

食品・農産物の有害菌・機能の計測技術のマニュアル (平成21年度)

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

産業技術総合研究所 九州センター 犬養吉成

産業技術総合研究所 生産計測技術研究センター 松田直樹、綾戸照美

福岡県工業技術センター 生物食品研究所 塚谷忠之、末永 光

長崎県工業技術センター 兵頭竜二、下村義昭

宮崎県工業技術センター 小田 誠、肥後一彦

目次

1. 全体の背景、目的、概要及び目標	2
2. スラブ光導波路分光分析法を用いる有害菌の迅速検出法のマニュアル（平成21年度） ...	3
2.1. はじめに	3
2.2. 測定方法	3
2.3. SOWG 分光法の測定	7
2.4. 大腸菌検査方法	10
2.5. おわりに	12
3. 水溶性テトラゾリウム塩を用いた微生物簡易検出法のマニュアル（平成21年度）	14
3.1. はじめに	14
3.2. 検出試薬	14
3.3. 薬剤感受性試験	14
3.4. 抗菌性物質のスクリーニング	18
3.5. 水溶性ビタミン類の微生物定量	23
3.6. おわりに	27
4. 光を用いた非破壊計測方式による水分ストレス計および糖度計のマニュアル（平成21年度）	29
4.1. 植物にかかる水分ストレスの非破壊計測技法	29
4.2. 新方式の非破壊計測技術「TFDRS 法」と携帯型糖度計	38
5. ミリ波による非破壊型糖度計等のマニュアル（平成21年度）	44
5.1. はじめに	44
5.2. パッシブ方式非破壊型糖度計	44
5.3. アクティブ方式ミリ波計測装置	55
5.4. おわりに	64

1. 全体の背景、目的、概要及び目標

産業技術総合研究所 九州センター

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

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

2年計画の最終年度である21年度では、各方法のマニュアルを完成させた。地域イノベーション創出共同体形成事業により形成されるネットワークを生かして、このマニュアルを利用することにより、企業・農業・流通関係者ニーズの効率的な解決を目指す第一歩としたい。

2. スラブ光導波路分光分析法を用いる有害菌の迅速検出法のマニュアル（平成21年度）

産業技術総合研究所 生産計測技術研究センター

2.1. はじめに

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

従来から用いられている大腸菌等の検査方法の概要は以下のとおりである。例えば飲料中に大腸菌が存在すれば時間とともにその菌体数が増加するのに伴い、排出される二酸化炭素も増加する。二酸化炭素増加に伴うpH変化を、pH指示薬の色変化で観察し、大腸菌が存在するかどうかを判定する。ただし、この判定方法は対象に依存するが、12～24時間程度必要とする点が問題である。というのは現在、生産されてからコンビニエンスストアの店頭に並び、消費者が購入するまでの時間はそれよりも短い可能性があるためだ。

我々は産総研の持つ計測技術シーズのスラブ光導波路（slab optical waveguide：以下、SOWGと略す。）分光法を適用して、製造現場からの最もニーズの大きい大腸菌などの有害菌の迅速・高効率な検出方法の確立を図ってきた。大腸菌の検出は、大腸菌に含まれる酵素であるβ-グルクロニダーゼの活性を利用し、SOWG分光法を用いた酵素活性測定法によって行う。酵素は代表的な生体物質の一つであり、酸化還元や物質変換等の独自の機能を有している。従来からこれらの機能を利用したセンサーやバイオエレクトロニクス等の研究開発は広く行われており、デバイスにも組み込まれ、利用されている。これらのデバイスにおいて、通常は酵素を界面に固定化して用いられており、酵素のような複雑な分子では構造と機能が密接に関連していると考えられている。その際、界面に吸着・固定化されると立体構造が変化して配向制御が行えない等の理由で、本来持っている機能が発現しない場合も多いため、デバイス開発の妨げになっている。

本マニュアルでは、SOWG分光法を用いた酵素活性測定法を確立し、SOWG分光法の測定方法、SOWG分光法を用いる酵素活性測定、及びβ-グルクロニダーゼの活性を利用して吸収スペクトルの変化から大腸菌を検出する方法の、基本原理、測定手順、実施例等をまとめた。

2.2. 測定方法

2.2.1. スラブ光導波路分光法

本マニュアルで主に用いる分析方法であるSOWG分光法は産総研オリジナルである。製造および販売を行っている企業はあるが、日本国内に限った場合でも広く知られている方法ではないので、SOWG分光法に関して概要を説明する。

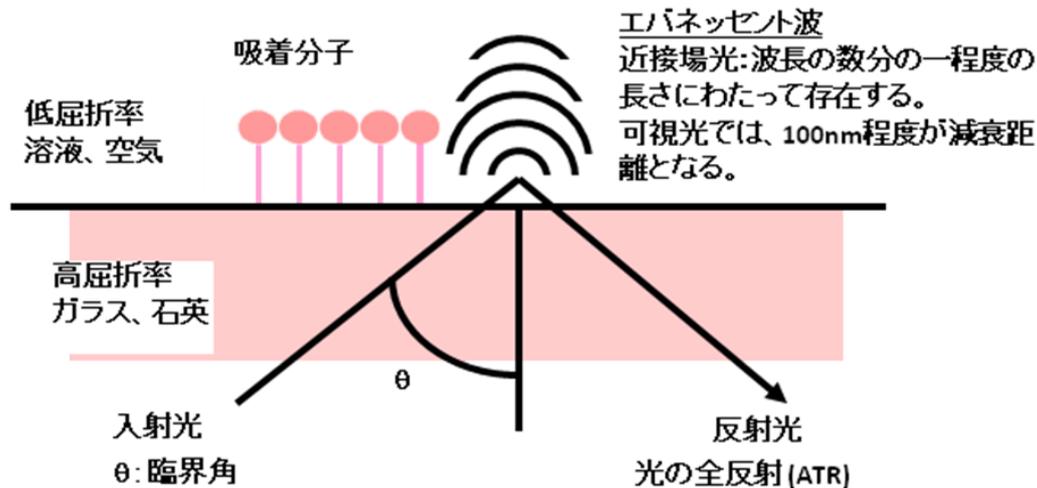


図1 エバネッセント波の概念図

我々が開発した SOWG 分光法は紫外-可視の広い波長範囲の（白色）光を同時に伝播させる事が可能で、界面に極微量だけ吸着した物質の吸収スペクトルのその場測定に適している¹⁻²⁶⁾。そもそも SOWG とは平板型の光導波路のことで、高屈折率（コア）と低屈折率（クラッド）の薄膜を組み合わせ構成され、屈折率が異なる二つの相、例えば溶液（低屈折率）とガラス（SOWG、高屈折率）、からなる界面で生じる光の全反射を利用して光を伝播させている。光が全反射する際に界面にエバネッセント波と呼ばれる電場（近接場）が発生する。図1にエバネッセント波発生概念図を示す。情報・通信では遠方まで光透過性を保障するためコアを万遍なくクラッドで覆った光ファイバーを用いているが、SOWG ではエバネッセント波と界面近傍の分子の相互作用によって生じる光吸収や蛍光発光を計測に利用するため、少なくとも試料と接する部分はコアを剥き出しにする必要がある。SOWG では光の多重反射を利用しているため、高感度である。SOWG は比較的古くから分析化学・表面分析に取り入れられてきたが、光の屈折や反射を利用する測定法であるため、従来はレーザーの単一波長の光を用い、その光強度が増加あるいは減少することを利用して表面・界面上あるいはその近傍で起きている現象を検討してきた²⁷⁾。

1993年に、我々等は光ファイバーとカップリングプリズムの間にレンズを配置し、異なる波長の光が異なる角度でカップリングすることを利用して SOWG 内に白色光を導入することに成功した¹⁾。このため、SOWG 表面に単分子層程度の量で吸着した物質の紫外-可視領域の吸収スペクトルのその場測定を行うことが可能になった。また、ほぼ同時期にアリゾナ大学の S. S. Saavedra 等は SOWG 上に回折格子を成形し白色光を導入することに成功した^{28, 29)}。我々の測定方法の方が回折格子型に比べて非常に広い波長範囲の光を同時にカップリングできる。単波長、あるいは白色光いずれの場合も従来の SOWG を用いた研究では高感度化を実現するため、あるいは物理化学的に吸着構造・分子配向を検討するため、例えばイオン交換で表面から極近い層の屈折率だけ変化したシングルモードの SOWG が主に用いられてきた。しかし近年は徐々に吸収スペクトル測定を行う例も発表されている³⁰⁻³²⁾。また、大野等はエバネッセント波が届く 100nm 程度の距離まで金属電極を接近させ、金属電極上に吸着した物質の吸収スペクトルをその場測定できる“非接触型 SOWG 分光法”を開発した^{33, 34)}。

その後、2001年に我々は SOWG 上に垂らしたグリセリン滴に入射用の光ファイバーを直接挿入し、白色光を SOWG 内に導入する方法を開発した⁷⁾。この方法では数十 μm 程度の厚みを持つ薄板状のガラスや石英をそのまま SOWG として用いることができる。そのため、SOWG が安価で、イオン交換したものに比べると SOWG 毎の性能の差が小さく、光透過が容易なため、実験が簡単で、長時間に渡ってドリフトが小さい、等の長所がある。更に、得られたデータの再現性が向上し、高感度化が達成されたため、1ミリ秒程度の時間分解吸収スペクトル測定を行うことが可能になった。

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

エバネッセント波は界面からの減衰距離が波長の数分の一程度と考えられており、可視光を用いている場合は 100nm 程度と考えられるため、SOWG 分光法は界面近傍に特異的で表面選択性の高い測定方法と言える。ただ表面プラズモンや局在プラズモンを用いる表面プラズモン共鳴法や表面増強ラマン散乱法では界面からの減衰距離が数 \sim 10nm 程度とエバネッセント波より小さいため、より表面選択制が高い。

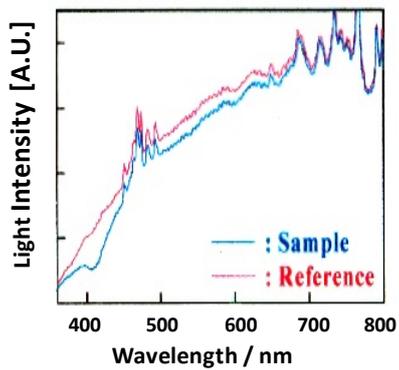
また、SOWG 分光法は多重反射を用いているため高感度である。反射回数も SOWG の厚み、屈折率比、入射角度等に依存するが、10mm 当たり数百回程度の反射を繰り返す。このため SOWG 分光法は通常の透過法による吸収スペクトル測定に比べて数百倍程度高感度である。表面プラズモン共鳴法や表面増強ラマン散乱法では $10^6\sim 8$ 程度増強されることもあるため、これらの測定法の方が SOWG 分光法に比べて原理的により高感度である。しかし、SOWG 分光法ではガラスや高分子で構成されている界面で用いることが可能であるため、その用途はより広い。

2.2.2. 測定装置

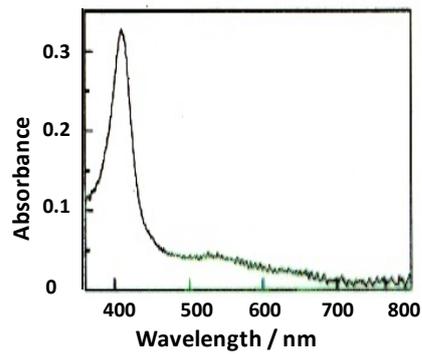
SOWG 分光法では、図2の左側の図に Reference と Sample を示した様に、二回、光透過スペクトルを測定する。それぞれ試料が SOWG 上に載っている場合と載っていない場合の測定結果である。透過光強度がそれぞれ I_0 と I であり、波長毎に以下に示す Lambert-Beer の式に代入し、吸光度 A を得る。

$$A = \log(I_0/I) \quad \dots (1)$$

図2の右側にその模式図を示す。実際には、例えば、色素の吸収スペクトルを測定する場合には、最初に色素が含まれない溶媒のみの場合に Reference の光透過スペクトルを測定し、次に色素分子が含まれる試料溶液を用いて Sample の光透過スペクトルを測定する。ソフトウェア上でリアルタイムに吸収スペクトルをモニターで観察することが可能であり、吸着過程や吸着分子の酸化還元反応等をその場で観察することができる。



SOWGの透過光パターン



SOWG分光法による吸収スペクトル

図2 スラブ光導波路分光法を用いた吸収スペクトル観察の概念図

図3に SOWG 分光装置のセルの模式図を示す。以下に簡単に解説する。通常は 50mm×20mm で、厚みが 50 μ m のガラスあるいは石英薄板を SOWG として用いている。これらの SOWG 表面は光学研磨が施されている。ガラスは1枚当たり 200 円程度と安価であるため、気楽に使用することが可能であるが、短波長側の光透過性があまり良くないため、紫外域の吸収スペクトル測定にはあまり適していない。石英は紫外域の光透過性が良いため、SOWG としては非常に重要な材料であるが、1枚当たり 6,000 円程度と高価であることが欠点である。

SOWG の上にグリセリン滴を置き、その中に光源ランプから光を導いてきた光ファイバーを直接挿入し、SOWG 内に光を導入する。この場合、薄板ガラス自体がコアになり、その周りの試料溶液や空気がクラッドになる。そのためコアとクラッドの屈折率の相対比が大きくなるのが本方式の特徴である。ITO (インジウムスズ酸化物) 電極は、50mm×20mm の片面に、20mm×20mm の大きさと 20nm の厚さで、真空蒸着法を用いて形成する。参照電極として Ag/AgCl、対極として Pt 線を用いた。

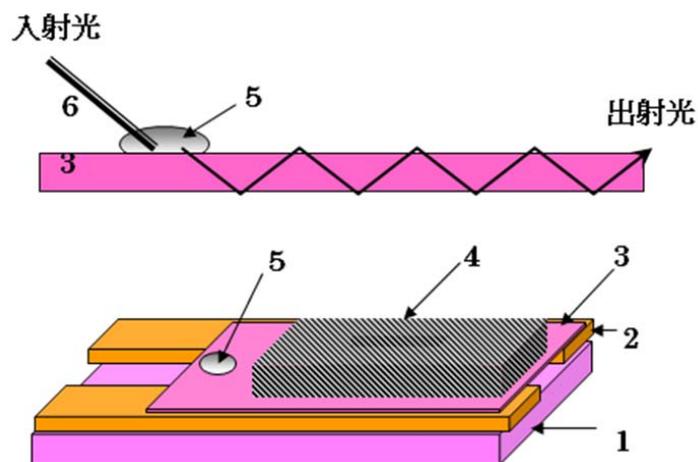


図3 スラブ光導波路分光装置のセル周り模式図

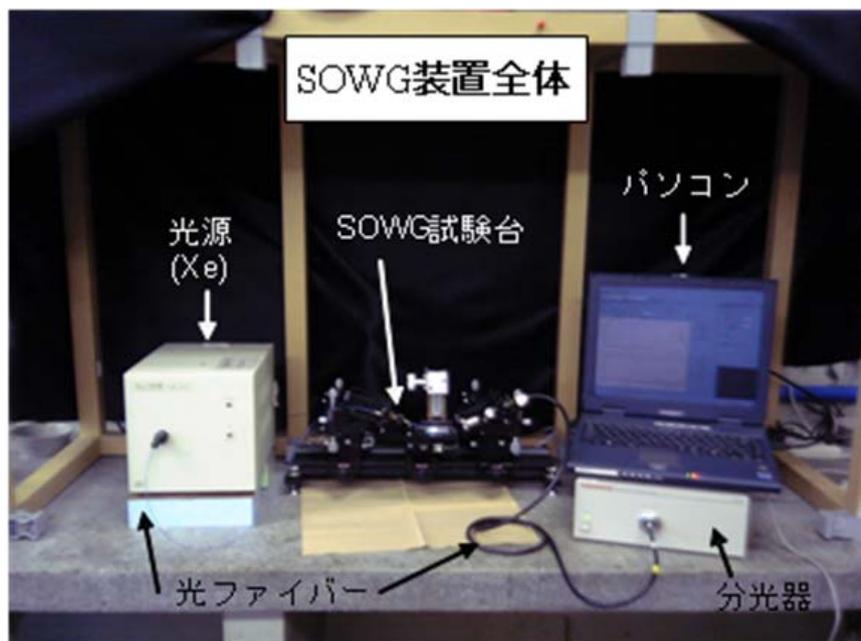


図4 スラブ光導波路分光装置の写真

更に、SOWG 上にシリコンラバー製で、例えばその内側の大きさが 10mm×10mm×5mm のセルを置き、試料溶液を入れる。我々の SOWG 分光装置は静置型であり、フロー型ではない。溶液を循環させると吸着と脱離の過程に拡散過程の他に層流や乱流といった溶液の移動過程が含まれ非常に複雑になるため、吸着過程を正確に観察するためには静置型の方がいいと判断したからである。したがって、溶液を入れ替える際はその時セル内に入っている溶液をマイクロピペット等で取り出して一旦セル内を空にし、その後、別な溶液を入れる。実際にはセル内に溶液が入った瞬間を正確に知ることは不可能なため、あらかじめ CCD の測定をスタートさせてから試料溶液をセル内に入れる。

