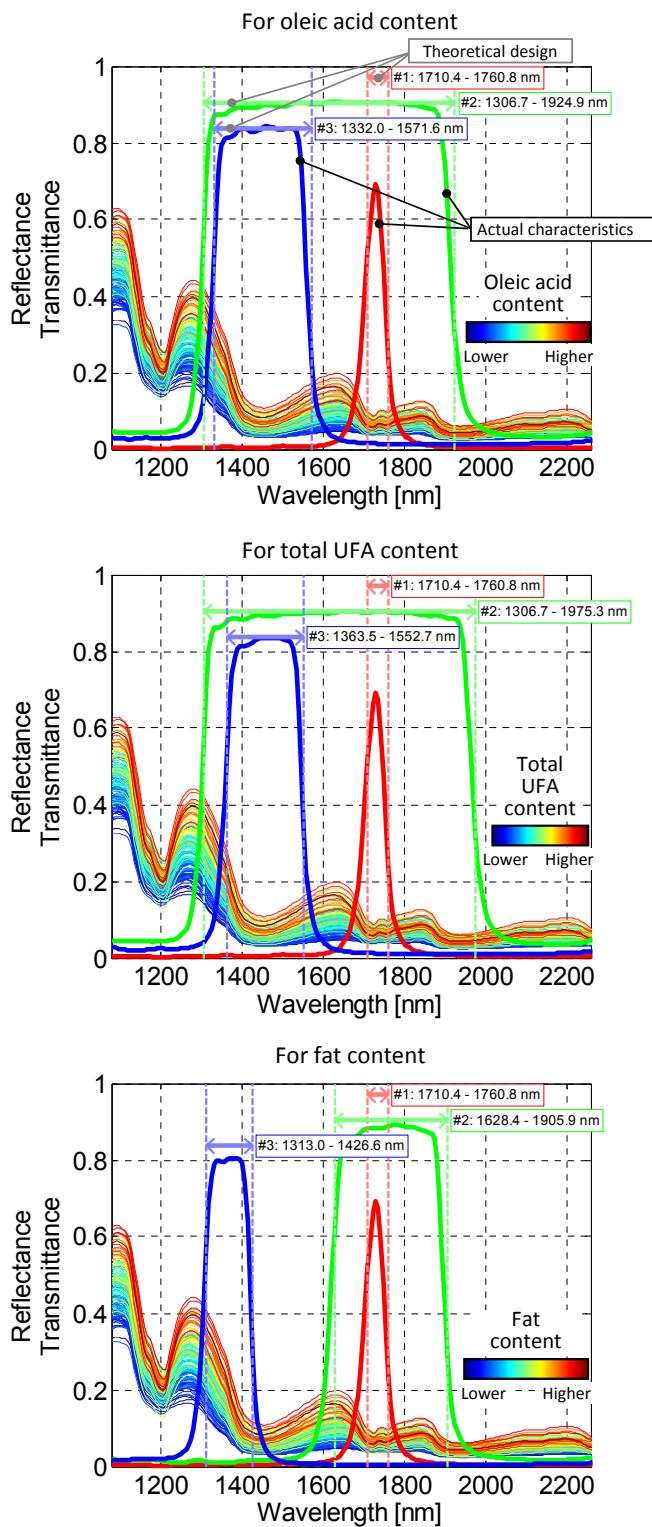


図 6.4 設計されたフィルタの理想特性と実際のフィルタ特性計測値

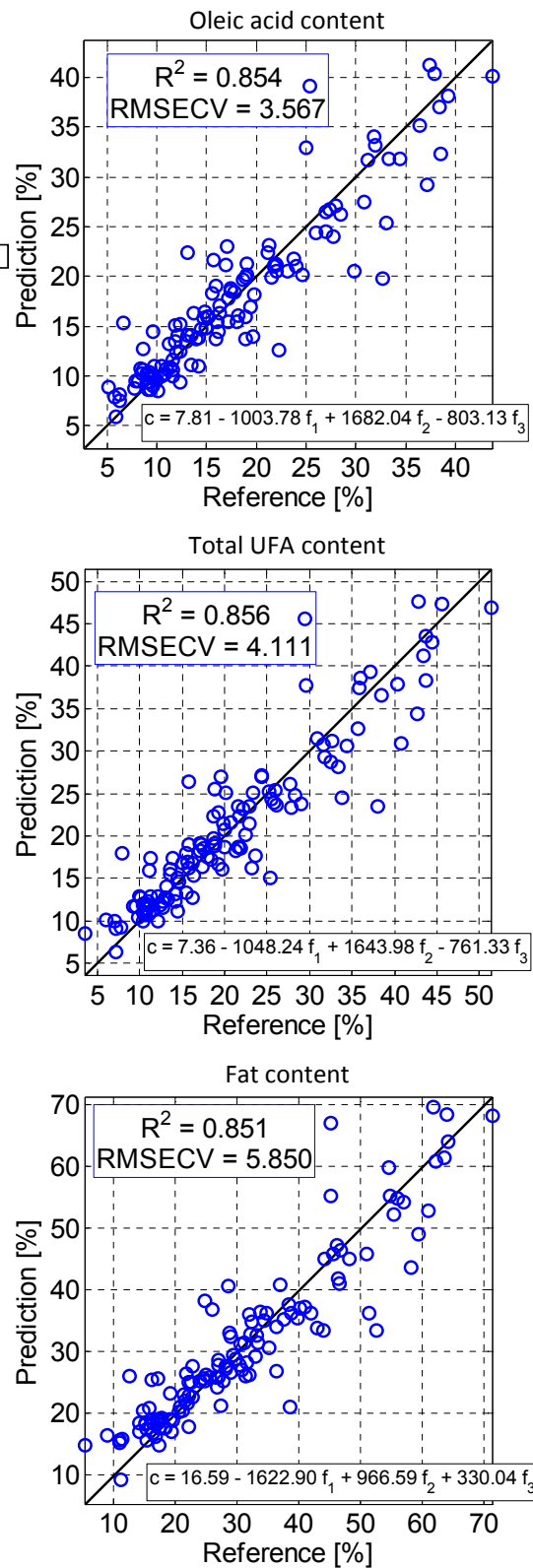


図 6.5 理想フィルタ特性からシミュレートした推定結果

## 6.5 多層膜光学フィルタを用いた実計測による性能評価実験

### 6.5.1 光学フィルタを用いた実計測実験

理論設計した光学フィルタ特性を、多層膜蒸着技術により光学フィルタとして実装し、実測による評価実験を行った。計測のため、近赤外波長帯に感度を持つ高感度モノクロカメラ、フィルタホイール、光源、制御ソフトウェアから構成されるフィルタリング計測装置を試作した。計測システムの構成と外観を、表 6.2 および図 6.6 に示す。このシステムにおいて計測、分析、結果の提示が出来るよう、フィルタごとの露光時間、照明の条件などを試行し、各成分ごとに計測条件を固定した上で、サンプルの実測により検量線を作成した。

表 6.2 フィルタリング計測装置の構成要素

近赤外モノクロカメラ	CV-N750、住友電気株式会社 受光センサ: InGaAs/GaAsSb type-II 量子井戸構造 波長感度範囲: 1000 ~ 2350 [nm] 空間解像度: 320 × 237 [pixel]
フィルタホイール	CFW-1-5, Finger Lakes Instrumentation, USA フィルタ装着可能数: 5 枚
光源	ハロゲン光源 (MH-M15, 150W, Hataya Ltd, Japan) × 2 台
光学フィルタ	各成分ごとに 3 特性作成 (伊藤工学工業株式会社)