SOWG は溶媒としてエタノール、アセトン、超純水をその順に用いて、超音波洗浄した。図4に実際の装置構成の写真を示した。装置は光源、光ファイバー、SOWG、光学ステージ、分光器付き CCD、パーソナルコンピュータ、ソフトウェアから構成されている。

SOWG 分光法の測定装置の構成は以下の通りである。光源はキセノン (Xe) ランプ (システムインストルメント社製)、検出器はモノクロメータ付き CCD (浜松フォトニクス社製: PMA-11) を使用した。装置の写真は図4に示したが、詳細は参考文献を参照されたい。電気化学計測はポテンショスタット (ALS/CHI Model1720C) を用いた。

2.3. SOWG 分光法の測定

2.3.1. 試料

酵素として用いたチトクローム *c* 等のタンパク質はシグマから購入し、精製せずに使用した。溶液として、pH が 7.2 のリン酸緩衝液を用いた。

2.3.2. 測定手順

1) 試料溶液の調整

対象とする酵素をリン酸緩衝液で希釈し適切な濃度、例えば 10 μ l 程度に調整する。また、通常の透過吸収分光装置を用いて試料である酵素の試料溶液の紫外可視域の吸収スペクトルを測定

し、参考文献の結果と比べて帰属を行っておく。

2) 電子移動反応に関わる酵素機能検査を行う場合

ITO-SOWG 上にセルを置き、参照電極と対極を配置する。作用電極は ITO 薄膜である。ポテンシオスタットのリード線を電極に接続する。セル内にリン酸緩衝溶液を入れ、SOWG のバックグラウンド用の透過スペクトルを測定する。

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

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

2.3.3. 実施例

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

1) 実験条件設定

パーソナルコンピュータを立ち上げてソフトウェアを起動させ、CCD 検出器の露光時間や積算回数等の実験条件を入力する。SOWG を装置にセットし、その上にセルを乗せ、Xe ランプの電源を入れて SOWG 内に光を導入し、しばらく待ってから SOWG 透過光のドリフトの有無を確認する。ドリフトが大きい場合はドリフトが収斂するまで待つか、あるいはもう一度 SOWG やセルをセットし直し、あらためてドリフトを測定する。チトクローム *c* を単分子層程度の量で固定化した場合、408nm 付近に現れるチトクローム *c* のソーレ帯の最終的な吸光度は概ね 0.1~0.2 程度であるため、ドリフトやノイズはこの 10% を目安にすると吸光度に換算した時に 0.01~0.02 程度以下にする必要がある。図 5 にソフトウェアの表示結果の一例を示す。

2) バックグラウンドの透過スペクトル測定

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

3) チトクローム *c* の吸収スペクトルのその場観察と固定化の確認

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

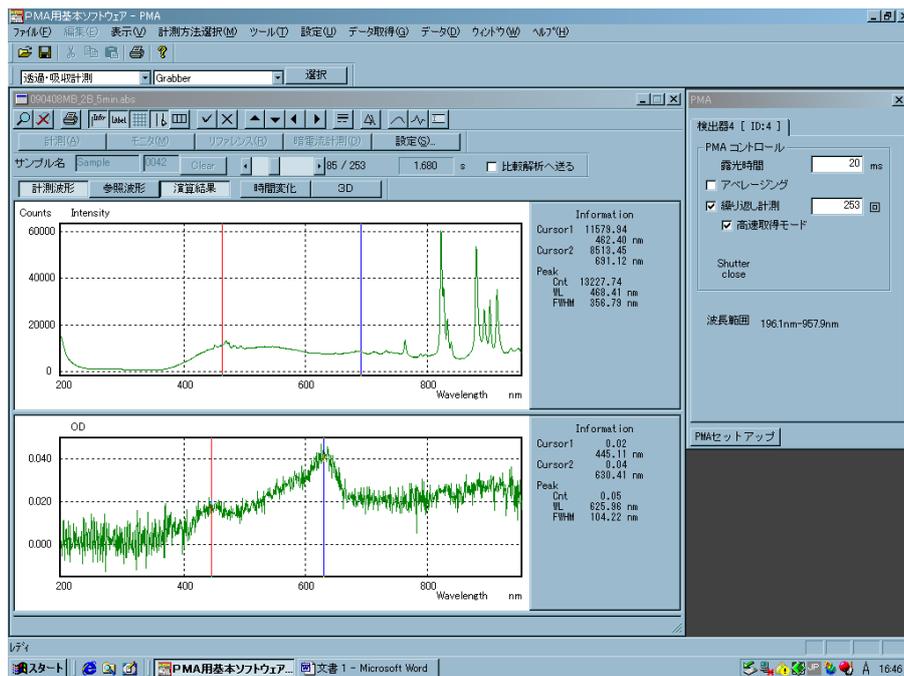


図5 スラブ光導波路分光装置のソフトウェアの表示例

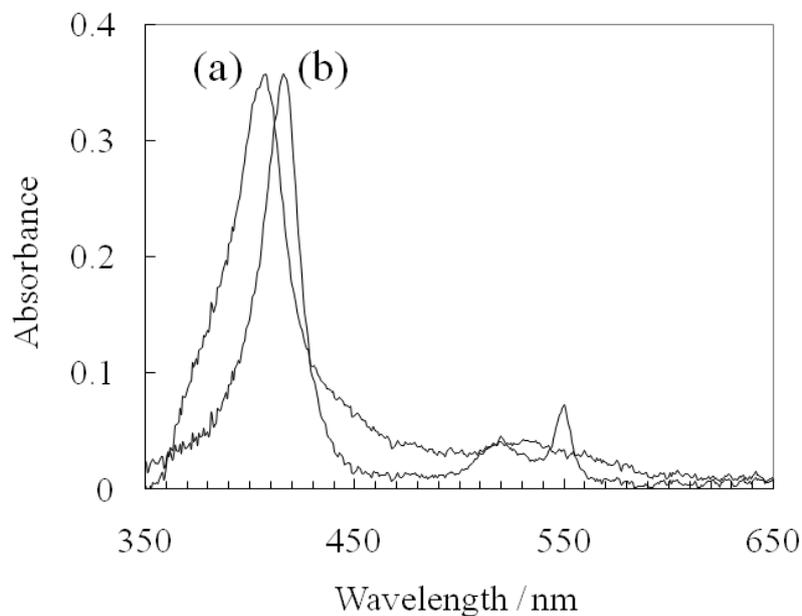


図6 スラブ光導波路分光法によるITO電極上に吸着したチトクローム *c* の吸収スペクトル測定、(a)ITO電極の電位が0.4 V vs Ag/AgCl で測定した結果、
(b)ITO電極の電位がV-0.3 V vs Ag/AgCl で測定した結果。

4) チトクローム *c* の吸収スペクトルの変化のその場観察

固定化を確認後、ITO電極の電位を例えば+0.5~-0.5 V vs Ag/AgCl の間で変化させ、50mV 毎にSOWGの透過スペクトルを測定し、チトクローム *c* の吸収スペクトルのピーク位置が酸化体と還

元体ではそれぞれ 408、413nm であるため、測定と同時にソフトウェア上に表示されるスペクトル変化から酸化体と還元体の生成を確認する。結果を図 6 に示す。

2.4. 大腸菌検査方法

2.4.1. 検査方法の概要

図 7 に検査方法の概念図を示す。大腸菌に含まれている β -グルクロニダーゼが発色酵素基質と呼ばれる 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-B-D-グルクロニドシクロヘキシルアンモニウム水和物 (X-Gluc) を化学反応によって無色から青色へ変化させる性質を利用する。 β -グルクロニダーゼを用いるこうした反応は、大腸菌等の検査方法として良く知られている。

従来の方法では発色によって生じる色の変化を主に目視で観察することで、大腸菌等の有害菌類が存在するかどうかを判定してきた。我々の手法は、発色による色変化を利用するところまでは一緒であるが、吸収スペクトル観察に SOWG 分光法を用えており固液界面に吸着した色素の吸収スペクトルを検知するため、結果として高感度で試料量が微量で済み、検出時間が短くなるという特徴がある。

2.4.2. 実施例

図 8 に測定例を示す。培養した大腸菌 (2.1×10^7 cell/ml) を含む溶液に X-Gluc を加え、そのまま SOWG 上にセットされたセル内に入れる。その際に測定された透過スペクトルが Reference スペクトルとなる。この状態では X-Gluc は発色していないため溶液は無色である。このままセル中で 37°C に保持しながら吸収スペクトルを測定したところ、徐々に吸収スペクトル変化が観察された。図 8 は 3 時間後の結果である。このように大腸菌が存在すれば、SOWG 分光法で迅速な検出が可能であることが示された。

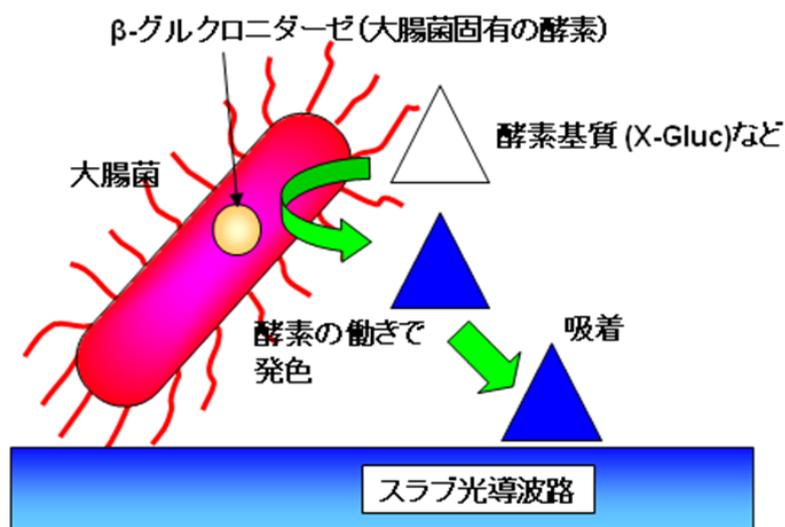


図 7 スラブ光導波路分光法による大腸菌の β -グルクロニダーゼ活性測定 の概念図

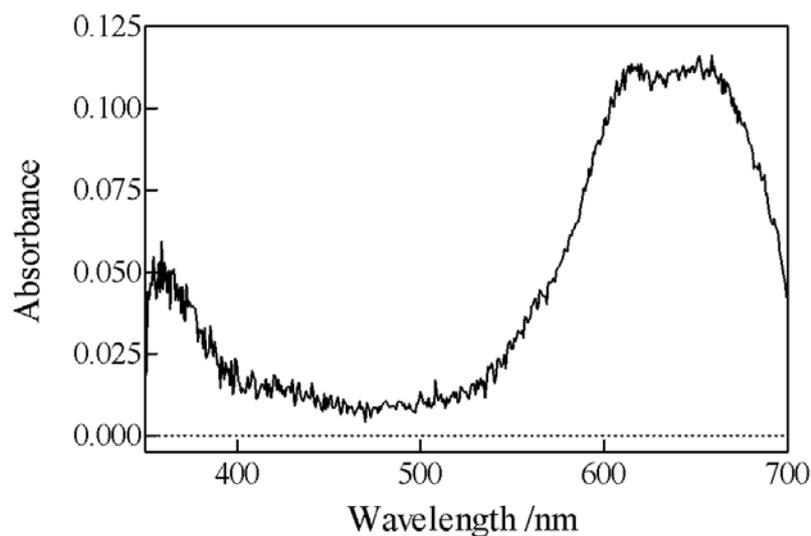


図8 スラブ光導波路分光法による X-Gluc の吸収スペクトル測定

β -グルクロニダーゼ活性をより高感度に検出するために、スラブ光導波路の表面修飾を行い、比較した。結果を図9に示す。スラブ光導波路の表面修飾は厚さ 50 μm のガラス製薄膜をスラブ光導波路として使い、純水とエタノールで洗浄、乾燥させた後、市販のシランカップリング剤の 1%トルエン溶液に含浸させて作製した。シランカップリング剤はオクタデシルトリクロロシラン (ODS)、オクチルトリクロロシラン (OTS)、アミノプロピルトリエトキシシラン (AP) の 3 種を用いた。 β -グルクロニダーゼ活性測定には市販の精製済み β -グルクロニダーゼを用いた。以下、未修飾のスラブ光導波路は Bare-SOWG、アミノプロピルトリエトキシシランで表面修飾したスラブ光導波路は AP-SOWG、オクチルトリクロロシランで表面修飾したスラブ光導波路は OTS-SOWG、オクタデシルトリクロロシランで表面修飾したスラブ光導波路は ODS-SOWG と表記する。

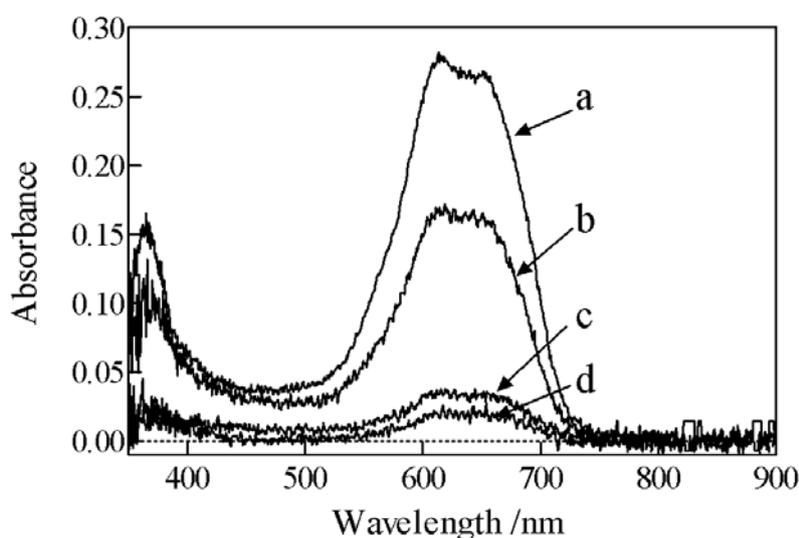


図9 吸収スペクトルの比較 (測定開始から 20 分後の吸収スペクトル)。

a; ODS-SOWG、b; OTS-SOWG、c; AP-SOWG、d; Bare-SOWG

接触角測定の結果を以下の表に示す。Bare-SOWG および AP-SOWG は接触角の値から親水性であることを確認した。OTS-SOWG、ODS-SOWG は接触角の値が Bare-SOWG と比較して大幅に増大した。このことから、OTS、ODS による表面修飾の結果、スラブ光導波路の表面が疎水性になったことが確認された。OTS-SOWG よりも ODS-SOWG の方が接触角の値が高いため、より疎水性が強いと考えられる。

表 表面修飾したスラブ光導波路の種類と接触角 (3 枚ずつ測定した平均値)