### 6.5.2 分光法との比較

サンプルセット 2 について、試作したフィルタリング計測装置で計測し、各成分について推定を行った結果を図 6.7 および表 6.3(D) に示す。比較のため、同じサンプルについて、改めて分光画像計測を行い、PLS 回帰分析 (潜在変数の数はフィルタの数に合わせて 3 とした) によって推定した結果を表 6.3(C) に示した。なお、表 6.3(C) と (D) は、同じサンプルについて、それぞれ別の装置を使って計測し、推定した結果である。<sup>\*1</sup>計測したサンプルは同一ではあるものの、使用しているカメラを含め、計測に使用した装置が全く異なるため、表 6.3(C) と (D) の結果を単純に比較することは難しいが、いずれの成分について

<sup>\*1</sup> これに対し、表 6.3(A) と (B) は、全く同じ分光画像データをもとに、別の方法で推定し比較したものである点が異なっている。

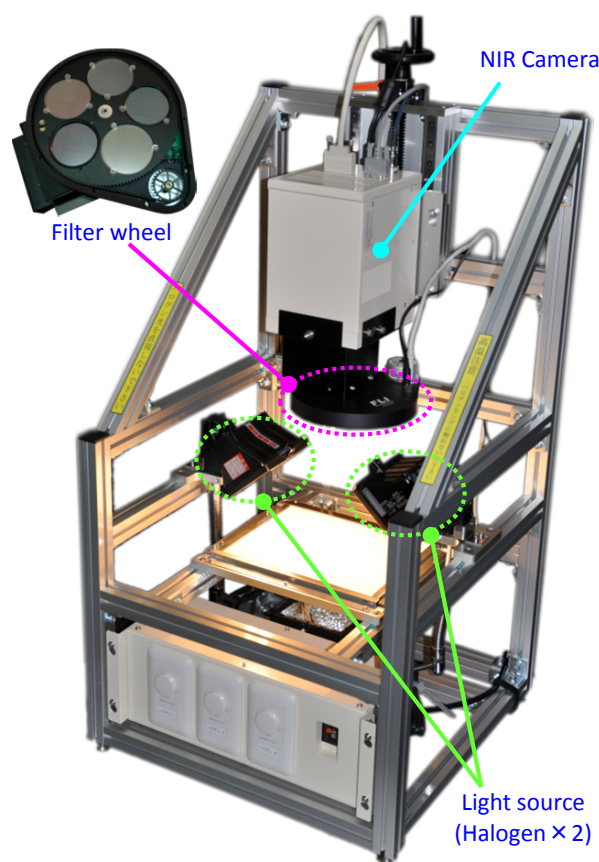


図 6.6 フィルタリング計測装置の外観

も、フィルタリング計測を用いた本手法の方が決定係数  $R^2$  が高く、誤差  $RMSECV$  <sup>\*2</sup> がより小さい推定結果が得られた。その要因の一つとしては、本手法が広い透過帯域の光学フィルタを用いていることから、計測される画像の S/N 比の点で優れていることが考えられる。

一方、全く同じ PLS 回帰分析を用いた手法でありながら、表 6.3(C) は、(A) に比べて評価値が明らかに悪い。その原因としては、サンプルセット 1 では、サンプルの条件が細かく統一されており、またサンプルの元となった個体もわずか 3 頭であるのに対し、サンプルセット 2 では、サンプルの厚さも含めて、大きさの条件が不揃いであり、サンプルの元となった個体も非常に多いことが影響したと考えられる。いずれにしても、サンプルに関しては同じ条件でありながら、表 6.3(C) に比べ (D) は同等かそれ以上の性能が確認できたことは、本手法の有効性を強く示す結果であると言える。

<sup>\*2</sup> RMSECV (Root-mean-square error of cross validation): 交差検定 (Leave-one-out 法を使用) における二乗平均平方根誤差

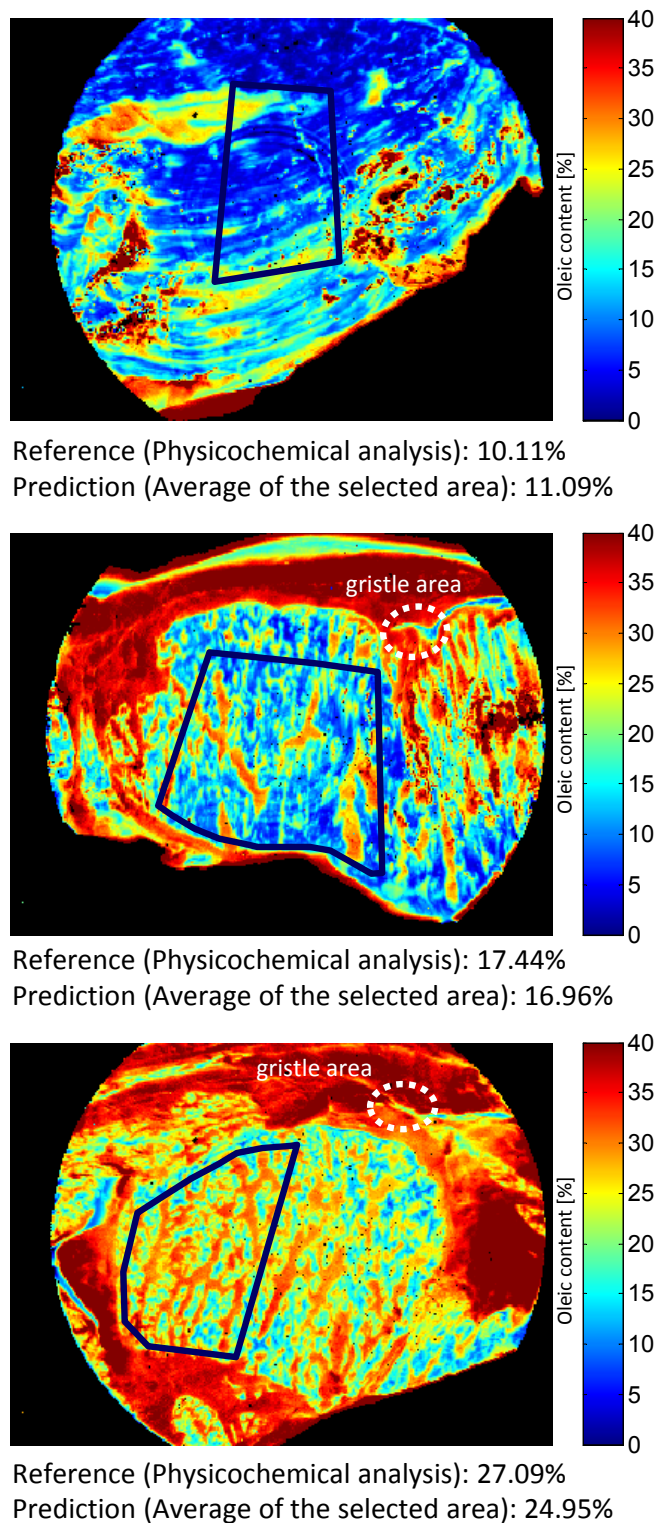
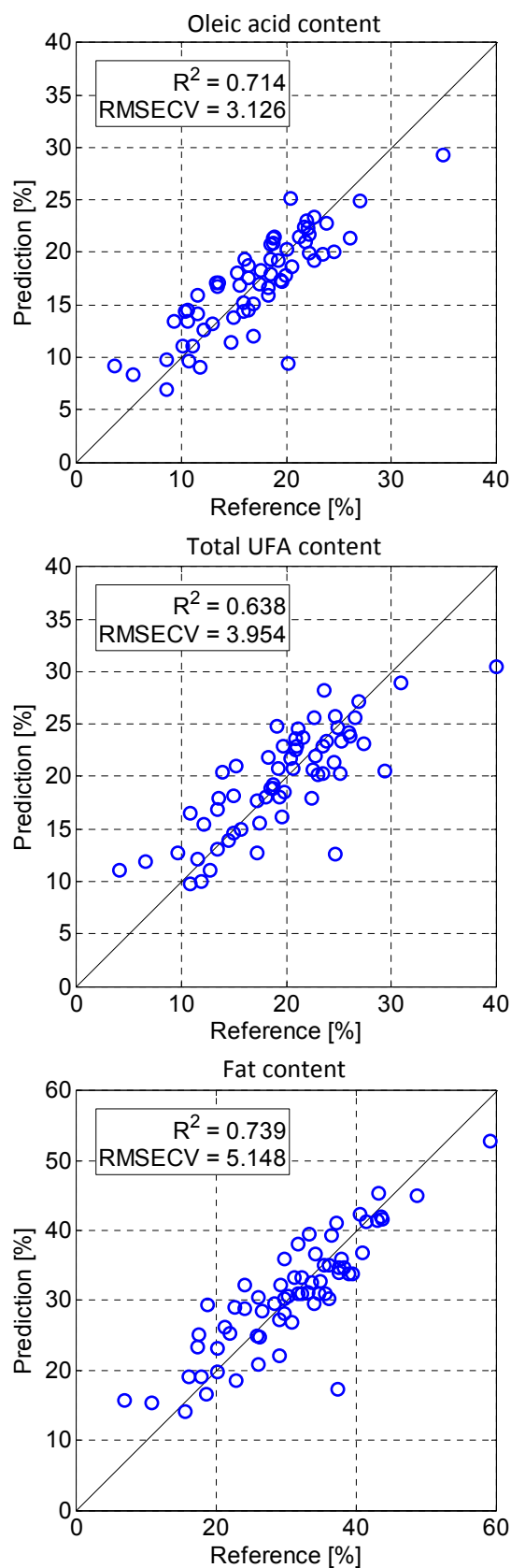


図 6.8 実フィルタ計測による成分含量の可視化結果

図 6.7 実フィルタ計測による推定結果



### 6.5.3 可視化結果の評価

計測したフィルタ画像の各ピクセルについて成分を推定することで、成分分布の可視化を行った結果の例を、図 6.8 に示す。(図中の黒線で囲んだ部分は、理化学分析を行った部分として選択した領域である。理化学分析値と、この領域内のピクセルを抽出して平均した値も記載した。) この例では、図中の上から順に、理化学分析により求めたオレイン酸含量の値が少ないサンプル、中程度のサンプル、多いサンプルの 3 種類を示している。いずれも、少なくとも目視 (あるいは通常のデジタルカメラ等) では白く見え、明らかに脂肪の部分であると判断できる部分 (皮下脂肪や筋間脂肪部分) については、オレイン酸含量の値も高く推定されていることが確認できた。このことは、脂肪酸含量の定義 (式 (5.1)) より、妥当である。また、脂肪中の軟骨状の筋 (スジ) の部分 (図中白色の破線で囲った部分) については、目視では脂肪と同様に白く見えるため、見分けが困難であるが、本手法による可視化結果では、オレイン酸含量が少ないと正しく推定された。

以上により、オレイン酸含量、総不飽和脂肪酸含量、脂肪分についてそれぞれの分布の可視化が可能であることが示された。

しかし、これらの成分分布可視化結果から、品質を判断することは簡単ではない。そこで、より理解しやすい形での結果の提示の仕方を検討した。まず、式 (5.8) を用いることで、脂肪酸含量を、脂肪の融点に強い相関がある、脂肪酸組成に換算した。推定された脂肪酸含量値と脂肪分から、脂肪酸組成に換算した場合の推定結果を表 6.3(E) に示す。

ここで、不飽和脂肪酸やオレイン酸の組成 (脂肪に占める割合) が多い場合は、少ない場合に比べて脂肪の融点が下がるため、より柔らかく、舌触りが滑らかな肉質と判断できる。また、格付けの際にも非常に重視されており、いわゆる「霜降り」度合いの判断に直接関係する脂肪分の分布は、その形状等も含めて、品質判断の上で非常に重要と考えられる。

そこで、図 6.9 に示すような 2 次元のカラーマップを用いることで、1 種類の脂肪酸組成と、脂肪分の、合計 2 成分を同時に可視化する方法を採用した。このカラーマップでは、色相に脂肪酸組成の軸を (脂肪酸組成が少ないほど青く、多いほど赤く)、輝度に脂肪分の軸を (脂肪分が少ないほど暗く、多いほど明るく) 対応させている。図 6.10 は、このカラーマップを用いて、オレイン酸組成と脂肪分を同時に可視化した例である。

この可視化手法を用いることで、「赤い場合は柔らかい」「青い場合は硬い」など、色合いから脂肪の性質、肉質の柔らかさに関する判断が可能となり、明るい色で可視化されている脂肪分の高い領域の分布状況から、脂肪の量や、霜降りの度合いが判断可能となる。図 6.10 の例で言えば、中央のサンプルに比べて、上と下のサンプルはどちらも霜降りの度合いが高く、しかし、上のサンプルは硬く、下のサンプルは柔らかいことが一目で判断できる。

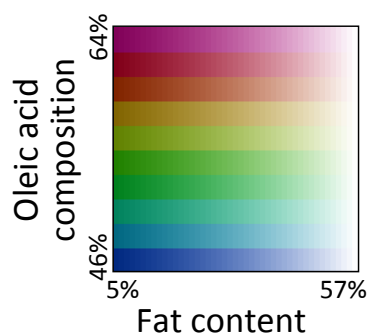
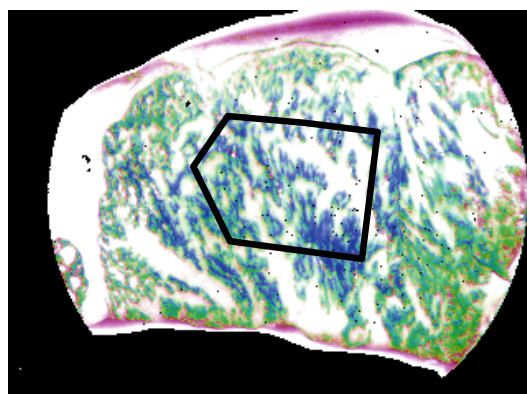


図 6.9 オレイン酸組成と脂肪分を同時に可視化するためのカラーマップ

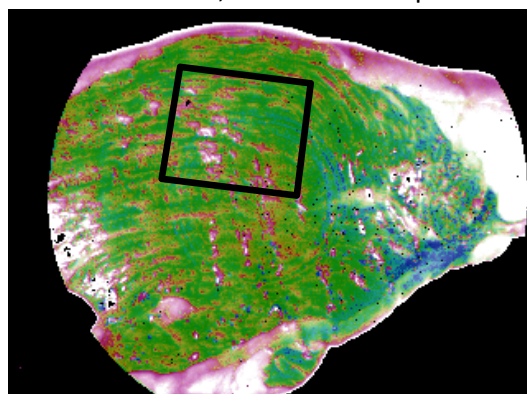


Reference (Physicochemical analysis):

Fat content = 41.45%, Oleic acid composition = 52.59%

Prediction (Average of the selected area):

Fat content = 41.22%, Oleic acid composition = 50.12%

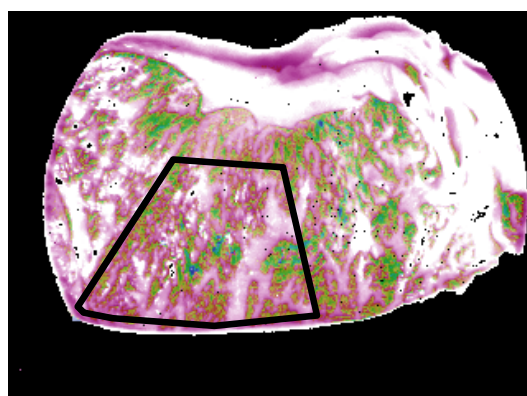


Reference (Physicochemical analysis):