スラブ光導波路	接触角	特性
Bare-SOWG	26.56°	親水性
AP-SOWG	44.60°	親水性
OTS-SOWG	73.60°	疎水性
ODS-SOWG	108.64°	疎水性

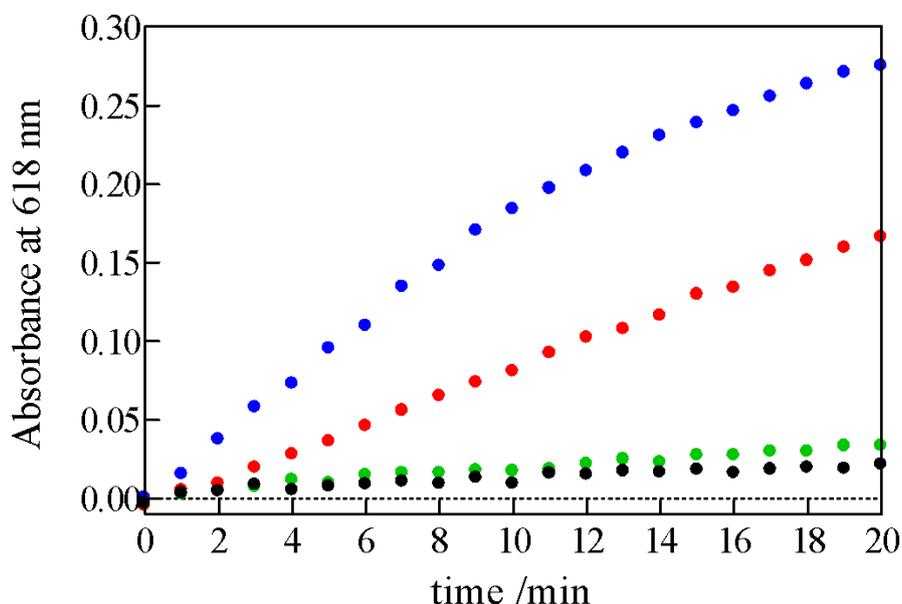


図 10 吸収スペクトルピーク値の経時変化。

●; ODS-SOWG、●; OTS-SOWG、●; AP-SOWG、●; Bare-SOWG

これらの表面修飾を施したスラブ光導波路の β -グルクロニダーゼ活性の感度を評価するために、 β -グルクロニダーゼと基質である X-gluc を混合した溶液を試料として、各種スラブ光導波路を用いて吸収スペクトル測定を行った。結果を図 10 に示す。

得られた吸収スペクトルを比較したところ、表面の疎水性が強いものほど、X-gluc の吸収スペクトル強度が高いことがわかった。発色した X-gluc は疎水性の表面との親和性が高く、疎水性表面により多く吸着していると考えられる。

2.5. おわりに

SOWG 分光法を用いた固液界面における吸収スペクトルのその場観察方法を利用した、酵素の活

性測定方法の基本原理、実際の測定手順、実施例等をまとめた。本測定法は我々が開発した産総研オリジナルである。現在も改良や高機能化は進めており、測定対象も広げつつある。

参考文献

- 1) “A Slab-Optical-Waveguide Absorption Spectroscopy of Langmuir-Blodgett Films with a White Light Excitation Source”, Kenji Kato, Akiko Takatsu, Naoki Matsuda, Reiko Azumi, Mutuyoshi Matsumoto, *Chemistry Letters*, **1995**, 437-438 (1995).
- 2) “Absorption Spectra of Rhodamine 6G by Slab Optical Waveguide Spectroscopy”, Naoki Matsuda, Akiko Takatsu, Kenji Kato, *Chemistry Letters*, **1996**, 105-106 (1996).
- 3) “Optical Waveguide Spectrometer Bases on Thin-film Glass Plate”, Zhi-mei Qi, Naoki Matsuda, Takamitsu Yoshida, Hajime Asano, Akiko Takatsu, Kenji Kato, *Optics Letters*, **27**, 2001-2003 (2002).
- 4) “Effect of Surface Hydrophilicity and Solution Chemistry on the Adsorption Behavior of Cytochrome *c* in Quartz Studied Using Slab Optical Waveguide (SOWG) Spectroscopy”, Jose H. Santos, Naoki Matsuda, Zhi-mei Qi, Akiko Takatsu, Kenji Kato, *IEICE Transaction Electron*, E85-C, 1275-1281 (2002).
- 5) “The Adsorption Pattern of Cytochrome *c*, Myoglobin, and Hemoglobin in Quartz Surface Detected Using Slab Optical Waveguide (SOWG) Spectroscopy”, Jose H. Santos, Naoki Matsuda, Zhi-mei Qi, Akiko Takatsu, Kenji Kato, *Analytical Sciences*, **19**, 199-203 (2003).
- 6) “In Situ Absorption Spectra and Adsorbed Species of Methylene Blue on Glass/Water Interfaces by Slab Optical Waveguide Spectroscopy”, Naoki Matsuda, Jin-Jian Zheng, De-Kui Qing, Akiko Takatsu, Kenji Kato, *Applied Spectroscopy*, **57**, 100-103 (2003).
- 7) “Study of Initial Adsorption Process of Hemoglobin to Glass Surface by using Time-Resolved Slab Optical Waveguide Spectroscopy”, Takamitsu Yoshida, Hajime Asano, Jose H. Santos, Zhi-mei Qi, Li-xian Sun, Akiko Takatsu, Kenji Kato, Naoki Matsuda, *Chemistry Letters*, **32**, 270-271 (2003).
- 8) “Spectroelectrochemical Studies on Surface Immobilized Cytochrome *c* on ITO electrode by Slab Optical Waveguide Spectroscopy”, Naoki Matsuda, Jose H. Santos, Akiko Takatsu, Kenji Kato, *Thin Solid Films*, **438-439**, 403-406 (2003).
- 9) “In situ observation of reduction behavior of hemoglobin molecules adsorbed on glass surface”, Masayoshi Matsui, Akiko Nakahara, Akiko Takatsu, Kenji Kato, Naoki Matsuda, *IEICE Trans. Electron.*, **E89-C**, 1741-1745 (2006).
- 10) “Direct electron transfer of hemoglobin molecules on bare ITO electrodes”, Yusuke Ayato, Takashi Itahashi, Naoki Matsuda, *Chemistry Letters*, **36**, 406-407 (2007).
- 11) “In Situ Observation of Electrochemical Activity and Time Dependent Characteristics of Cytochrome *c* at Bare Indium-Tin-Oxide Electrodes by Voltammetry and Slab Optical Waveguide Spectroscopy”, Yusuke Ayato, Akiko Takatsu, Kenji Kato, Naoki Matsuda, *IEICE Trans. Electron*, E91-C, 1899-1904 (2008).
- 12) “Electrochemical characterization of hemoglobin adsorbed on bare ITO electrode surfaces”, Yusuke Ayato, Akiko Takatsu, Kenji Kato, Naoki Matsuda, *Jpn. J. Appl. Phys.*, **47**, 1333-1336 (2008).

3. 水溶性テトラゾリウム塩を用いた微生物簡易検出法のマニュアル（平成21年度）

福岡県工業技術センター 生物食品研究所

3.1. はじめに

薬剤感受性試験や抗菌性物質スクリーニング、食中毒菌検査など微生物の生存率測定は様々な分野で注目される技術である。微生物の生存率は一般的にコロニー形成や増殖による濁り度合いを目視評価されるが、長い時間がかかったり操作に熟練を要したりと煩雑な点が多い。そこで、我々は微生物の生存率を迅速かつ簡便に測定することを目的として、水溶性テトラゾリウム塩を用いた微生物検出キット”Microbial Viability Assay Kit-WST”（株同仁化学研究所製）を2008年に開発した。本キットには、①検出試薬を添加するだけで微生物の生死を呈色反応で簡単に見分けることができる、②目視では確認できない低い密度の微生物を検出できるため、迅速に結果を得ることができるというメリットがある。

本測定マニュアルでは、具体的な実施例として①薬剤感受性試験、②抗菌性物質のスクリーニング及び③水溶性ビタミン類の微生物定量への適用について述べる。

3.2. 検出試薬

96 ウェルマイクロプレートの1ウェルあたり10 μ lの検出試薬が必要である。検体数に応じて調製量を決定する。

<グラム陰性菌>

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

<グラム陽性菌、真菌、一部のグラム陰性菌（ビブリオ菌など）、不明の場合>

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

3.3. 薬剤感受性試験

感染症治療では適切な抗生物質の用法・用量を選択するために薬剤感受性検査が行われる。薬剤感受性試験は、検査する抗生物質を一定濃度になるように添加した培地で対象となる感染症起因菌が生育可能かどうか検査する試験であり、微量液体希釈法とディスク拡散法に大別される。特に前者は感染症起因菌が薬剤耐性か感受性か判別できるだけでなく、薬剤の最小発育阻止濃度（Minimum Inhibitory Concentration、以下MICと省略）も測定することができる。さらに、マイクロプレートを用いる手法であるため、大量のサンプルを一斉に測定できるメリットがある。日本化学療法学会やClinical and Laboratory Standards Institute（CLSI）が定める標準法（微量液体希釈法）では、対象とする感染症起因菌と抗生物質を18～24時間接触させ、感染症起因菌の生死を発育に伴う濁り（濁度）により目視評価する。しかし、この方法では検査に長い時間がかかること、また、評価に熟練を要するなど様々な問題点がある。そこで、本法を薬剤感受性試験（微量液体希釈法）へ適用することで検査時間の短縮と評価の簡便性向上を試みた。

3.3.1. 測定手順

3.3.1.1. 準備

- ① 試験対象とする微生物を最適な液体培地中で 16 時間前培養した。培養した菌懸濁液を滅菌生理食塩水で OD₅₅₀ が約 0.125 (0.5 McFarland 相当) となるように希釈し、さらに滅菌生理食塩水で 10 倍希釈し接種用菌液とした (約 10⁷ CFU/ml)。
- ② 試験する抗生物質を Ca 及び Mg イオン濃度調製済みミューラヒントンブロス (極東製薬工業株) を用いて濃度を 2 倍希釈系列に調製した。
※例えば、64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0 µg/ml
- ③ 検出試薬は 3.2. に従って調製した。

3.3.1.2. 薬剤感受性試験

- ① 図 3.1 の薬剤感受性試験分注例に従い、96 ウェルマイクロプレート各ウェルへ各種濃度に調製した抗生物質含有ミューラヒントンブロスを 180µl 分注した。

※ブランク測定

必ずブランクを測定する。最高濃度の抗生物質含有培地を 180µl、接種用菌液の代わりに滅菌生理食塩水を 10µl 分注する。

- ② さらに、各ウェルへ接種用菌液 10µl を分注し (約 10⁴ CFU/well)、35°C で 6 時間インキュベーション*した。

※インキュベーション時間 (図 3.2)

大腸菌とアンピシリン (AMP)、セレウス菌とセフトキシム (CFX) の組み合わせにおいて、インキュベーション時間の検討を行ったところ、6 時間以上で MIC 値が一定となったため、インキュベーション時間を 6 時間に設定した。大腸菌に対する AMP の MIC 値は 2、セレウス菌に対する CFX の MIC 値は 64 であった。

- ③ インキュベーションした 96 ウェルマイクロプレート各ウェルに検出試薬を 10 µl ずつ添加し、更に 35°C で 2 時間インキュベーションした。
- ④ 吸光マイクロプレートリーダー (VersaMax, 日本モレキュラーデバイス) へセットし、エンドポイント測定モードで 460nm における吸光度を測定した。
- ⑤ ブランクと比較して吸光度変化が 0.05 以上のウェルを生育、以下のウェルを阻止と判定した。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0	ブランク
B	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0	ブランク
C	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0	ブランク
D	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0	ブランク
E	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0	ブランク
F	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0	ブランク
G	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0	ブランク
H	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0	ブランク

抗生物質調製液 (μg/ml, 180μl)
 ブランク (180μl)

図 3.1 薬剤感受性試験の 96 ウェルマイクロプレート分注例

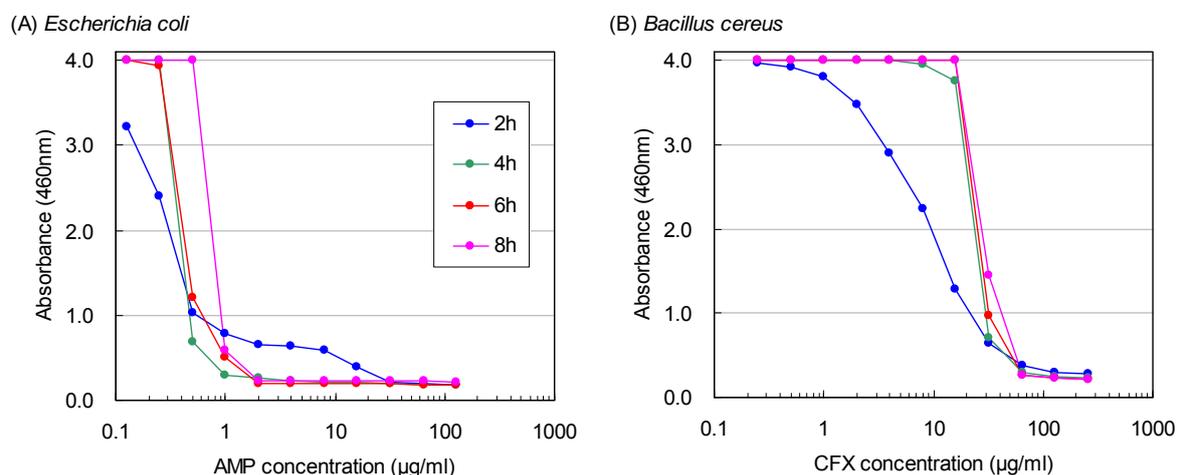


図 3.2 薬剤感受性試験におけるインキュベーション時間の検討

3.3.2. 測定結果

3.3.2.1. 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定の迅速化

微生物として黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* NBRC12732 (SA) 及びメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* JCM8702 (MRSA) を、抗生物質にオキサシリン Oxacillin を用いて本法と従来法による薬剤感受性試験を実施し、MIC 値の迅速測定を試みた。

3.3.1. の手順に従い、SA 及び MRSA を種々の濃度の Oxacillin を含むミューラヒントンブロスで 6 時間インキュベートした後、検出試薬を添加し、さらに 2 時間 (35°C) 反応させた。図 3.3 は 8 時間後の 96 ウェルマイクロプレートである。本法では MIC 値はそれぞれ 0.5、32 と見積もることができ、メチシリン耐性菌と感受性菌との差を約 8 時間で検出することができた。一方、従来法では微生物の発育による濁りを目視判定するため、8 時間では発育が不十分で判定することができなかった。従来法では通常、測定に 18~24 時間を要する。この結果より、本法を用いることにより MIC 値を迅速に測定できることが明らかとなった。

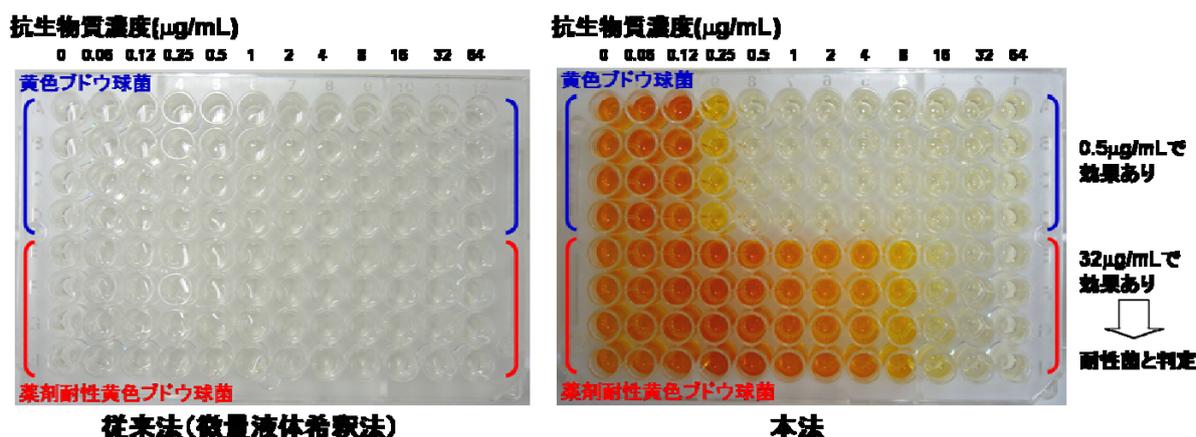


図 3.3 薬剤感受性試験（本法と従来法の比較、8 時間）

3.3.2.2. 本法と従来法により得られた MIC 値の相関性

次に、グラム陰性菌 5 種類及びグラム陽性菌 5 種類に対する 5 種類の抗生物質の MIC 値を本法（発色法、8 時間）と従来法（目視判定法、24 時間）を用いて測定し、その相関性の検証を行った。