Fat content = 18.50%, Oleic acid composition = 57.96%

Prediction (Average of the selected area):

Fat content = 16.64%, Oleic acid composition = 55.36%



Reference (Physicochemical analysis):

Fat content = 39.53%, Oleic acid composition = 65.94%

Prediction (Average of the selected area):

Fat content = 33.75%, Oleic acid composition = 62.29%

図 6.10 オレイン酸組成と脂肪分を同時に可視化した例



表 6.3 各手法での推定結果の比較

					Content		
					Fat	UFA	Oleic
Sample set 1	Hyperspectral Data	(A)	PLS (Use 3 factors)	n	126	126	126
				R <sup>2</sup>	0.868	0.863	0.863
				RMSECV	5.603	4.060	3.492
		(B)	Filtering method (Simulated)	n	126	126	126
				R <sup>2</sup>	0.851	0.856	0.854
				RMSECV	5.850	4.111	3.567
Sample set 2	Filtered Data	(C)	PLS (Use 3 factors)	n	65	62	65
				R <sup>2</sup>	0.643	0.619	0.610
				RMSECV	6.122	4.135	3.697
		(D)	Filtering method (Use 3 filters)	n	65	62	65
				R <sup>2</sup>	0.739	0.638	0.714
				RMSECV	5.148	3.954	3.126
	(E)	Filtering method (Use 5 filters)	Composition				
			--	UFA	Oleic		
			n	--	62	65	
			R <sup>2</sup>	--	0.166	0.310	
			RMSECV	--	4.437	3.908	

## 6.6 本章のまとめ

本章では、分光画像計測法と同等の機能を実現する、数枚の光学フィルタによるシンプルで実用的な計測手法を提案し、牛肉の成分推定とその分布可視化への応用を行った。さらに、光学フィルタとして実装し、実測を行うことで、手法の有用性を示した。

また、推定した成分の空間的な分布について、カラーマップを用いることで、2成分の分布を同時に可視化する手法を適用することで、結果を分かりやすく示した。

なお、本研究では、フィルタ特性の選択において平均評価値マップ上の最も評価値が高い点を選択したが、このマップを使用した、異なる特性選択のアプローチも可能である。例えば、評価値が比較的高い条件が、広く分布しているような領域の中心の条件を選択すれば、局所的に評価値が高い点を選んだ場合に比べて、フィルタ実装時の特性のズレなどに対して、より頑健なフィルタとなることが期待できる。



## 第 7 章

# 総括

本論文では、分光画像計測手法の応用により、対象についての情報を抽出する手法について述べ、具体的なターゲットとして、食品に関わる分野への適用を行った。本論文では、実用時の計測において分光デバイスを不要にする二つの手法を提案し、従来実用上の障壁となっていたコストや計測時間、計算資源の問題の解決を目指した。

第 3 章と第 4 章では、食品において極めて重要な、微生物リスクに対する応用として、迅速な検出に重点を置いた手法について実証した。

まず、第 3 章では、詳細な分光情報を用いることで、モデル微生物として使用した 4 種類の菌について、直径 300 [ $\mu\text{m}$ ] 程度のマイクロコロニーであっても、それぞれコロニー単位での識別が可能であることを示した。本手法では、予め想定した微生物のみを判別可能であるが、培地や温度等の培養条件と組み合わせることで、生育する微生物を一定の範囲に限ることは可能である。他の手法による菌種同定では、一般に事前の純粋培養、即ち培養条件の制御と数段階の培養によって単一の菌体を得た後に分析を行う必要があるのに対し、本手法は、複数の微生物が混在した状態での菌種判別を可能とする。従って、長時間を要していた純粋培養を省くか、段階数を減らす事が可能となるため、迅速な検査が可能な手法であると結論できる。

第 4 章では、より迅速な微生物の検出と、計測システムの簡易・低コスト化を目指し、LED の分光放射特性をそのまま用いる検出システムを提案した。本研究では、検出感度の向上のため生菌に反応する試薬を併用し、これを高感度に捉えるための LED 光源を選択した。試作した装置は、試薬反応部を捉えるため、ターゲットとした微生物だけでなく、同じ試薬が適用可能なあらゆる微生物の検出にそのまま使用可能である。また、単純に LED 光源を対象に合わせて変更するだけで、例えば他の試薬を用いた検出システムが実現可能である。同様のアプローチは、特定のスペクトル特性を強調するような様々な用途に対して応用が期待できる。本手法は、フィルタホイールのような機械的な可動部を必要とせず、電氣的な ON/OFF のみで分光特性の切り替えが可能なこと、市販されている

モノクロカメラと LED を用いて、極めて安価に計測システムが構築可能であり、十分な性能が達成可能であることなど、実用上の多数のメリットを持つ手法であるといえる。

第5章と第6章では、食品の品質評価への応用として、含まれる成分の空間分布可視化を行う手法について述べた。具体的なターゲットとしては生の牛肉を使用し、含まれる脂肪分と脂肪酸の推定・可視化を実現した。

まず第5章では、分光計測法としてポイント計測で行われてきた手法を、分光画像にそのまま適用することで、各成分の空間分布可視化が可能であることを示した。即ち、様々な部位の牛肉サンプルに対しても、1000 ~ 2300 [nm] の波長帯の近赤外分光画像情報を用いることで、脂肪分、脂肪酸の推定・可視化が可能であることを実証した。

続いて第6章では、分光画像計測法と同等の機能を実現する、数枚の光学フィルタによるシンプルで実用的な計測手法を提案し、第5章同様に、牛肉の成分推定とその空間分布可視化への応用を行った。使用する光学フィルタは、一定以上の帯域幅を持った帯域透過フィルタとして、推定する成分毎に、専用に透過特性を設計した。設計特性を光学フィルタとして実装し、サンプルの実計測により推定精度の比較を行ったところ、僅か3枚(3特性)の光学フィルタ画像から得られた推定精度の方が、約200枚(200波長点)の分光画像を用いて得られた推定精度よりも優れているという結果が得られた。本手法では、使用するフィルタの枚数を3枚としたが、より枚数を増やすことで、精度の向上も可能である。実応用においては、フィルタ作成のコストおよび計測時間と、必要な精度とのトレードオフを考慮して、使用するフィルタ枚数を決定することが必要だが、目的に応じて、自由度の高い設計が可能である。なお、本研究で述べたフィルタ特性の設計手法は、まだ改良の余地も大きく、他の様々な最適化手法との比較も含め、今後の検討が必要である。

以上のように、本論文では光源側の特性を利用する方法と、検出器(カメラ)側で光学フィルタを利用する方法について述べた。前者は対象の分光特性を素直に使用する手法といえるが、後者は計測対象の条件により強く依存した手法であると考えられる。即ち、第5章で設計した光学フィルタセットは、“牛肉上の”各成分の推定に適したものであり、従来の分光法で注目する、特定の波長成分(例えば、推定したい成分を単独で計測した際に観察される吸収ピーク波長)とは必ずしも一致しない。むしろ、牛肉に含まれる様々な成分を反映したスペクトルの中から、各フィルタの組み合わせによって、推定したい成分による変動のみを抽出することの出来る特性が選択されることになる。実用を行う上では大きな問題とはならないが、選択された特性の解釈に関してのより詳細な検討も、今後必要である。

本論文では、現実の問題となっているターゲットを選択し、低コスト化を目指した計測システムの提案、実測による評価・実証など、実用を強く意識した研究について述べてきた。しかし、フィルタ特性の設計手法や、計測条件の工夫など、改善可能な点、改善すべき点も多く残されている。例えば、計測時の鏡面反射を防ぐために偏光を用る、フィルタ