表 3.1 に示すように、MIC 値が一致したのは 50 試料中 37 試料で 74%、許容範囲と考えられる 1 段階希釈のずれまで含めると一致率は 94%となった。この結果から本法と従来法の高い相関性が示され、本法の有効性が実証された。

表 3.1 本法と従来法で得られた MIC 値の比較

Antibiotics	<i>Escherichia coli</i>		<i>Klebsiella pneumoniae</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Serratia marcescens</i>		<i>Salmonella enterica</i>	
	Present method	Microdilution method	Present method	Microdilution method	Present method	Microdilution method	Present method	Microdilution method	Present method	Microdilution method
AMP	2	2-4	32	128	>256	>256	64	128	1	1-2
CFX	0.062-0.125	0.031-0.125	0.007	0.007-0.015	8	8	0.5	0.5	0.125	0.062-0.125
CP	8	16	2	2	32	64	32	32	16	16
GM	0.5-1	1	0.125	0.125-0.25	1	2-8	0.5	1	0.25	0.25-0.5
CPF	0.062	0.031-0.062	0.062	0.062-0.125	0.062	0.062-0.125	0.062	0.062	0.031	0.015

Antibiotics	<i>Bacillus cereus</i>		<i>Enterococcus faecalis</i>		<i>Listeria monocytogenes</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Micrococcus luteus</i>	
	Present method	Microdilution method	Present method	Microdilution method	Present method	Microdilution method	Present method	Microdilution method	Present method	Microdilution method
AMP	>256	>256	1	0.5-1	0.25	0.125	0.125	0.125-0.25	0.007	0.003-0.007
CFX	64	64	0.5-1	1	16	16	4	4	0.125	0.125
CP	4	4	8	8	8	4	8	8	2	4
GM	0.25	0.25	16	8-16	0.125	0.062-0.125	0.031	0.031-0.062	0.5	0.25-0.5
CPF	0.125	0.125-0.25	2	2	16	2-4	1	0.25	4	2-4

Antibiotics: ampicillin, AMP; cefotaxime, CFX; chloramphenicol, CP; gentamicin, GM; ciprofloxacin, CPF. (µg/ml)

本法を適用することにより、従来の薬剤感受性試験の測定時間を大幅に短縮することができることがわかった（24 時間以上→8 時間）。また、従来法では菌の発育の有無を肉眼により判定して MIC 値を決定するため、判定が非常に煩雑である。一方、本法は生きている微生物

のみに反応が起こり着色するという非常に判別しやすい手法であり、さらにマイクロプレートリーダーを用いることで客観的な数値でデータを得ることが可能である。そのため、医療機関での臨床検査や企業における新規薬剤開発に要する検査時間が短縮されることから、臨床検査や新しい医薬品・抗菌剤の開発のスピードアップが期待できる。

3.4. 抗菌性物質のスクリーニング

近年、食の安全性に関心が高まる中、発酵微生物や天然素材由来の抗菌性物質の探索が活発に行われている。特に味噌や醤油、漬物など乳酸菌が関係する伝統的な発酵食品は日本の食文化に根づいており、乳酸菌の生産するナイシンなどの抗菌性物質（バクテリオシン）を利用した食品の製造や品質保持に関心が集まっている。しかし、抗菌性物質の生産能を有する乳酸菌を広く自然界や食品からスクリーニングするには、多検体の試料を迅速に調べる必要がある。現在、抗菌性物質のスクリーニングには Spot-on-lawn 法が汎用されている。この手法は検定菌を寒天培地上に塗抹しておき、そこへサンプルをスポットして培養を行い、阻止円の形成の有無で判定が行われる。しかし、この方法で多検体の試料を測定するには多大な労力と時間を要する。そこで、本法を抗菌性物質のスクリーニングへ適用し、測定の迅速性及び操作性の向上を試みた。今回はそのモデル系として、自然界や食品などから分離した乳酸菌を対象として、そのバクテオリオシン生産能のスクリーニングを行うために、乳酸菌培養上清の抗菌活性を測定した。

3.4.1. 測定手順

3.4.1.1. 準備

- ① 自然界や食品などから分離した乳酸菌を MRS 培地で嫌気培養した（37℃、24 時間）。次に、乳酸菌培養液を遠心し、乳酸菌培養上清を得た。さらに、8N 水酸化ナトリウムで培養上清の pH を 6.5～6.8 に調製した後、0.2μm フィルターでろ過滅菌し、培養上清調製液とした。
- ② 検定菌として代表的なグラム陽性菌である *Bacillus cereus*、*Staphylococcus aureus*、*Listeria monocytogenes*、*Micrococcus luteus* を TSBYE 培地で前培養（37℃、18 時間）し、滅菌生理食塩水で下記のように調製し、検定菌調製液とした。

<i>Bacillus cereus</i> : 約 10 ⁴ ～10 ⁵ CFU/ml	前培養液を 10000 倍希釈
<i>Staphylococcus aureus</i> : 約 10 ⁶ CFU/ml	前培養液を 500 倍希釈
<i>Listeria monocytogenes</i> : 約 10 ⁶ CFU/ml	前培養液を 500 倍希釈
<i>Micrococcus luteus</i> : 約 10 ⁶ CFU/ml	前培養液を 500 倍希釈
- ③ 検出試薬は 3.2. に従って調製した。

3.4.1.2. 抗菌活性測定

- ① 96 ウェルマイクロプレート上でミューラヒントンブロスを用いて培養上清調製液の 2 倍希釈系列溶液を作製した（各 180μl）。（分注例：図 3.5）
- ② 各ウェルへ検定菌調製液 10μl を分注し、37℃で 6 時間インキュベーション※した。
※インキュベーション時間（図 3.4）

抗菌性物質としてナイシンを用い、各種検定菌との組み合わせにおけるインキ

インキュベーション時間の検討を行ったところ、4 時間以上で MIC 値が一定となった。そこで、確実性を考慮してインキュベーション時間を 6 時間に設定した。

- ③ インキュベーションした 96 ウェルマイクロプレートの各ウェルに検出試薬を 10 μ l 添加し、さらに 2 時間インキュベーションした。
- ④ 吸光マイクロプレートリーダーへセットし、エンドポイント測定モードで 460nm における吸光度を測定した。

3.4.2. 測定結果

3.4.2.1. 抗菌活性測定の迅速化

検定菌として *Bacillus cereus*(*B. c.*)、*Staphylococcus aureus* (*S. a.*)、*Listeria monocytogenes* (*L. m.*)、*Micrococcus luteus* (*M. l.*)を、被検試料として乳酸菌培養上清を用いて抗菌性物質の生産能を有する乳酸菌のスクリーングを行った。ポジティブコントロールとしてナイシン生産菌である *Lactobacillus lactis* NBRC12007 を、ネガティブコントロールとして *Lactobacillus lactis* NBRC100933 を用いた。その結果、*Lactobacillus lactis* NBRC12007 に加えて、試料 1、2 及び 5 において発色が抑制されたウェルが確認でき、抗菌活性が認められた (図 3.5)。

一方、同様の試料を従来法である Spot-on-lawn 法 (24 時間培養) を用いて測定したところ、*Lactobacillus lactis* NBRC12007、試料 1、2 及び 5 において抗菌活性が認められた (図 3.6)。抗菌活性の有無は本法と良好に一致した。

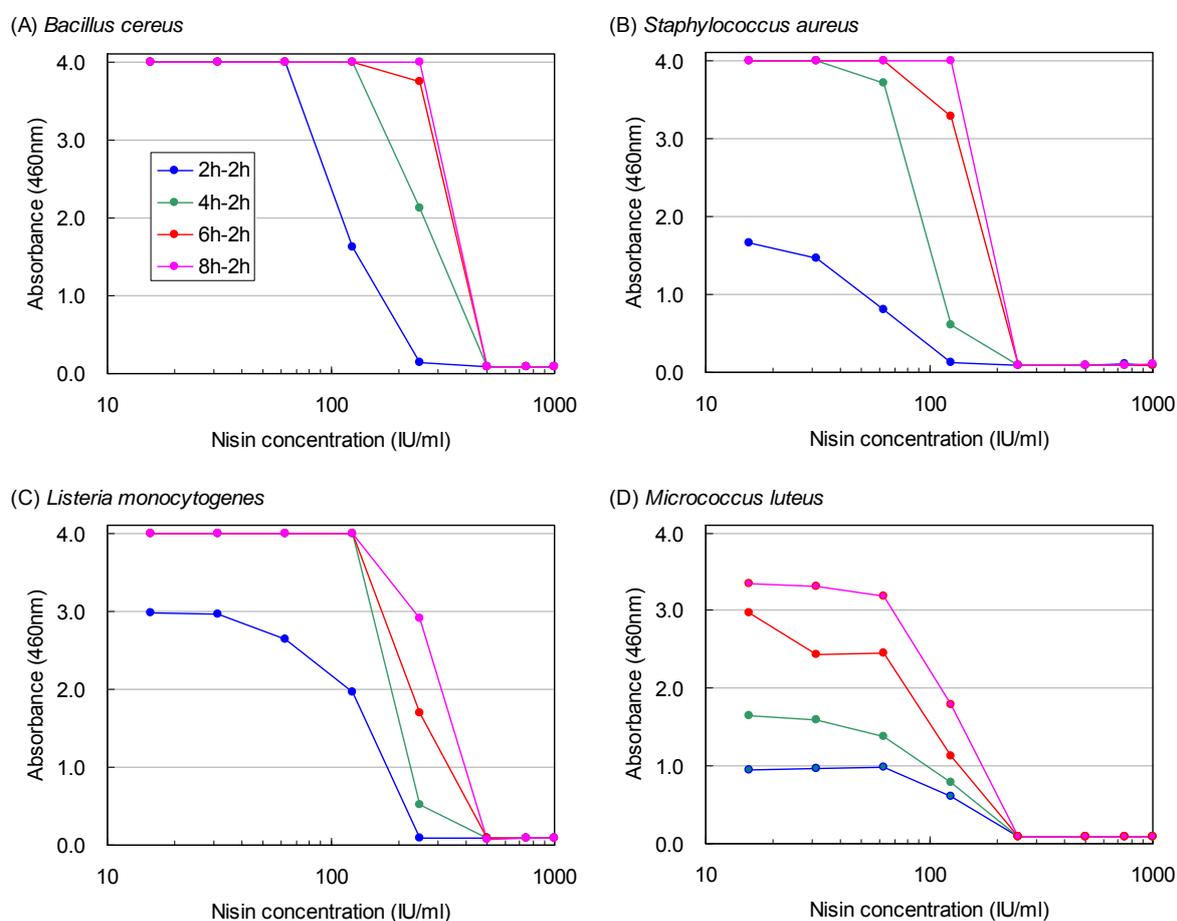


図 3.4 ナイシンの抗菌性試験におけるインキュベーション時間の検討

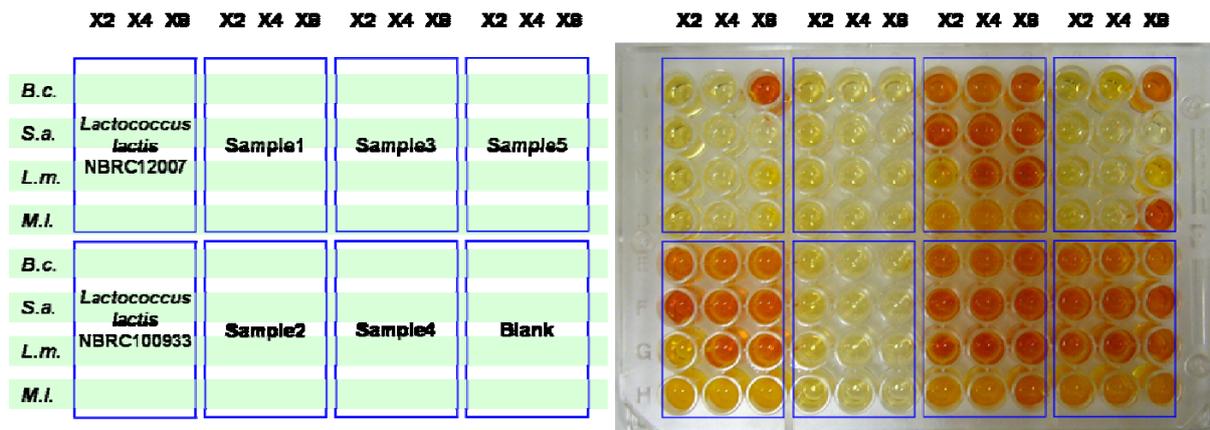


図 3.5 本法による抗菌性物質のスクリーニング

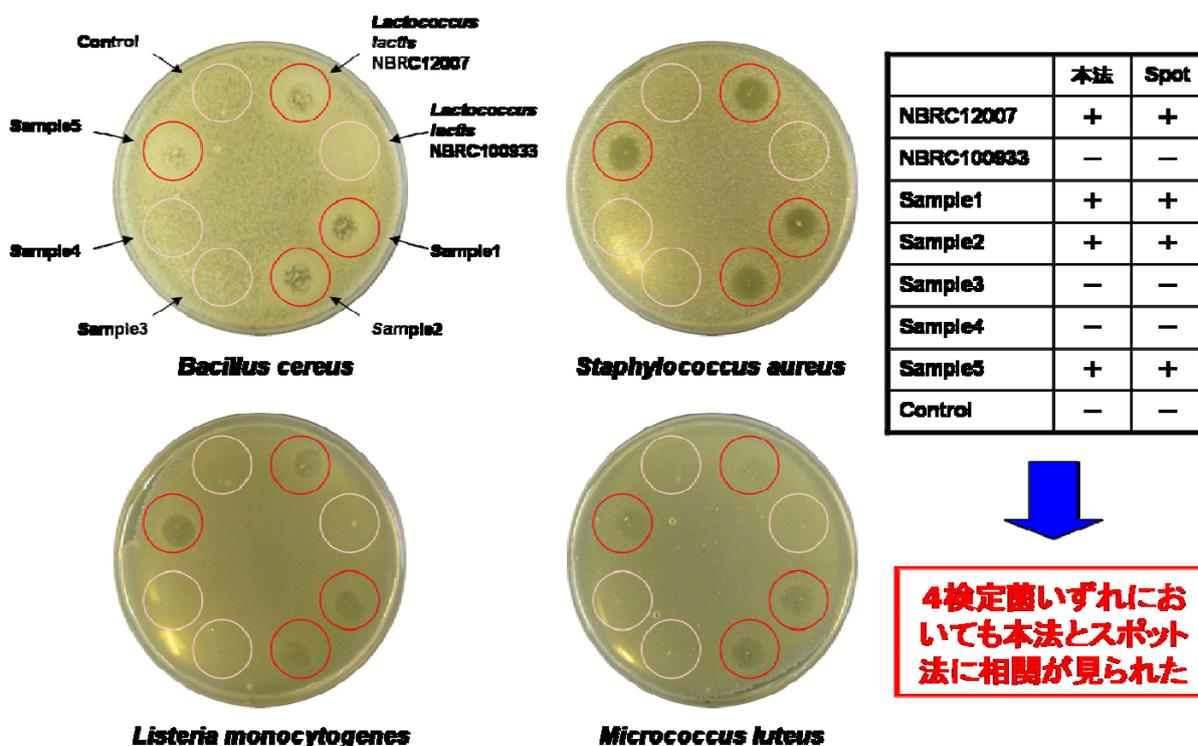


図 3.6 従来法 (Spot-on-lawn 法) による抗菌性物質のスクリーニング

3.4.2.2. 本法と従来法により得られた抗菌活性の相関性

さらに、分離した乳酸菌の培養上清 51 試料の抗菌活性を本法と Spot-on-lawn 法により測定した (表 3.2)。従来法において“+”と判定された試料はすべて本法でも“+”と判定された。従来法で“±”と判定された試料も本法ではすべて“+”と判定された。以上の結果から、本法と従来法の高い相関性が認められると共に、本法は従来法より広く抗菌活性を捕らえていることがわかった。