設計時に使用する評価値をさらに工夫する、設計時のフィルタ形状を理想的な矩形ではなく、より実際のフィルタに則した形状とする等、数多くの課題が考えられる。一方で、極めてシンプルとも言える本論文で述べた手法によっても、分光を用いた手法に匹敵する精度が得られたことから、本アプローチが非常に大きなポテンシャルを秘めていることを窺わせる。

## 今後の展望

分光画像計測技術、特に非常に高い波長解像度を持つハイパースペクトラルイメージングは、計測技術の進歩と計算機性能の著しい向上によって、ここ数年で急速に現実的になってきた技術である。いわば発展途上にあり、今後も一層の高性能化、低価格化、そしてそれに伴う一般化が進むことは確実である。従来は特定の分野に应用が限られていたが、今後はこれまでは思いもかけなかった分野、用途への応用が、いくつも考案されていくものと思われる。本論文で示した、“膨大な分光情報をベースにシンプルで実用的な計測システムを具現化する”というアプローチは、波長帯を問わず、分光画像計測手法が有効なあらゆる応用分野への適用が可能である。本論文の成果が、これまでの研究用途から実用技術への橋渡しとなり、応用用途の拡大や、計測技術の更なる高度化、一般化を進め、今後の計測技術の発展に直接的・間接的に貢献できることを願う。



## 参考文献

- [1] 河村：“錐体オプシン遺伝子と色覚の進化多様性：魚類と霊長類に注目して”，比較生理生化学, **26**, 3, pp. 110–116 (2009).
- [2] 杉田：“鳥類の視覚受容機構”，バイオメカニズム学会誌, **31**, 3, pp. 143–149 (2007).
- [3] Gat and N.: “Imaging spectroscopy using tunable filters: a review”, Proc. SPIE (Wavelet Applications VII), **4056**, pp. 50–64 (2000).
- [4] 日本色彩学会（編）：“新編 色彩科学ハンドブック”，東京大学出版会, 初版 (1982).
- [5] D. A. Burns and E. W. Ciurczak Eds.: “Handbook of near-infrared analysis Third Edition”, Vol. 35 of Practical Spectroscopy series, CRC Press, 3rd edition (2007).
- [6] I. Newton: “New theory about light and colors”, Philosophical Transactions of the Royal Society, **80**, pp. 3075–3087 (1671/72).
- [7] J. A. Lohne: “Experimentum crucis”, Notes and Records of the Royal Society of London, **23**, 2, pp. 169–199 (1968).
- [8] 河田 聡（編）：“近赤外分光法”，日本分光学会 測定法シリーズ, 第 32 巻, 学会出版センター (1996).
- [9] W. Herschel: “Investigation of the power of the prismatic colours to heat and illuminate objects”, Philosophical Transactions of the Royal Society of London, **90**, pp. 255–283 (1800).
- [10] Abney, C., Festing and L.C.: “On the influence of the atomic grouping in the molecules of organic bodies on their absorption in the infra-red region of the spectrum”, Philosophical Transactions of the Royal Society of London, **172**, pp. 887–918 (1881).
- [11] B. Schrader Ed.: “Infrared and Raman Spectroscopy”, John Wiley & Sons (2008).
- [12] W. Kaye: “Near-infrared spectroscopy: I. spectral identification and analytical applications”, Spectrochimica Acta, **6**, pp. 257–287 (1954).
- [13] W. Kaye: “Near-infrared spectroscopy: Ii. instrumentation and technique a review”, Spectrochimica Acta, **7**, pp. 181–204 (1955).
- [14] R. F. Goddu: “Near-infrared spectrophotometry”, Adv. Anal. Chem. Inst., **1**, pp. 347–

- 425 (1960).
- [15] K. B. Whetsel, W. E. Robertson and M. Krell: “Near-infrared spectra of primary aromatic amines”, *Anal. Chem.*, **30**, 10, pp. 1598–1604 (1958).
- [16] F. E. Fowle: “The spectroscopic determination of aqueous vapor”, *Astrophys. J.*, **35**, pp. 149–162 (1912).
- [17] J. W. Ellis and J. Bath: “Modifications in the near infra-red absorption spectra of protein and of light and heavy water molecules when water is bound to gelatin”, *J. Chem. Phys.*, **6**, 11, p. 723 (1938).
- [18] I. Barr and W. Harp: “Minutes of the meeting of the new england section held at wellesley, massachusetts, april 3, 1943”, *Phys. Rev.*, **63**, 11-12, pp. 457–458 (1943).
- [19] 岩本, 河野, 魚住: “近赤外分光法入門”, 幸書房, 初版 (1994).
- [20] 三宅 (編): “分光画像処理入門”, 東京大学出版社 (2006).
- [21] 河野 (編): “食品の非破壊計測ハンドブック”, 株式会社 サイエンスフォーラム (2003).
- [22] 野田直広, 浅野貴正, 北出雄二郎: “微生物の迅速検査技術”, *富士時報*, **77**, 2, pp. 124–127 (2004).
- [23] 牧: “光合成細菌 (主として *rhodobacter capsulatus*) の農業, 畜産, 環境, 水産への応用”, *生物工学会誌*, **89**, 3, pp. 113–116 (2011).
- [24] 佐々木, 森川, 竹野: “光合成細菌成分による放射性核種の除去と海水の浄化”, *生物工学会誌*, **89**, 3, pp. 110–112 (2011).
- [25] 三室: “光合成微生物の地球環境とその保全への応用”, *生物工学会誌*, **89**, 3, pp. 121–123 (2011).
- [26] 山下 仁平 (編): “光合成細菌”, 学会出版センター (1984).
- [27] M. Takahashi and S. ei Ichimura: “Vertical distribution and organic matter production of photosynthetic sulfur bacteria in japanese lakes”, *Limnology and Oceanography*, **13**, 4, pp. 644–655 (1968).
- [28] 三上, 石川: “春採湖の光合成細菌について”, *北海道環境科学研究センター所報 (短報)*, **25**, pp. 67–70 (1998).
- [29] 小林, 神野: “環境微生物からの光合成細菌の単離・同定およびその水素生成能の検討”, *日本大学生産工学部 学術講演会講演概要*, **39**, pp. 5–042 (2006).
- [30] B. Møller: “VideometerLab 2 Datasheet”, Videometer A/S, Denmark (2012).  
<http://videometerlab.videometer.com/Portals/0/Brochures/VideometerLab%202.pdf>.
- [31] 株式会社: “平成 23 年度第 1 回消費者動向調査” (2011).
- [32] 厚生労働省: “平成 23 年食中毒発生状況” (2012).
- [33] 農林漁業金融公庫: “食品の安全性に関する意向調査”, 消費者動向等に関する調査 (2001).