従来法では測定に約 24 時間 (場合によって 48 時間) を要するのに対して、本法では 8 時間と大幅に検出時間を短縮することができた。また、従来法では例えば 4 検定菌に対する 24

試料の抗菌活性測定のために、シャーレ（8 スポット／枚）が 12 枚必要であるのに対して、本法では 96 ウェルマイクロプレート 1 枚で済む計算になり、廃棄物の減量の面でもメリットがある。さらに、寒天培地への試料のスポットは表面張力の作用で上手くスポットできない場面が多々ある。一方、マイクロプレート法ではウェルへの試料の分注は容易であり、操作性に関しても格段に優れているといえる。

判定基準

判定	本法	従来法
+	8 時間培養で発色無し	24 時間培養で阻止円有り
±	8 時間培養で発色は無いが、 24 時間培養で発色有り	24 時間培養で阻止円はあるが、 48 時間培養で阻止円無し
-	8 時間培養で発色有り	24 時間培養で阻止円無し

表 3.2 本法と従来法による抗菌活性の比較

	<i>Bacillus cereus</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Listeria monocytogenes</i>		<i>Micrococcus luteus</i>	
	Present method	Spot-on-lawn method	Present method	Spot-on-lawn method	Present method	Spot-on-lawn method	Present method	Spot-on-lawn method
<i>Lactococcus lactis</i> NBRC12007	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Lactococcus lactis</i> NBRC100933	—	—	—	—	—	—	—	—
Sample								
1	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	±	+	+	+	±	+	+
3	—	—	—	—	—	—	—	—
4	—	—	—	—	—	—	—	—
5	+	±	+	+	+	+	+	±
6	—	—	—	—	—	—	—	—
7	—	—	—	—	—	—	—	—
8	—	—	—	—	—	—	—	—
9	—	—	—	—	—	—	—	—
10	—	—	—	—	—	—	—	—
11	—	—	—	—	—	—	—	—
12	—	—	—	—	—	—	—	—
13	—	—	—	—	—	—	—	—
14	—	—	—	—	—	—	—	—
15	—	—	—	—	—	—	—	—
16	—	—	—	—	—	—	—	—
17	—	—	—	—	—	—	—	—
18	—	—	—	—	+	+	—	—
19	—	—	—	—	+	+	—	—
20	—	—	—	—	—	—	—	—
21	—	—	—	—	—	—	—	—
22	±	—	+	+	+	+	+	+
23	—	—	—	—	—	—	—	—
24	—	—	—	—	—	—	—	—
25	—	—	—	—	—	—	—	—
26	—	—	—	—	—	—	—	—
27	—	—	—	—	—	—	—	—
28	±	—	+	+	+	+	+	+
29	+	±	+	+	+	+	+	±
30	—	—	—	—	—	—	—	—
31	—	—	—	—	—	—	—	—
32	—	—	—	—	—	—	—	—
33	—	—	—	—	—	—	—	—
34	—	—	—	—	—	—	—	—
35	—	—	—	—	—	—	—	—
36	—	—	—	—	—	—	—	—
37	—	—	—	—	—	—	—	—
38	—	—	—	—	—	—	—	—
39	—	—	—	—	—	—	—	—
40	—	—	—	—	—	—	—	—
41	—	—	—	—	—	—	—	—
42	—	—	—	—	—	—	—	—
43	—	—	—	—	—	—	—	—
44	—	—	—	—	—	—	—	—
45	—	—	—	—	—	—	—	—
46	—	—	—	—	—	—	—	—
47	—	—	—	—	—	—	—	—
48	—	—	—	—	—	—	—	—
49	—	—	—	—	—	—	—	—
50	—	—	—	—	—	—	—	—
51	—	—	—	—	—	—	—	—

Present method: +, complete inhibition of formazan formation after assay of 8 h; ±, delay of formazan formation (inhibition of formazan formation after assay of 8 h but no inhibition of formazan formation after assay of 24 h); —, no inhibition of formazan formation after assay of 8 h.

Spot-on-lawn method: +, complete inhibition of test organism's growth after incubation of 24 h; ±, delay of indicator's growth (inhibition of test organism's growth after incubation of 24 h but no inhibition of test organism's growth after incubation of 48 h); —, no inhibition of test organism's growth after incubation of 24 h.

3.5. 水溶性ビタミン類の微生物定量

水溶性ビタミン類のうち、 B_1 及び B_2 を除く成分の測定には微生物定量法が採用されている。この定量法は通常試験管で行われるが、最近では多検体処理が可能なマイクロプレート法が開発され、利用されるようになってきている。しかし、この手法では多検体処理が可能である反面、測定時間が2日間必要というデメリットがある。また、試験管法、マイクロプレート法いずれにしても濁度法を採用していることから、再現性に乏しく、高感度化にも限界があるといった欠点がある。そこで、本法を水溶性ビタミン類（ビタミン B_6 、ビオチン、ナイアシン、葉酸、パントテン酸）のマイクロプレート／微生物定量法へ適用し、その有効性を検討した。

3.5.1. 測定手順

3.5.1.1. 準備

- ① 市販の各種ビタミン定量用培地（日水製薬株）を超純水にて調製し、 $0.2\mu\text{m}$ フィルターで滅菌ろ過し、ビタミン定量用培地とした。（調製の詳細は製品ガイドブックに従う。）
- ② 各種ビタミン要求性微生物の前培養液から遠心により上清を除いた後、滅菌生理食塩水で2度洗浄した。さらに、下記のような McFarland 相当の密度になるように滅菌生理食塩水で希釈して接種用菌体液とした。微生物の菌体密度の検討は図 3.7 に示す通り。菌体密度が高いほうが高い発色が見られたが、ブランクでも比較的高い発色が生じた。そこで、ビタミン添加時の発色度及びブランクにおけるバックグラウンドの上昇を考慮して下記の密度を選択した。
ビタミン B_6 : McFarland1.0 の 10 倍希釈
葉酸 : McFarland1.0
ビオチン、ナイアシン、パントテン酸 : McFarland0.5
- ③ 検出試薬は 3.2. に従って調製した。

3.5.1.2. 試料調製（食品中のビタミン B_6 定量）

天然物中のビタミン B_6 は、ピリドキシン、ピリドキサール、ピリドキサミン及びそれらのリン酸エステル、リン酸エステルとタンパクの結合体などの型で存在している。定量に使用するビタミン B_6 要求性酵母は遊離型のみしか資化できないため、試料中のビタミン B_6 を加水分解して遊離型にする必要がある。

- ① 試料 1g に 0.055N 塩酸を 180ml 加え、 121°C で 5 時間オートクレーブした。
- ② 冷却後、 8N 水酸化ナトリウムで $\text{pH}7.0$ に調製し、純水で 200ml に定容した。
- ③ さらに、 $0.2\mu\text{m}$ フィルターでろ過滅菌した後、 0.05MNaCl 水溶液を用いて希釈して分析用試料とした。

3.5.1.3. 微生物定量

- ① 96 ウェルマイクロプレートにビタミン定量用培地を $90\ \mu\text{l}$ 分注した。
- ② 各ウェルへ標準溶液あるいは試料溶液を $90\ \mu\text{l}$ 分注した。
- ③ さらに、調製した各種ビタミン要求性の接種用菌体液 $10\ \mu\text{l}$ 及び検出試薬 $10\ \mu\text{l}$ を添加

し、30 あるいは 37°C で一定時間静置培養した。

- ④ 吸光マイクロプレートリーダーへセットし、エンドポイント測定モードで 460nm における吸光度を測定した。

※ 1 使用微生物、使用培地、培養温度、標準物質については表 3.3 を参照。

※ 2 従来法は検出試薬を添加せず、610nm の吸光度（濁度）を測定した。

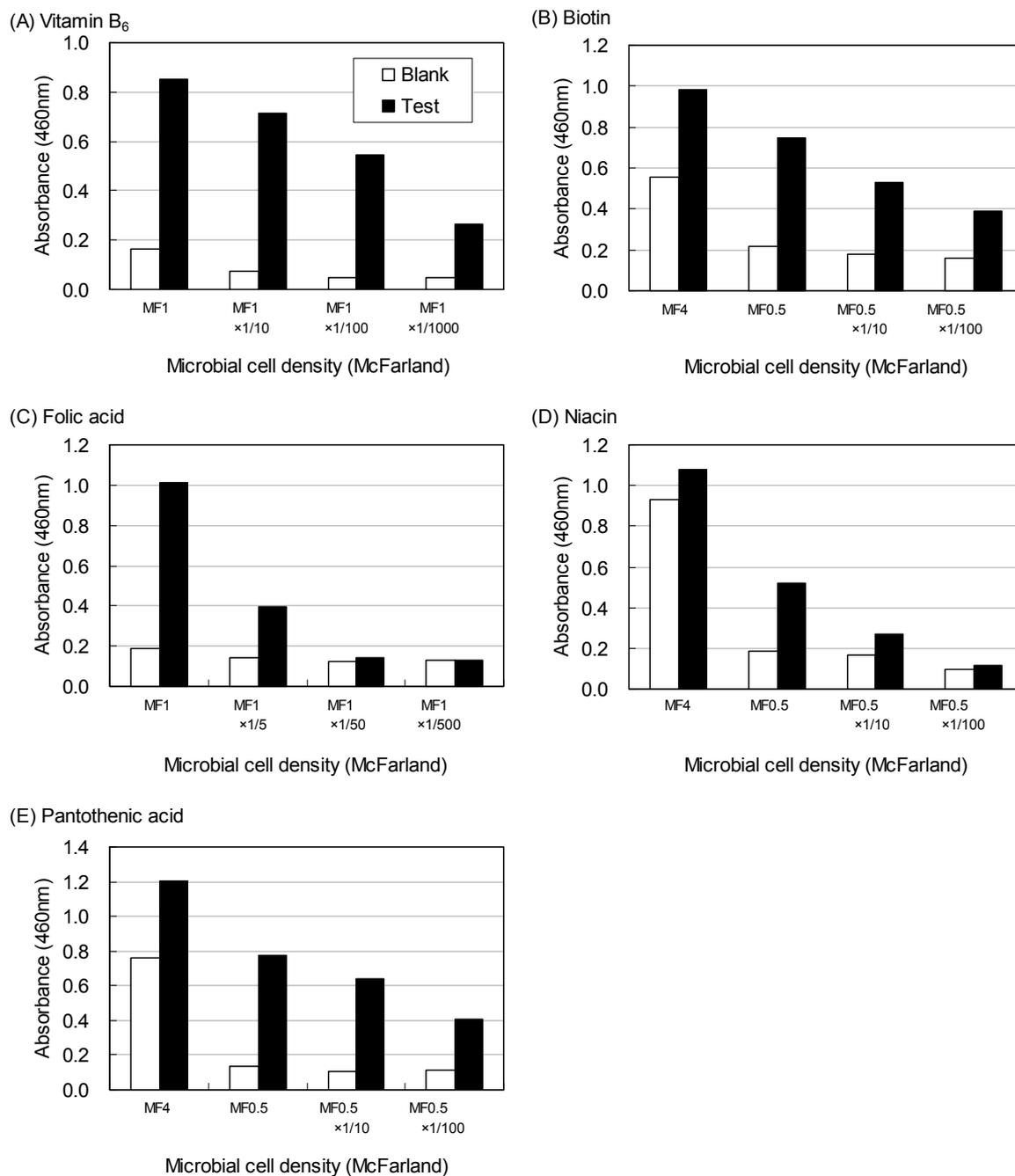


図 3.7 接種菌体密度の検討

表 3.3 水溶性ビタミン類の測定条件

水溶性ビタミン	微生物	定量培地 [※]	温度(°C)	標準物質
ビタミンB ₆	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC9080	ビタミンB ₆ 定量用基礎培地	30	ピリドキシン塩酸塩
ビオチン	<i>Lactobacillus plantarum subsp. plantarum</i> ATCC8014	ビオチン定量用基礎培地	30	(+)-ビオチン
葉酸	<i>Enterococcus hirae</i> ATCC8043	葉酸定量用基礎培地	37	葉酸
ナイアシン	<i>Lactobacillus plantarum subsp. plantarum</i> ATCC8014	ニコチン酸定量用基礎培地	30	ニコチン酸
パントテン酸	<i>Lactobacillus plantarum subsp. plantarum</i> ATCC8014	パントテン酸定量用基礎培地	30	(+)-パントテン酸カルシウム

※定量培地はすべて日水製薬(株)製

3.5.2. 測定結果

3.5.2.1. 各種水溶性ビタミン類の微生物定量

3.5.1.3 に従って、ビタミン B₆、ビオチン、ナイアシン、葉酸及びパントテン酸の微生物定量を実施した。図 3.8 は本法と従来法の直線性を比較したものである。ビタミン B₆ では 24 時間で 0.02~1ng/ml の濃度範囲で直線性が得られたのに対して、従来法では 24 時間では感度が不足しており、本法と同等の定量性を得るには 48 時間が必要であった。同様にビオチン、ナイアシン及びパントテン酸でも 24 時間で良好な直線性が得られた。一方、従来法は葉酸を除いて直線性を得るには 48 時間の反応が必要であった。

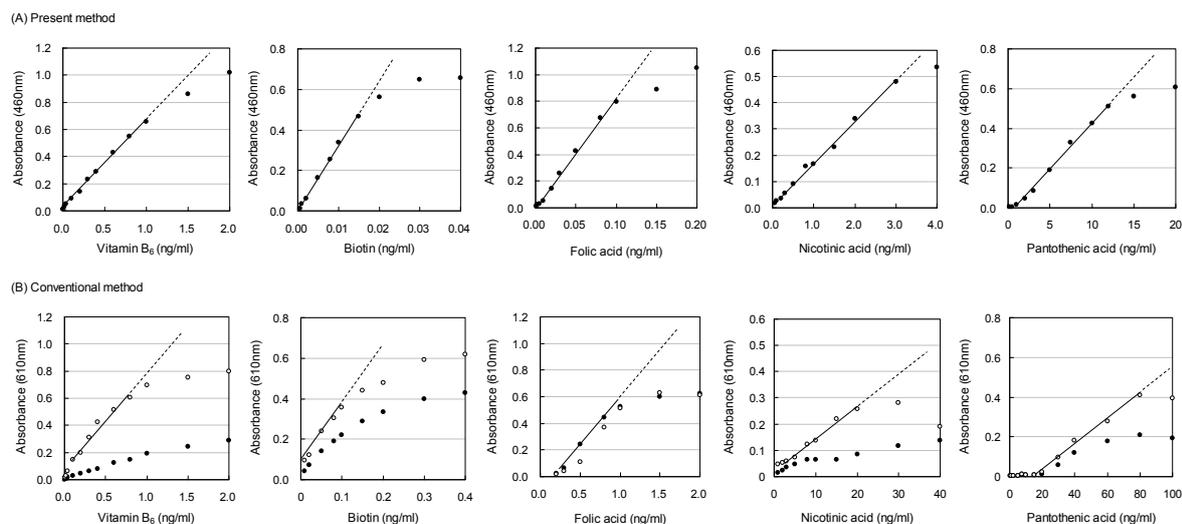


図 3.8 測定可能領域の検討

表 3.4 は水溶性ビタミン類の定量パラメータを本法と従来法（濁度法）で比較したものである。従来法の測定時間は葉酸を除いて 48 時間で行った。葉酸は 24 時間以上反応させても感度の上昇が見られなかったため、24 時間に設定した。一方、本法は 24 時間で行った結果である。測定可能範囲と感度に関しては、ビタミン B₆ では同等であるが、ビオチン、ナイアシン、葉酸及びパントテン酸では高感度化が可能になった。相対標準偏差 (RSD)、すなわち再現性はすべてにおいて改善が見られた。以上の結果より、本法により測定の迅速性、感度、再現性の向上が可能になった。