- [34] 酒井幸美, 守川伸一: “原子力発電所に対する安心感の構造-「安心」のイメージに関する調査をもとに-”, 原子力安全システム研究所 INSS JOURNAL, **10**, pp. 10–21 (2003).
- [35] 吉川肇子, 白戸智, 藤井聡, 竹村和久: “技術的安全と社会的安心”, 社会技術研究論文集, **1**, 0, pp. 1–8 (2003).
- [36] 加田良平: “食品の安全性を考える”, 財団法人放送大学教育振興会, 第 1st 版 (2004).
- [37] E. O. Puchkov: “Computer image analysis of microbial colonies”, Microbiology, **79**, 2, pp. 141–146 (2010).
- [38] 横田, 藤井: “好熱性好酸性菌 - *Alicyclobacillus* 属細菌-”, 建帛社, 第 1 版 (2004).
- [39] G. L. Pettipher, M. E. Osmundson and J. M. Murphy: “Methods for the detection and enumeration of *alicyclobacillus acidoterrestris* and investigation of growth and production of taint in fruit juice and fruit juice-containing drinks”, Lett. Appl. Microbiol., **24**, 3, pp. 185–189 (1997).
- [40] E. Komitopoulou, I. S. Boziaris, E. A. Davies, J. Delves-Broughton and M. R. Adams: “*Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices and its control by nisin”, Int. J. Food Sci. Technol., **34**, 1, pp. 81–85 (1999).
- [41] H. Matsubara, K. Goto, T. Matsumura, K. Mochida, M. Iwaki, M. Niwa and K. Yamasato: “*Alicyclobacillus acidiphilus* sp. nov., a novel thermo-acidophilic,  $\omega$ -alicyclic fatty acid-containing bacterium isolated from acidic beverages”, Int. J. Syst. Evol. Microbiol., **52**, 5, pp. 1681–1685 (2002).
- [42] K. Goto, K. Mochida, M. Asahara, M. Suzuki, H. Kasai and A. Yokota: “*Alicyclobacillus pomorum* sp. nov., a novel thermo-acidophilic, endospore-forming bacterium that does not possess  $\omega$ -alicyclic fatty acids, and emended description of the genus *alicyclobacillus*”, Int. J. Syst. Evol. Microbiol., **53**, 5, pp. 1537–1544 (2003).
- [43] M. B. Murray, J. B. Gurtler, J. H. Ryu, M. A. Harrison and L. R. Beuchat: “Evaluation of direct plating methods to enumerate *alicyclobacillus* in beverages”, Int. J. Food Microbiol., **115**, 1, pp. 59–69 (2007).
- [44] K. Goto, K. Mochida, Y. Kato, M. Asahara, R. Fujita, S. Y. An, H. Kasai and A. Yokota: “Proposal of six species of moderately thermophilic, acidophilic, endospore-forming bacteria: *Alicyclobacillus contaminans* sp. nov., *alicyclobacillus fastidiosus* sp. nov., *alicyclobacillus kakegawensis* sp. nov., *alicyclobacillus macrosporangiidus* sp. nov., *alicyclobacillus sacchari* sp. nov. and *alicyclobacillus shizuokensis* sp. nov.”, Int. J. Syst. Evol. Microbiol., **57**, 6, pp. 1276–1285 (2007).
- [45] W. H. Groenewald, P. A. Gouws and R. C. Witthuhn: “Isolation, identification and typification of *alicyclobacillus acidoterrestris* and *alicyclobacillus acidocaldarius* strains

- from orchard soil and the fruit processing environment in south africa”, *Food Microbiol.*, **26**, 1, pp. 71–76 (2009).
- [46] I. C. McKnight, M. N. U. Eiroa, A. S. Sant’Ana and P. Massaguer: “Alicyclobacillus acidoterrestris in pasteurized exotic brazilian fruit juices: Isolation, genotypic characterization and heat resistance”, *Food Microbiol.*, **27**, 8, pp. 1016–1022 (2010).
- [47] W. I. and C. R.: “Spoilage of fruit juices by alicyclobacillus acidoterrestris”, *Food Australia*, **52**, pp. 286–288 (2000).
- [48] N. Jensen and F. B. Whitfield: “Role of alicyclobacillus acidoterrestris in the development of a disinfectant taint in shelf-stable fruit juice”, *Letters in Applied Microbiology*, **36**, 1, pp. 9–14 (2003).
- [49] K. Yamazaki, H. Teduka and H. Shinano: “Isolation and identification of alicyclobacillus acidoterrestris from acidic beverages”, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **60**, 3, pp. 543–545 (1996).
- [50] B. Zierler, B. Siegmund and W. Pfannhauser: “Determination of off-flavour compounds in apple juice caused by microorganisms using headspace solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry”, *Anal. Chim. Acta*, **520**, 1–2, pp. 3–11 (2004).
- [51] D. Gocmen, A. Elston, T. Williams, M. Parish and R. L. Rouseff: “Identification of medicinal off-flavours generated by alicyclobacillus species in orange juice using gc-olfactometry and gc-ms”, *Lett. Appl. Microbiol.*, **40**, 3, pp. 172–177 (2005).
- [52] J. D. Wisotzkey, J. P. Jurtshuk, G. E. Fox, G. Deinhard and K. Poralla: “Comparative sequence analyses on the 16s rRNA (rdna) of bacillus acidocaldarius, bacillus acidoterrestris, and bacillus cycloheptanicus and proposal for creation of a new genus, alicyclobacillus gen. nov.”, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **42**, 2, pp. 263–269 (1992).
- [53] M. Walker and C. A. Phillips: “Alicyclobacillus acidoterrestris: an increasing threat to the fruit juice industry?”, *Int. J. Food Sci. Technol.*, **43**, 2, pp. 250–260 (2008).
- [54] M. Murakami, H. Tedzuka and K. Yamazaki: “Thermal resistance of alicyclobacillus acidoterrestris spores in different buffers and pH”, *Food Microbiol.*, **15**, 6, pp. 577–582 (1998).
- [55] F. V. M. Silva and P. Gibbs: “Alicyclobacillus acidoterrestris spores in fruit products and design of pasteurization processes”, *Trends Food Sci. Technol.*, **12**, 2, pp. 68–74 (2001).
- [56] S.-Y. Lee, G. I. Dancer, S. Sen Chang, M.-S. Rhee and D.-H. Kang: “Efficacy of chlorine dioxide gas against alicyclobacillus acidoterrestris spores on apple surfaces”, *International Journal of Food Microbiology*, **108**, pp. 364–368 (2006).
- [57] S.-Y. Lee, R. H. Dougherty and D.-H. Kang: “Inhibitory effects of high pressure and heat on alicyclobacillus acidoterrestris spores in apple juice”, *Applied and Environmen-*

- tal Microbiology, **68**, 8, pp. 4158–4161 (2002).
- [58] Cerny, G., Hennlich, W., Poralla and K.: “Spoilage of fruit juice by bacilli: isolation and characterization of the spoiling microorganisms].”, *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*, **179**, 3, p. 224 (1984).
- [59] K. Yamazaki, H. Teduka, N. Inoue and H. Shinano: “Specific primers for detection of *alicyclobacillus acidoterrestris* by rt-pcr”, *Appl. Microbiol.*, **23**, 5, pp. 350–354 (1996).
- [60] K. Yamazaki, T. Okubo, N. Inoue and H. Shinano: “Randomly amplified polymorphic dna (rapd) for rapid identification of the spoilage bacterium *alicyclobacillus acidoterrestris*”, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **61**, 6, pp. 1016–1018 (1997).
- [61] K. Goto, K. Mochida, M. Asahara, M. Suzuki and A. Yokota: “Application of the hypervariable region of the 16s rDNA sequence as an index for the rapid identification of species in the genus *alicyclobacillus*”, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **48**, 5, pp. 243–250 (2002).
- [62] H. Luo, A. E. Yousef and H. H. Wang: “A real-time polymerase chain reaction-based method for rapid and specific detection of spoilage *alicyclobacillus* spp. in apple juice”, *Lett. Appl. Microbiol.*, **39**, 4, pp. 376–382 (2004).
- [63] M. Funes-Huacca, L. C. A. Regitano, O. Mueller and E. Carrilho: “Semiquantitative determination of *alicyclobacillus acidoterrestris* in orange juice by reverse-transcriptase polymerase chain reaction and capillary electrophoresis - laser induced fluorescence using microchip technology”, *Electrophoresis*, **25**, 21–22, pp. 3860–3864 (2004).
- [64] G. W. L. Moal, P. Leray, A.-C. Roudot, D. Thouvenot and V. Vasseur: “Bacteria colony identification using video imaging”, *J. Rapid Methods Autom. Microbiol.*, **6**, 2, pp. 143–156 (1998).
- [65] K. Miyazawa, K. Kobayashi, S. Nakauchi and A. Hiraishi: “In situ detection and identification of microorganisms at single-colony resolution by spectral imaging”, *Opt. Rev.*, **15**, 6, pp. 285–291 (2008).
- [66] N. Noda, T. Asano and Y. Kitaide: “Rapid inspection technology for microorganisms”, *Fuji Electric Journal*, **77**, 2, pp. 124–127 (2004).
- [67] M. Takeshige, S. Nasu, M. Sasaki, M. Takeda, A. Kanomata and H. Ogawa: “Methodology for enumerating viable bacteria based on consecutive observation of microbial growth”, *Transactions of SICE*, **39**, 6, pp. 521–527 (2003).
- [68] G. Popescu, T. Ikeda, C. A. Best, K. Badizadegan, R. R. Dasari and M. S. Feld: “Erythrocyte structure and dynamics quantified by hilbert phase microscopy”, *Journal of Biomedical Optics*, **10**, 6, p. 060503 (2005).
- [69] N. Lue, W. Choi, G. Popescu, T. Ikeda, R. R. Dasari, K. Badizadegan and M. S. Feld:

- “Quantitative phase imaging of live cells using fast fourier phase microscopy”, *Applied Optics*, **46**, 10, pp. 1836–1842 (2007).
- [70] M. Mir, Z. Wang, Z. Shen, M. Bednarz, R. Bashir, I. Golding, S. G. Prasanth and G. Popescu: “Optical measurement of cycle-dependent cell growth”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **108**, 32, pp. 13124–13129 (2011).
- [71] 黒木, 瀬野, 西村: “細胞培養技術”, 新生化学実験講座, 第 18 巻, 東京化学同人, 第 1st 版 (1990).
- [72] 丹羽, 澤口: “耐熱性好酸性菌の検出用選択培地およびその検出法” (1994).
- [73] J. W. T. Wimpenny: “The growth and form of bacterial colonies”, *J. Gen. Microbiol.*, **114**, 2, pp. 483–486 (1979).
- [74] 独立行政法人 (編): “食肉の官能評価ガイドライン”, 財団法人放送大学教育振興会日本食肉消費総合センター (2005).
- [75] 公益社団法人: “牛枝肉取引規格の概要” (2011).
- [76] S. Wold, M. Sj ostr om and L. Eriksson: “Pls-regression: a basic tool of chemometrics”, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, **58**, 2 (2001).
- [77] C. G. G. . C. KG: “Automatic extraction systems SOXTHERM”.
- [78] 齋藤, 奥村, 曾和, 佐久間, 山田: “食肉の理化学分析及び官能評価マニュアル”, 技術マニュアル, 第 21 巻, 独立行政法人 家畜改良センター (2010).
- [79] J. Folch, M. Lees and G. H. S. Stanley: “A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues”, *Journal of biological chemistry*, **226**, pp. 497–509 (1957).
- [80] Labsphere: “Technical Guide: Reflectance Materials and Coatings”, PO Box 70 231 Shaker Street North Sutton, NH 03260 USA (2010).
- [81] D. Cozzolino and I. Murray: “Identification of animal meat muscles by visible and near infrared reflectance spectroscopy”, *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, **37**, 4 (2004).
- [82] P. Williams and D. Sobering: “Comparison of commercial near infrared transmittance and reflectance instruments for analysis of whole grains and seeds”, *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, **1**, 1 (1993).
- [83] W. R. Windham and W. Morrison: “Prediction of fatty acid content in beef neck lean by near infrared reflectance analysis”, *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, **6**, 1 (1998).
- [84] M. Pla, P. Hernández, B. A. noa, J. Ramírezb and I. Díaz: “Prediction of fatty acid content in rabbit meat and discrimination between conventional and organic production systems by nirs methodology”, *Food Chemistry*, **100**, 1 (2007).

## 謝辞

本研究は、先生方、先輩方をはじめとする、研究室内外の多くの方々のご指導とご協力を受けて進めることが出来ました。

本研究を進めるにあたり、研究の心構えから、発表資料作成の心得、論文のまとめ方に至るまで、大変多忙な中、多くの時間を割き様々なご指導、ご助言を頂いた豊橋技術科学大学 情報・知能工学系 中内茂樹 教授に心から感謝致します。

本研究で試料として用いた菌体を提供していただくと共に、微生物に関して基本からご指導頂き、専門の立場からの貴重なご助言を頂いた豊橋技術科学大学 環境・生命工学系 生物機能工学研究室 平石明 教授、並びにご協力頂いた同研究室の山田剛史 助教、松本周平氏、橋本博明氏、石田貴寛氏、藤井康行氏に、また、当時同研究室在籍されていた、大久保陽子 博士 (現・豊橋技術科学大学 建築・都市システム学系 特任助教) に、厚く御礼申し上げます。

三重県畜産研究所の森昌昭氏、並びに故・松井靖典 博士には、膨大な数の牛肉サンプルの作成、およびその理化学分析を行なって頂くなど、お忙しい中多大なご協力を頂きました。両氏に心より感謝申し上げますと共に、松井氏にはご冥福をお祈り致します。また、共に実験や研究を行った、前淵陽祐氏に感謝致します。

LED を用いた菌検出装置の試作機は、有限会社フィットと共同で開発しました。遠方から何度も足を運んで頂いた、同社の長岡暢 代表取締役社長、野口正生氏、八色伸一氏、柳沢房子氏に深く感謝致します。

近赤外カメラを用いたフィルタリング計測装置は、住友電気工業株式会社との共同で開発しました。数多くの打ち合わせや、装置の様々な改良等への対応をして頂いた、同社の新領域技術研究所 小林勇仁氏に感謝致します。

本論文に関わる研究の一部は、文部科学省のグローバル COE プログラム「インテリジェントセンシングのフロンティア」及び「地域イノベーション戦略支援プログラム (地域イノベーションクラスタープログラム、知的クラスター創成事業)」、及び愛知県の『『知の拠点』重点研究プロジェクト』の支援により、円滑にすすめることができました。

日頃から研究のサポートだけでなく、研究室での生活においても大変お世話になった河

合由紀氏、学部生時代より、装置の使い方や実験環境構築の心得を始め、基本的なことから高度な内容まで幅広く、的確なご助言を頂いた、豊田敏裕 博士 (現・静岡県工業技術研究所 機械科 研究員)、様々な相談にも乗って頂いた、荒木佳苗 博士 (旧姓:宮澤、現・伊藤光学工業株式会社 技術部) に深く感謝申し上げます。学部から修士、そして2年をあけて博士後期課程と、研究室で過ごした7年間は長く、研究室名も「生体・神経情報工学研究室」から「視覚認知情報学研究室」へと変わるなど、いろいろな変化もありましたが、その間に数多くの方々と関わる事が出来ました。研究室の諸先輩方、並びに同輩、後輩の諸氏には、様々な面で、常時惜しみないご支援、ご協力を頂き、心より感謝致します。

本論文は、上述の方々を始め、数多くの方々からの貴重なご意見や、様々な討論・議論を重ねることで、こうしてまとめることが出来たことをここに記し、感謝致します。

最後に、私を産み、育て、義務教育後も高専-大学-大学院と、13年間にわたり勉学の機会を与え、生活を始めあらゆる面で多大な支援をして下さった両親と、博士後期課程への再入学を快諾し、不規則な研究生生活を精神的にも、経済的にも献身的に支えてくれた妻・朋子に、心より感謝の意を表したいと思います。