表 3.4 水溶性ビタミン類の定量パラメータ

	Vitamin B ₆		Biotin		Folic acid	
	Present method	Conventional method	Present method	Conventional method	Present method	Conventional method
Linear range (ng/ml)	0.02 - 1	0.1 - 0.8	0.001 - 0.015	0.01 - 0.1	0.002 - 0.1	0.2 - 1.0
Correlation coefficient	0.998	0.986	0.995	0.989	0.996	0.987
Sensitivity (Δ abs./ng/ml)	0.639	0.625	26.6	3.1	7.98	0.65
RSD(%), n=12	3.28	6.02	3.47	11.07	3.39	4.06
Incubation time (h)	24	48	24	48	24	24

	Niacin (Nicotinic acid)		Pantothenic acid	
	Present method	Conventional method	Present method	Conventional method
Linear range (ng/ml)	0.2 - 3.0	3 - 20	0.5 - 12	15 - 80
Correlation coefficient	0.996	0.986	0.998	0.981
Sensitivity (Δ abs./ng/ml)	0.141	0.014	0.047	0.004
RSD(%), n=12	3.82	12.66	3.73	10.38
Incubation time (h)	24	48	24	48

3.5.2.2. 実試料の測定

次に、本法を実試料中（魚類、肉類、野菜類、果実類、穀類等）のビタミン B₆ の定量へ適用し、従来法（濁度法、48 時間）との比較を行った。図 3.9 は実際の測定プレートである。微生物定量法では測定のダイナミックレンジが比較的狭いため、通常、試料の希釈系列を複数準備する必要がある。このため、下図のような試験を行うために試験管法では 100 本近い本数が必要であるが、本法ではマイクロプレート 1 枚で測定が可能である。

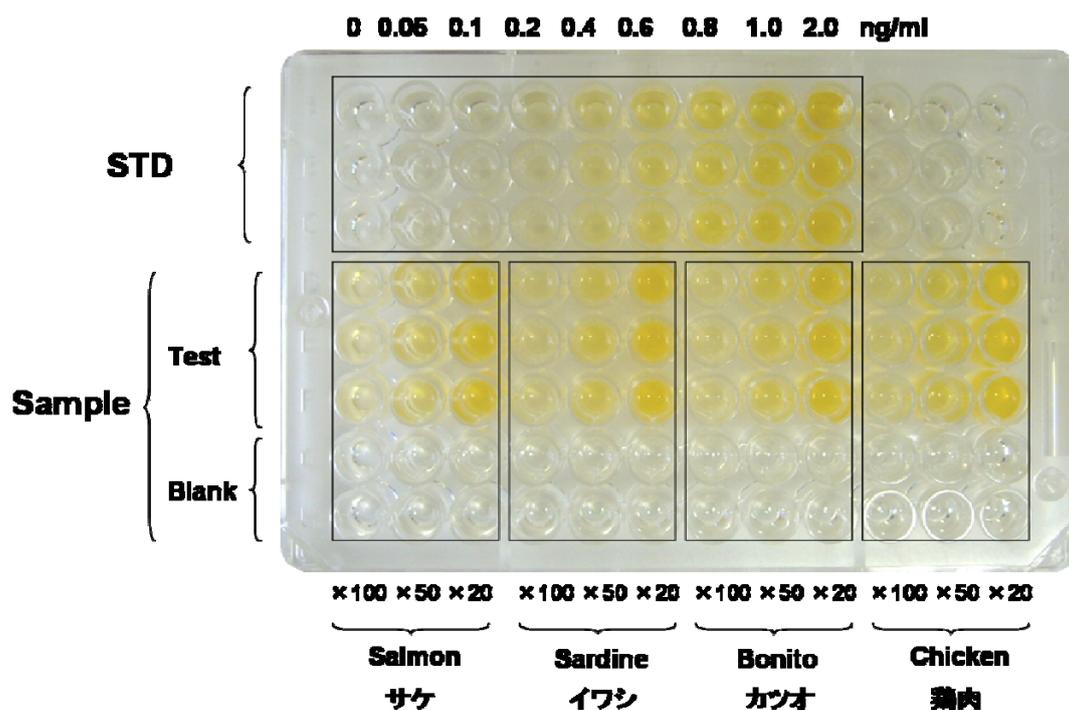


図 3.9 標準液及び実試料の測定例

表 3.5 は本法と従来法で測定した様々な食品中のビタミン B₆ 含量を比較したものである。両者に比較的良好な一致が見られた。さらに、ピスタチオ及び鶏レバーを用いて、回収率の検討を行ったところ、ほぼ 100%に近い回収率が得られた (表 3.6)。

本法は食品中の水溶性ビタミン類の迅速かつ正確な測定を可能としたものであり、様々な水溶性ビタミンの定量に利用可能であると考えられる。

表 3.5 食品中のビタミン B₆ 定量

Sample	Present method	Conventional method	Sample	Present method	Conventional method
Plant food			Animal food		
Apple	0.04	0.05	Beef	0.56	0.68
Banana	0.36	0.35	Chicken	1.00	1.05
Orange	0.11	0.13	Chicken liver	0.96	0.97
Garlic	1.27	1.32	Pork	0.33	0.37
Paprika (red)	0.28	0.29	Bonito	0.69	0.82
Tomato	0.16	0.21	Salmon	0.56	0.59
Rice	0.06	0.07	Sardine	0.81	0.72
Soybean	0.33	0.35	Tuna	1.07	1.29
Wheat	0.05	0.05	Drink		
Pistachio	1.50	1.46	Green tea	0.09	0.11
Shiitake mushroom	0.88	0.91	Milk	0.03	0.03
			Red wine	0.01	0.02

表 3.6 ビタミン B₆ 定量における回収率

Pistachio			Chicken liver		
Spiked (mg/100g)	Found (mg/100g)	Recovery (%)	Spiked (mg/100g)	Found (mg/100g)	Recovery (%)
0.4	0.37±0.04	91.4	0.2	0.19±0.03	99.2
0.8	0.82±0.03	103.0	0.4	0.41±0.01	103.4
2.0	1.97±0.08	98.5	1.0	0.96±0.03	95.9

3.6. おわりに

微生物検出キット Microbial Viability Assay Kit-WST を用いた微生物検出法は、従来の濁度測定法や寒天培地法と比べて感度及び精度において優れた手法である。感度については微生物によって若干の差はあるが約 10 倍高く、測定時間も大幅に短縮可能である。また、本法は生きている微生物のみに反応が起こり着色するという非常に判別しやすい手法であり、さらにマイクロプレートリーダーを用いることで客観的な数値でデータを得ることが可能である。実際、本法は微生物の増殖アッセイ、薬剤感受性試験、抗菌性物質のスクリーニング及び水溶性ビタミン類の微生物定量など具体的な実施例へ適用され、その有効性を確認するこ

とができた。

微生物の増殖アッセイにおいて、従来の濁度測定法で精度の良い増殖曲線を得るためには、微生物がウェルの底に沈降しないようにマイクロプレートに常に振とうさせておかなければならず現実的でない。本法では微生物の代謝で生成した水溶性ホルマザンを測定するため、マイクロプレートに常に振とうさせる必要はない。これにより、これまで不可能であったマイクロプレートによるリアルタイムな増殖アッセイが可能になった。また、常法となっている微量液体希釈法による薬剤感受性試験では、目視で微生物の生育の有無を確認するため、測定に長い時間を要することや判定基準が不明確であるといった問題がある。本法では微生物の生育の有無を呈色反応で感度よく検出できる。これにより、薬剤感受性試験の迅速化と判定基準の明確化が可能になった。抗菌性物質のスクリーニングにおいても、常法となっている Spot-on-lawn 法では目視で阻止円の有無を確認するため、測定に長時間を要する。また、試料を寒天培地上へ1つずつスポットしなければならず、操作性の面でも問題がある。本法では微生物を感度良く検出できることに加えて、マイクロプレートへ試料を分注する手法を採用しているため、試料分注のミスが少ない。これにより、測定の迅速性と操作性が格段に改善され、大量の試料の一斉測定が可能になった。さらに、水溶性ビタミン類の微生物定量法についても、本法により測定の迅速性、感度、再現性の向上が認められた。

このように、本法を用いることで様々なバイオアッセイ系における微生物検出の迅速性や操作性を改善することが可能になった。本法はここで取り上げた実施例以外へも適用可能であり、医薬、食品、農業、環境など様々な分野で利用されていくことを期待したい。

参考文献

- 1) T. Tsukatani, H. Suenaga, T. Higuchi, T. Akao, M. Ishiyama, T. Ezoe, K. Matsumoto, Colorimetric microbial viability assay based on reduction of water-soluble tetrazolium salts for antimicrobial susceptibility testing and screening of antimicrobial substances. *Anal. Biochem.*, 393, 117-125 (2009).
- 2) T. Tsukatani, H. Suenaga, M. Ishiyama, T. Ezoe, and K. Matsumoto, Determination of water-soluble vitamins using a colorimetric microbial viability assay based on the reduction of water-soluble tetrazolium salts, submitted to *Food Chem.*

4. 光を用いた非破壊計測方式による水分ストレス計および糖度計のマニュアル（平成21年度）

長崎県工業技術センター

果実の生産管理では、人為的に灌水量をコントロールして樹木にかかる水分ストレス量を調節することで、収穫果実の糖度を高める努力がなされている。このため、水分ストレスの迅速かつ簡易な計測装置の開発が強く望まれている。

また、果実の品質管理では、従来の大型選果装置によるバッチ計測だけではなく、生産農家や小売店、消費者などによるオンデマンド計測のニーズが増加している。このため、個人ユーザにも普及できる高精度で携帯型の糖度計の開発が強く望まれている。

そこで、独自の光計測技術を活用して、果樹の水分ストレス状態を測定する水分ストレス計と、果実の糖度を測定する糖度計の開発を行っている。

この報告では、開発した水分ストレス計測技術と糖度計測技術について、その基本原理を整理するとともに、それぞれの技術の適用事例を報告する。

植物にかかる水分ストレスの非破壊計測技法

4.1.1. はじめに

収穫果実の糖度と、果実育成期間中に樹木が受けている水分ストレス量（植物の渇き具合）との間には密接な関係がある¹⁾。このため、ミカンなど果実の栽培では、糖度の高い果物を生産するため、水分ストレスを指標とした適切な灌水管理が求められる。一方、樹木に水分ストレスが与えられれば、緑葉分光特性に現れるレッドエッジの波長が短波長側に移動する現象（レッドエッジのブルーシフト）など、分光特性に変化が現れる^{2), 3)}。また、その変化量から水分ストレスの物理的な指標である水ポテンシャルを推定することも可能である^{4), 5), 6)}。

これらのことから、果実栽培現場で果樹の水分ストレス計測に利用できる簡易計測技術として、緑葉分光特性の特徴量の変化を捉えることを利用した、植物にかかる水分ストレスの非破壊計測技術の開発を進めている。

この報告は、この水分ストレス計測技術の基本原理を整理するとともに、技術の適用例として、市販の幾つかの発光ダイオードを光源に用いて緑葉の離散的な分光反射率を測定し、その結果から水ポテンシャルを推定する装置について報告する。

4.1.2. 緑葉分光特性から水分ストレスを推定する原理

ここでは、植物にかかる水分ストレスの非破壊計測のもととなる、緑葉分光特性の測定方法と、測定された緑葉分光特性からの特徴量の抽出、さらには、その特徴量と水分ストレスの物理的指標である水ポテンシャルとの関係などについて説明する。

1) 緑葉分光特性

図4.1-1は緑葉分光特性の測定方法を模式的に示している。光源からの光は緑葉の法線方向に合わせて照射され、葉面による特定方向への散乱光を光ファイバーが捉えて分光器に導き、必要な分光特性が計測される。また、図4.1-2は緑葉分光特性の計測結果例を示しており、緑葉の分光反射率の例に加え、その一次微分特性も示している。

この報告では、反射率が低い値から高い値に急激に変化する領域（図4.1-2中に□で囲っ

た領域)、すなわち一次微分の値が大きくなる領域をレッドエッジとし、レッドエッジの特徴を表す波長として幾つかの値を採用する。

まず、一次微分の値が最大(図4.1-2中にPで示したところ)となる波長を λ_p とする。次に、 λ_p を挟み、一次微分の値が0以上となる区間(図4.1-2中の□で囲まれた部分、すなわち $\lambda_s \leq \lambda \leq \lambda_e$ の区間)に含まれる一次微分特性について、次式で求められる値を λ_{RE} とする。なお、 $R'(\lambda)$ は緑葉の分光反射率の一次微分特性を表す。

$$\lambda_{RE} = \int_{\lambda_s}^{\lambda_e} R'(\lambda) \lambda d\lambda / \int_{\lambda_s}^{\lambda_e} R'(\lambda) d\lambda \quad \dots\dots\dots \text{式4.2-1}$$

また、同区間($\lambda_s \leq \lambda \leq \lambda_e$ の区間)の一次微分特性を、次に示す正規分布の重ね合わせであると仮定する(式4.2-2を参照)。この式に含まれる係数の最適値となる、異なる2つの波長を λ_1 と λ_2 ($\lambda_1 < \lambda_2$)とする。さらに、 λ_1 と λ_2 をそれぞれの分布の面積(a_1 と a_2)で加重平均した値を λ_m とする(式4.2-3を参照)。

$$R_{RE}' = a_1 \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma_1} \exp\left(-\frac{(\lambda-\lambda_1)^2}{2\sigma_1^2}\right) + a_2 \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma_2} \exp\left(-\frac{(\lambda-\lambda_2)^2}{2\sigma_2^2}\right) \quad \dots\dots\dots \text{式4.2-2}$$

$$\lambda_m = \frac{a_1\lambda_1 + a_2\lambda_2}{a_1 + a_2} \quad \dots\dots\dots \text{式4.2-3}$$

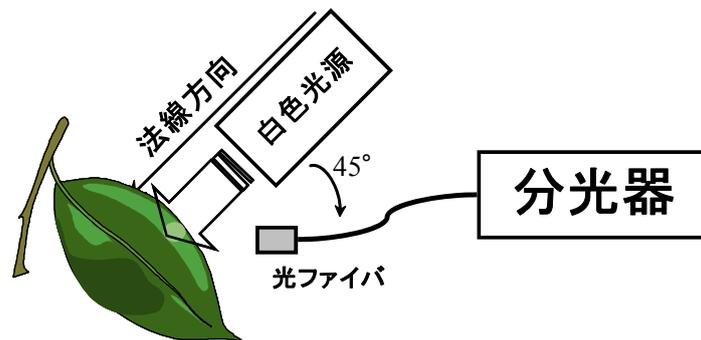


図4.1-1 緑葉の分光反射率の計測

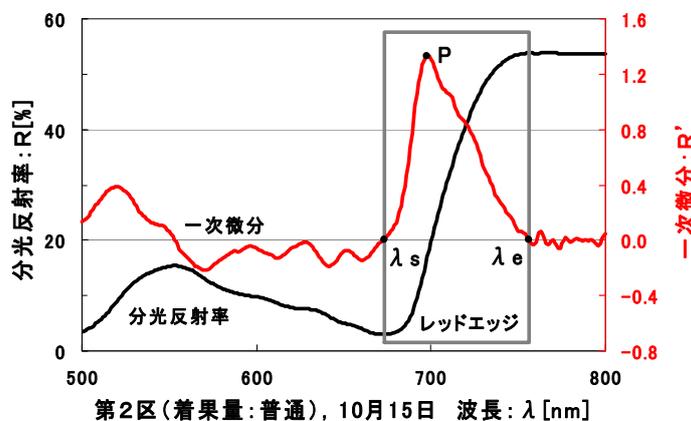


図4.1-2 分光特性の計測結果例

2) 果実栽培期間中の水ポテンシャル推移と分光特性

図4.1-3と図4.1-4は、過去のみかん栽培実験で得られた水ポテンシャル推移の測定例と、その間のレッドエッジ付近の波長域に限定した分光反射率特性の一次微分の例を示したものである。なお、水ポテンシャルが低下することは（図4.1-3で縦軸の下方向）、水分ストレス量の増加を意味する。図4.1-3によれば、8月5日には比較的弱かった水分ストレスが、その後増大し、10月6日の時点では強い水分ストレスとなっている。また、11月11日の水ポテンシャル上昇は、果実収穫前の灌水やマルチシート撤去によるものであり、水分ストレスが軽減されたことが分かる。