## 研究業績目録

### 学術論文

- Kanae Miyazawa, Ken-ichi Kobayashi, Shigeki Nakauchi and Akira Hiraishi, “In situ detection and identification of microorganisms at single colony resolution by spectral imaging”, Optical Review, Vol. 15, No. 6, pp. 285-291, 2008. (2008/11)
- Ken-ichi Kobayashi, Yasunori Matsui, Yosuke Maebuchi, Toshihiro Toyota and Shigeki Nakauchi, “Near infrared spectroscopy and hyperspectral imaging for prediction and visualisation of fat and fatty acid content in intact raw beef cuts”, Journal of Near Infrared Spectroscopy, Volume 18, Issue 5, pp. 301-315, 2010. (2010/11)
- Ken-ichi Kobayashi, Masaaki Mori, Ken Nishino, Toshihiro Toyota and Shigeki Nakauchi, “Visualisation of fat and fatty acid distribution in beef using a set of filters based on near-infrared spectroscopy”, Journal of Near Infrared Spectroscopy, Volume 20, Issue 5, pp. 509-519, 2012. (2012/9)
- Ken-ichi Kobayashi, Takeshi Yamada, Akira Hiraishi and Shigeki Nakauchi, “Real-time optical monitoring of microbial growth using optimal combination of light-emitting diodes”, Optical Engineering, Volume 51, Issue 12, pp. 123201(1-8), 2012. (2012/12)

### 国際会議論文

- Kanae Miyazawa, Ken-ichi Kobayashi, Shigeki Nakauchi and Akira Hiraishi, “In Situ Detection and Identification of Microorganisms at Single Colony Resolution Using Spectral Imaging Technique”, proceedings of the 14th Scandinavian Conference on Image Analysis (SCIA 2005; Joensuu, Finland), Lecture Notes in Computer Science 3540, pp. 419-428, Jun. 19-22, 2005. (2005/6)
- Ken-ichi Kobayashi, Yasunori Matsui and Shigeki Nakauchi, “Hyperspectral imag-

- ing for quality evaluation of food”, Proceedings of the International Symposium on Electronics-Inspired Interdisciplinary Research (EIIRIS 2010; Toyohashi, Japan), p. 77 (P-20), Nov. 16, 2010. (2010/11)
- Ken-ichi Kobayashi, Yasunori Matsui, Yosuke Maebuchi, Ken Nishino, Toshihiro Toyota and Shigeki Nakauchi, “Prediction and Visualization of Fat and Fatty Acid Content of Beef using Near-infrared Multispectral Imaging”, 5th European Conference on Colour in Graphics, Imaging, and Vision (CGIV2010; Joensuu, Finland) Proceedings, pp. 359-365, Jun. 14-17, 2010. (2010/6)
  - Ken-ichi Kobayashi, Ken Nishino, Bjørn Skovlund Dissing, Masaaki Mori, Toshihiro Toyota and Shigeki Nakauchi, “Design of characteristics of optical filter set for prediction and visualization of fat content in raw beef cuts”, Scandinavian Workshop on Imaging Food Quality (SWIFQ 2011; Ystad, Sweden), pp. 23-28, May 27, 2011. (2011/5)
  - Ken-ichi Kobayashi, Masaaki Mori and Shigeki Nakauchi, “Visualization of fat and fatty acid content in raw beef using a small set of optical filters based on NIR spectroscopy”, The Asia-Pacific Interdisciplinary Research Conference 2011 (AP-IRC 2011; Toyohashi, Japan), p. 119 (18PP-17), Nov. 17-18, 2011. (2011/11)
  - Martin Georg Ljungqvist, Bjarne Kjaer Ersbøll, Ken-ichi Kobayashi, Shigeki Nakauchi, Stina Frosch and Michael Engelbrecht Nielsen, “Near-infrared hyperspectral image analysis of astaxanthin concentration in fish feed coating”, Proceedings of the IEEE International Conference on Imaging Systems and Techniques (IST2012; Manchester, United Kingdom), pp. 136-141, Jul.16-17, 2012. (2012/7)
  - Ken-ichi Kobayashi, Masaaki Mori and Shigeki Nakauchi, “Visualisation for quality evaluation of food based on NIR spectroscopy”, The Asia-Pacific Interdisciplinary Research Conference 2012 (AP-IRC 2012; Tahara, Japan), p. 68 (15P-41), Nov. 15-16, 2012. (2012/11)

## 国内学会発表

- 宮澤佳苗, 小林健一, 中内茂樹, “分光画像計測による微生物の検出と識別”, 第 52 回応用物理学関係連合講演会講演予稿集, 30p-YS-9/III, Mar. 29-Apr. 1, 2005. (2005/3)
- 蔦瑞樹, 小林健一, 杉山純一, 中内茂樹, 相良泰行, “励起蛍光マトリックスイメージングによる残留農薬検知法の検討”, 日本食品科学工学会第 52 回大会講演要旨集, p. 135, Aug. 29-31, 2005. (2005/8)



- 小林健一, 宮澤佳苗, 中内茂樹, 平石明, “スペクトルイメージングによるコロニーレベルでの微生物検出と識別”, 平成 17 年度電気関係学会東海支部連合大会講演予稿集, O-381, Sep. 15-16, 2005. (2005/9)
- 小林 健一, 松井 靖典, 前淵 陽祐, 豊田 敏裕, 中内 茂樹, “近赤外分光画像を用いた牛肉中の脂肪酸含量分布の可視化”, Optics & Photonics Japan (OPJ 2010), 講演番号: 9pG13, pp. 364-365, Nov. 8-10, 2010. (2010/11)

## シンポジウム／その他外部発表

- 小林 健一, “分光画像計測を用いた食品の品質評価”, Application and Deepening of Intelligent Sensing Technology (ADIST2009; Toyohashi, Japan) (第 2 回センシングアーキテクトシンポジウム), C-7, Sep. 4, 2009. (2009/9)
- 前淵陽祐, 小林健一, 豊田敏裕, 中内茂樹, “分光画像法に基づく牛肉の非破壊品質評価手法の確立”, 電気関係学会若手セミナー 超臨場感通信のためのマルチメディア情報通信と信号処理 第 2 回 (名古屋大学), No. 3, Dec. 21, 2009. (2009/12)
- 小林 健一, 松井靖典, 中内茂樹, “分光画像計測を用いた食品の品質評価”, Application and Deepening of Intelligent Sensing Technology (ADIST 2010; Nagoya, Japan) (第 3 回センシングアーキテクトシンポジウム), p. 56 (B-5), Oct. 21, 2010. (2010/10)
- 小林 健一, 森 昌昭, 中内 茂樹, “近赤外分光計測に基づき設計した光学フィルタによる牛肉の脂肪分・脂肪酸含量の空間分布可視化”, Application and Deepening of Intelligent Sensing Technology (ADIST 2011; Toyohashi, Japan) (第 4 回センシングアーキテクトシンポジウム), p. 37 (B-4), Oct. 14, 2011. (2011/10)
- 小林 健一, 中内 茂樹, “近赤外波長帯の画像計測に基づく食品成分の分布可視化”, GCOE シンポジウム東京 2012 「グローバルリーダーを目指した “センシングアーキテクト” の育成」 (FIS2012; 学術総合センター (東京都千代田区), Japan), A-17, Mar. 6, 2012. (2012/3)

## 受賞・表彰等

- 「優秀特別研究発表賞」, 豊橋技術科学大学大学院 工学研究科 情報工学系 (修士研究発表について). (2007/2)
- 社団法人応用物理学会分科会 日本光学会 第 6 回 OPJ ベストプレゼンテーション賞 (“近赤外分光画像を用いた牛肉中の脂肪酸含量分布の可視化” の発表について). (2010/11)