一方、分光反射率特性の一次微分を示した図4.1-4によれば、水分ストレスが弱かった8月5日、その特性は全体的になだらかな山状の特性を成し、720nm付近に極大が見られる。水分ストレスが徐々に増大した8月25日と9月16日には、極大となる波長が700nm付近に移動し、強い水分ストレスとなった10月6日と10月15日では、極大への立ち上がりがさらに急峻な特性へと変化している。また、水分ストレスが軽減された11月11日の特性は、700nm付近の極大部分への立ち上がり方が小さくなるとともに、720nm付近の極大が再び現れている。

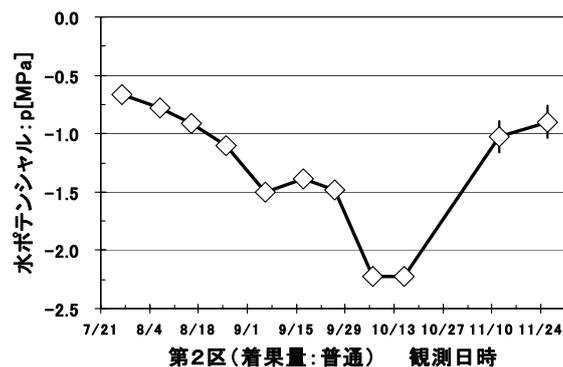


図4.1-3 水ポテンシャルの推移

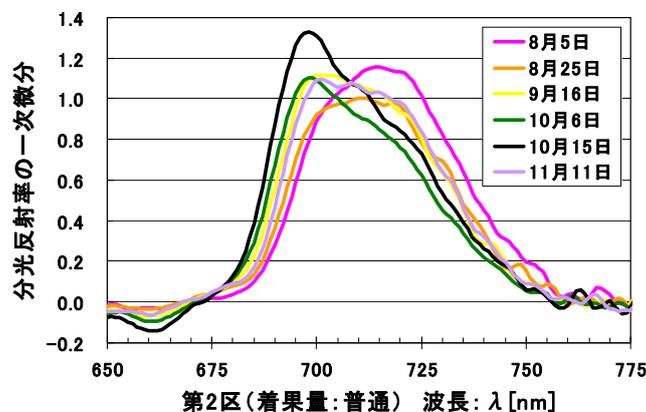
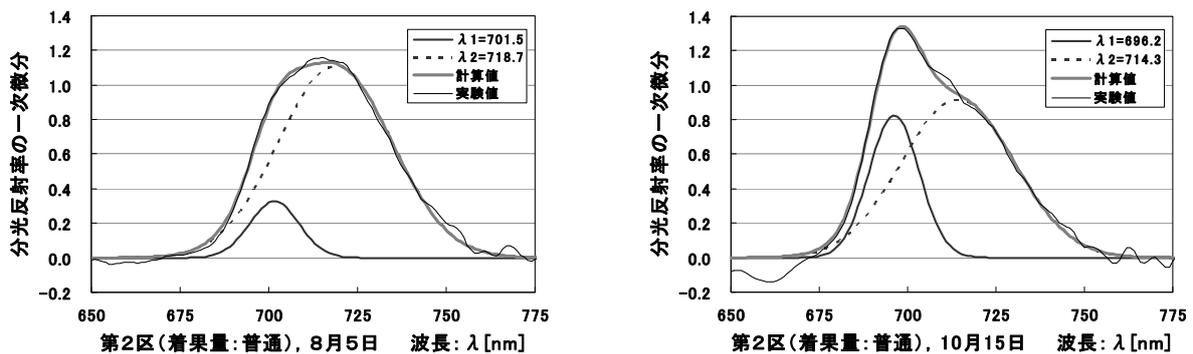


図4.1-4 分光反射特性の一次微分の例

図4.1-5は、分光反射率特性の一次微分を式4.2-2に示した2つの正規分布の重ね合わせによって近似した結果として、8月5日と10月15日を例に示したものである。この図によれば、レッドエッジ付近の一次微分特性が、式4.2-2による関数で良く近似されていることが確認できる。

図4.1-6は、レッドエッジの特徴を表す波長 (λ_1 、 λ_2 、 λ_p 、 λ_m) の推移を示したものである。図4.1-3と図4.1-6とを比べれば、水ポテンシャルの推移とレッドエッジの推移の傾向が類似していることが見て取れる。このことからレッドエッジも水分ストレスに応じて変化することが確認できる。



$a_1=5.70$ 、 $\sigma_1=6.96$ 、 $\lambda_1=701.5$ 、 $a_2=44.1$ 、 $\sigma_2=15.89$ 、 $\lambda_2=718.7$ $a_1=14.6$ 、 $\sigma_1=7.08$ 、 $\lambda_1=696.1$ 、 $a_2=36.4$ 、 $\sigma_2=15.86$ 、 $\lambda_2=714.2$

(a) 8月5日

(b) 10月15日

図4.1-5 分光反射率特性の一次微分の2つの正規分布の重ね合わせによる近似の例

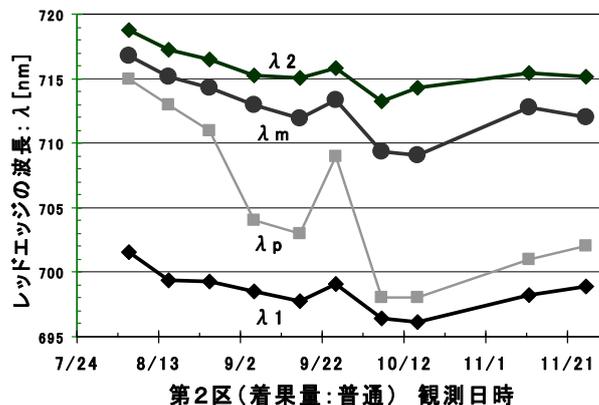


図4.1-6 レッドエッジの特徴を表す波長の推移

4.1.3. LED光源を用いた簡易型の分光式水分ストレス計

ここでは、緑葉分光特性の特徴量の変化の観測による水分ストレス推定の技術を適用した事例として、市販の幾つかの発光ダイオードを光源に用いて緑葉の離散的な分光反射率を測定し、その結果から水ポテンシャルを推定する分光式水分ストレス計について報告する。

1) 装置の構成

適用事例として報告する試作機は、本体とプローブとが一体となった構造をしており、プ

ローブ部分で緑葉を挟む動作が測定シーケンスを起動することを特徴としたものである（図4.1-7を参照）⁷⁾。この試作機には予め選定された12種の市販LEDが実装されており、実装されたLEDによる離散的な緑葉分光反射特性が2秒程度で計測され、さらにその計測結果からミカン果樹の水分ストレス量が推定される。



図4.1-7 試作開発した水分ストレス計の概観

2) 評価実験

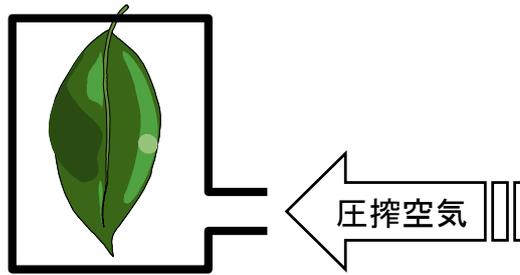
この報告では、長崎県の南部に位置するミカン生産の盛んな地域の一つである長与町で2008年6月から11月にかけて実施された評価実験の一部⁸⁾を例示する。この評価実験は、ミカン生産者の協力に加え、JA長崎、長崎県の農業改良普及センター、果樹試験場、農産園芸課の指導と協力の下で行なわれたものである。対象とした栽培品種は原口早生である。

評価実験では、従来技法による水ポテンシャルの測定結果との比較に加え、試作装置で定期的に観測された水分ストレス推定値と果実品質データとの比較検討が行なわれた。

(a) 水ポテンシャルとの比較検証

植物水分ストレスの物理的指標には水ポテンシャルが用いられ、その測定にはプレッシャ・チャンバ法が使用された（図4.1-8を参照）。プレッシャ・チャンバ法とは、サンプルした葉を、葉柄部（茎）のみを外に出して加圧できる容器にセットし、圧搾空気を使用して葉に圧力をかける（図4.1-8(a)を参照）。そして、その圧力を徐々に増していけば、ある圧力のとき葉柄の断面から水がしみ出してくる。そのときの圧力にマイナス符号を付けた値を水ポテンシャルとして読み取る方法である。なお、この測定は、葉の裏面にある気孔が閉じる深夜に行うことが必要である。実際の測定は、梅雨明け後で未だ樹木に水分ストレスが生じていない7月初旬（7月7日）と、強い水分ストレスが印加される8月中旬（8月12日）の2回、夜間に実施された。

水ポテンシャルとの比較検証では、これら夜間の実測結果と、その時同時に実施された試作機での推定結果との比較が行なわれた。



(a) 測定原理

(b) 測定器の外観

図4.1-8 プレッシャ・チャンバ法

(b) 定期観測情報との比較検証

果実栽培現場では、果実状態や樹木状態を推し量るため、おおよそ10日周期で果実横径や果実糖度と果実酸度などが測定され、その推移が調べられた。なお、果実横径は、予め試験木毎に選定された5果についての追跡調査の平均値である。果実糖度と果実酸度は、測定の度に3本の試験木から1果ずつ採取し、合計3果から搾取した果汁の混合物を分析したものである。

定期観測情報との比較検証では、定期観測に同期して実施した試作機での推定結果と、果実肥大量との関係や、果実糖度との関係などが考察された。

3) 評価結果例

(a) 水ポテンシャルとの比較検証

図4.1-9は水ポテンシャル値についての比較結果を示しており、縦軸は試作機による推定値、横軸はプレッシャ・チャンバ法による実測値を示している。

この図から、推定値のバラツキは約 $\pm 0.18\text{MPa}$ であり、高糖度果実の生産で必要と言われている実用的測定精度 ($\pm 0.2\text{MPa}$ 以内) を満たしていることが分かる。しかし、一部に $0.4\text{MPa} \sim 0.6\text{MPa}$ もの大きなバラツキを持つ測定点も存在する。

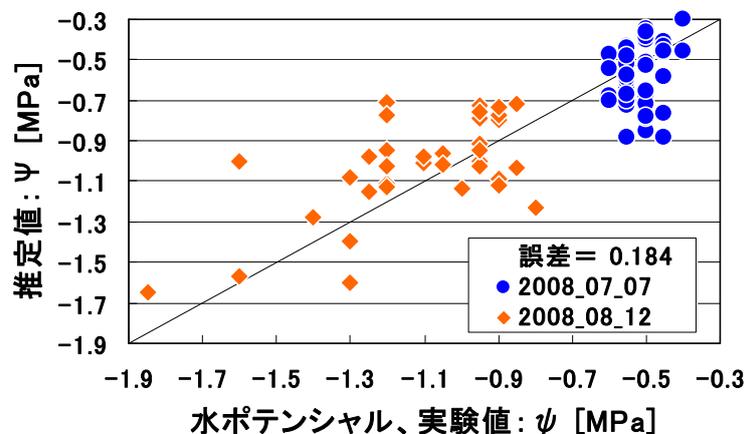


図4.1-9 水ポテンシャルの推定値と実測値との比較

プレッシャ・チャンバ装置で計測される水ポテンシャルは、計測時の植物の状態（瞬時値）

を反映している。一方、ミカン緑葉において、水分ストレスに起因する葉中クロロフィルの状況や葉の性状の変化は時間的に緩やかである。このため、緑葉分光特性の変化に着目して水分ストレスを推定している試作機は、測定日前の数日間の水分ストレスの平均値を測定しているものと考えられる。

従って、試作機が本来持つ測定精度の問題に加え、前述のことが原因となって、測定点に大きなバラツキのものが含まれているものと推察される。

(b) ストレス推定値の推移

図4.1-10は、評価実験が行なわれた、ある園の3本の試験木について、水分ストレス推定値の推移を例示したものである。なお、図中の白抜きの測定点は、プレッシャ・チャンバ装置による夜間の測定値を示している。

この図によれば、試験木T03は栽培期間をとおしてあまり水分ストレスが掛かっていなかったことが分かる。また、試験木T01とT02については、7月7日以降に水分ストレスが強まり、その後、弱い水分ストレスで推移していることも見て取れる。栽培期間の降水量や日射量、人為的な灌水量などから、試験木T01とT02で7月7日から8月7日にかけて徐々に水分ストレスが強くなっていることが確認されている。なお、試験木T03については、根の張り具合や土中水分などの関係で、十分な水分ストレスが掛からなかったものと考えられる。

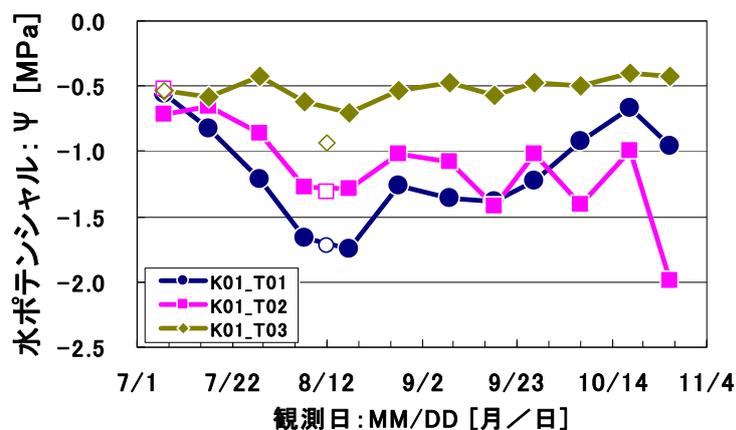


図4.1-10 ストレス推定値の推移

(c) ストレス推定値と果実肥大との関係

図4.1-11は、前述の3試験木について、果実横径の増大量から算出される果実体積肥大量と水分ストレス（水ポテンシャル推定値）との関係を示したものである。

一般に、植物に強い水分ストレスが掛かれば、植物は乾燥から身を守るため、気孔を閉じて水分の蒸散を抑える。また同時に植物体内に水分が不足するため、果実に蓄えられる水分の量が減少し、結果として果実体積肥大量も減少する。また、植物に潤沢な水分が与えられており、水分ストレスが掛かっていなければ、乾燥から身を守るために気孔を閉じる必要がなく、日射の強弱に応じて水分の蒸散量が増減することとなる。この結果、蒸散が少ないときに果実は大きく肥大し、蒸散が多いときには果実肥大量は減少する。

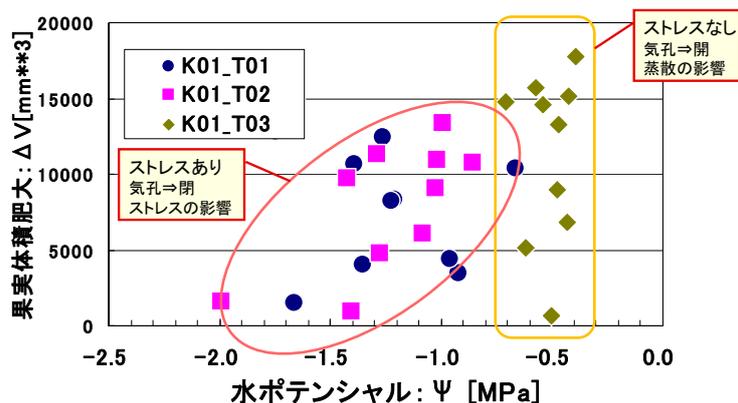


図4.1-11 ストレス推定値と果実肥大量との関係

図4.1-11を見れば、試験木T01とT02では、果実肥大量と水分ストレスとの間に正の相関が存在する可能性が窺える。これは、強い水分ストレスによって気孔が閉じていることが多く、水分ストレスに応じて果実肥大量が減少・増大しているものと理解できる。一方、試験木T03については、気孔が閉じるような強さの水分ストレスが掛かっておらず、葉からの蒸散などの影響で果実肥大量が増減しているものと理解できる。

(d) 水分ストレス積算量と収穫果実糖度・果実酸度との関係

図4.1-12は、評価実験が行われた3農園についての収穫時の果実糖度と果実酸度に着目し、その日までの水分ストレス積算量（水ポテンシャル推定値の積算量）との関係を示したものである。

データ点数が少なく、この図のみから結論を導くのは難しいが、両者は負の相関を持つことが見て取れる。このことは、栽培期間中の水分ストレスの蓄積量（水ポテンシャルの積算量）を上手くコントロールすれば、目標とする糖度の果実が生産できることを意味すると考えられる。

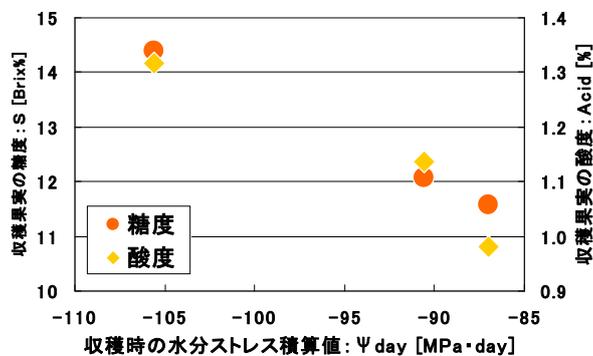


図4.1-12 収穫時のストレス積算値と果実糖度・果実酸度との関係

4.1.4. おわりに

樹木が受ける水分ストレスによって緑葉の分光特性に変化が生じる。この現象に着目すれば、簡易に水分ストレスを計測することが可能である。本マニュアルでは、この技術の適用事例として、市販の幾つかの発光ダイオードを光源に用いて緑葉の離散的な分光反射率を測定し、その結果から水ポテンシャルを推定する分光式水分ストレス計についてまとめた。

その適用事例では、水分ストレスの物理的指標である水ポテンシャルとの比較検証において、高糖度果実の生産で必要と言われている実用的測定精度（ $\pm 0.2\text{MPa}$ 以内）を満たした計測が可能であることが示唆された。また、果実肥大量との関係においては、葉に存在する気孔が閉じる程の水分ストレスが植物に掛かっているとき、果実肥大量と水分ストレスとの間に正の相関の存在が窺えるなど、測定結果が樹木や果実の水分ストレス状態と一致することが確認された。さらに、収穫果実との関係においては、樹木に累積された水分ストレスと収穫果実糖度との間に負の相関があることが確認できた。

これらのことにより、試作した水分ストレス計は、ミカン果樹にかかる水分ストレスを測定できるのみならず、高糖度果実を生産する時の灌水管理の支援機器としても有効に機能する可能性がある。

4.2. 新方式の非破壊計測技術「TFDRS法」と携帯型糖度計

4.2.1. はじめに

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

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

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

一方、半導体レーザー、あるいは発光ダイオードは①小型・軽量、②低電圧駆動、③安価等の優れた特徴を有しており、非破壊計測用光源として非常に魅力的である。また、これまでの分光器タイプを用いた屋外での糖度測定では太陽光の影響を受け測定誤差が生じる問題があるが、光源に発光ダイオード等を用いることで、その強度変調を利用したロックイン増幅により太陽光などの外乱光の影響を簡単になくすことができる。しかしながら、光源に半導体レーザー、あるいは発光ダイオードなどを用いた果実糖度の非破壊計測技術を実現するには散乱の影響を受けない新たな物理量とその測定方法が必要となる。以下では、その測定方法の一つとして著者が開発したTFDRS (Three-Fiber-Based Diffuse Reflectance Spectroscopy)²⁾の原理について記述し、さらに本方式(TFDRS法)を利用して商品化した携帯型糖度計の使用法とその測定実施例について記述する。

4.2.2. TFDRS法の基本原理

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

$$\gamma(\lambda_0, \lambda_1, \lambda_2) = \frac{\ln(R(\lambda_2)) - \ln(R(\lambda_0))}{\ln(R(\lambda_1)) - \ln(R(\lambda_0))} \quad (4.2.1)$$

ここで $R(\lambda_1)$ 、 $R(\lambda_2)$ 、 $R(\lambda_3)$ はレーザー光の波長 λ_1 、 λ_2 、 λ_3 での相対反射率をそれぞれ表す。

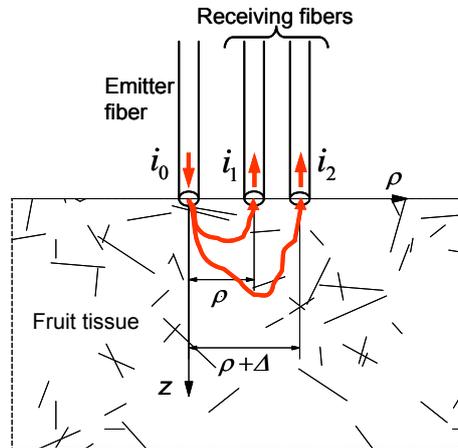


図 4.2-1 TFDRS 法による相対反射率の測定方法

果実を一様な散乱体でモデル化すると、(4.2.2)式で表される相対吸光度比 γ は検出距離 ρ が $\rho^2 \gg 1/\mu_s^2$ を満たす条件では距離 ρ 、 Δ に依存しない下記式で近似される。相対吸光度比が糖度と非常に良い直線相関を示すことから、相対吸光度比を用いた高精度な糖度推定が可能となる。

$$\gamma(\lambda_0, \lambda_1, \lambda_2) \cong \frac{\alpha(\lambda_2)\mu_a(\lambda_2) - \alpha(\lambda_0)\mu_a(\lambda_0)}{\alpha(\lambda_1)\mu_a(\lambda_1) - \alpha(\lambda_0)\mu_a(\lambda_0)} \quad (4.2.2)$$

4.2.3. 携帯型糖度計 (型式「N-1」)

(1) 携帯型糖度計

図 4.2.2 は新方式の非破壊計測技術 (TFDRS 法) をベースに商品化に成功した携帯型糖度計を示す。本装置では、光源に近赤外領域の発光ダイオードを使用し、重量 200g (電池重量含む) と世界最軽量を実現している。また、TFDRS 法を用いることで、これまでの品種毎や収穫時期に応じた検量線の更新作業が不要となった他、太陽光などの影響を補正する外乱光補正技術を搭載することで、屋外での使用が可能となった。



図 4.2-2 商品化した携帯型糖度計

(2) 携帯型糖度計の操作方法

携帯型糖度計の外観と各部の名称を図4.2-3(a) (液晶表示部側)、図4.2-3(b) (光照射部側) に示す。

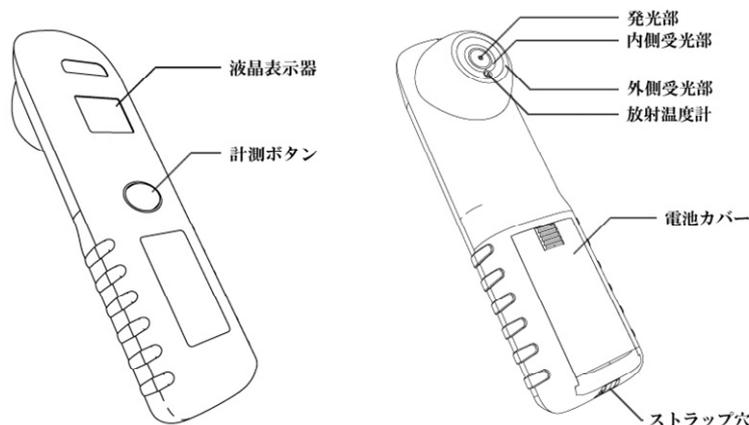


図 4.2-3(a) 液晶表示側

図 4.2-3(b) 光照射部側

計測ヘッドを果実にあて、計測ボタンを約2秒押す。計測開始で『ピッ!』、計測終了で『ピピッ!』というブザーが鳴り結果を表示する。このとき、図4.2-4(a)の様に果実の表面に対して真っ直ぐに計測部を合わせる。図4.2-4(b)、図4.2-4(c)の様な測定では、測定誤差が大きくなる。その他、下記注意事項に従い測定を行う。

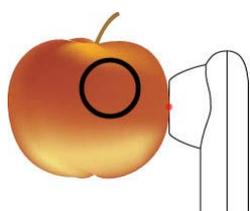


図 4.2-4(a)

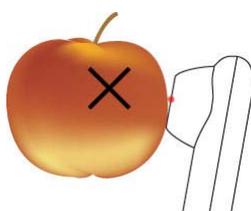


図 4.2-4(b)

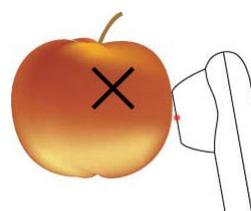


図 4.2-4(c)

※注意事項

- ① 計測ヘッドの中心部が果実に密着してない場合、誤差が大きくなる。
- ② 計測終了ブザー (『ピピッ!』) の前にボタンから指を離すと計測は中断する。
- ③ 冷蔵庫から出した直後の果実は、表面と内部で温度の差が大きいため誤差が大きくなる。果実は周囲温度に馴染ませた状態で計測を行う。りんご程度の大きさ (直径80 mm ~ 90 mm) の果実であれば、3時間程度室温に馴染ませることで、表皮から深さ20 mm程度までの温度差がなくなる。
- ④ 糖度計本体を周囲温度が大きく異なる環境に移動した直後の計測は、誤差が大きくなるので、糖度計本体を30分程度周囲温度に馴染ませる。
- ⑤ 汚れや温度変化によって誤差が生じるため、測定部にはなるべく触れないようにする。

(3) 測定糖度値のオフセット設定方法

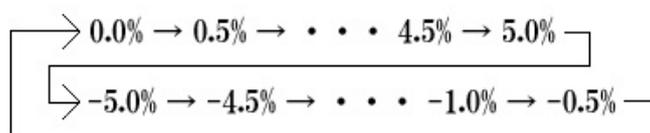
計測糖度のずれを修正するためにオフセット設定モードがある。出荷調整時を基準として

±5.0%の範囲で、0.5%単位で設定可能となっており、詳細な設定方法は以下の通り。

※オフセットの設定方法

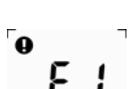
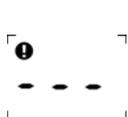
① 計測ボタンを約10秒間押し続けると、『ピピピッ!』とブザーが鳴りオフセット設定モードに入る。

② 計測ボタンを1回押す毎に次のように変化する。



③ 設定したいオフセット値を表示させた状態で計測ボタンを約10秒間押し続けると『ピーー!』と長いブザーが鳴り設定変更を知らせる。設定を変更しない場合は、計測ボタンに触れずに約20秒放置することで電源が切れ、通常の計測モードへ戻る。

(4) 測定時エラーの種類とその内容

-  電池電圧低下。点滅は電池切れの予告、点灯で電池切れ。
この場合には電池を交換する。
-  センサー飽和。明るすぎる環境で発生する。
この場合にはなるべく直射日光を避ける。
-  AGC飽和エラー。このエラーはヘッドと測定対象間の浮き等により、明るすぎる場合に生じる。
-  LED切れ、及び受光量不足時のエラー。
このエラーは対象物がない場合にも表示される。
-  同期ノイズエラー。このエラーは計測光と同じ周波数の妨害光（蛍光灯等）を検出した場合に発生する。
-  無効計測エラー。このエラーはヘッド浮きや測定中の装置ブレなどが原因。

(5) 電池の交換

下図の様に、電池蓋を外し、単三電池のプラス極とマイナス極を間違えないようにセットする。

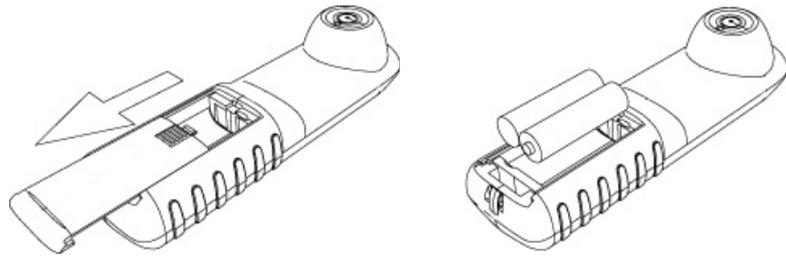


図 4.2-5 電池交換方法

(6) 対応品種の確認

測定モードの時に測定ボタンを押すと、「01」という様な、果物のマークと数字が表示される。これは使用している携帯型糖度計が対応している果物の品種番号を示し、その数字は表4.2-1の測定対象の果実と対応している。

表 4.2-1 表示番号と測定対象果実の対応表

01	02	03	04	05
りんご	マンゴー	もも	なし	かき

(7) 携帯型糖度計による測定実施例

携帯型糖度計による果実糖度の測定結果を図4.2-6(a) (りんご)、図4.2-6(b) (柿) に示す。

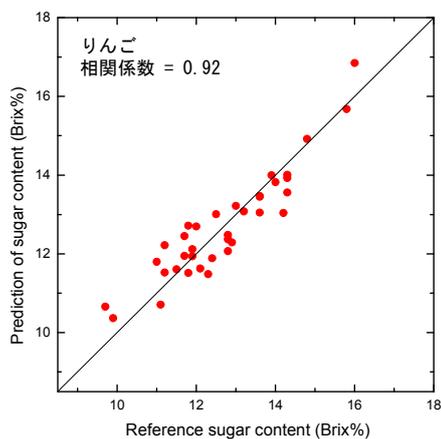


図4.2-6(a) 測定結果 (りんご)

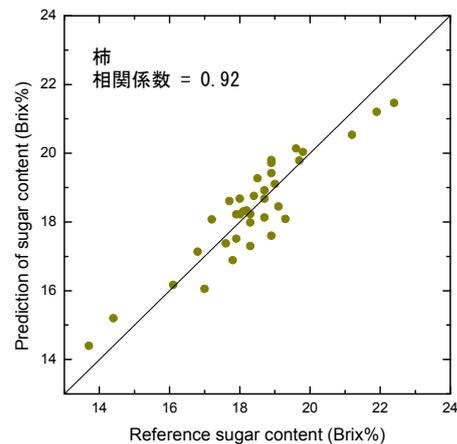


図4.2-6(b) 測定結果 (柿)

4.2.4. おわりに

光散乱による光路長変化の影響を受けない新方式の非破壊計測技術 (TFDRS : Three-Fiber-based Diffuse Reflectance Spectroscopy) を開発し、本計測技術を応用することで、①果実の品種や収穫時期の違いによる検量線の更新作業が不要、②光源の発光ダイオード化による従来コスト比 1/10 以下で掌サイズ等の特徴を有する携帯型糖度計の商品化

を行って、計測事例を含む詳細な使用方法をマニュアルとしてまとめた。

ここで提案した TFDRS 法は光を強く散乱する散乱体中の成分分析において光路長の変化による影響を受けない大きな利点を有している。今後は、果実をはじめ、他の食品の品質計測から生体医療診断へと TFDRS 法の応用展開が想定される。

参考文献

4.1. の参考文献

- 1) 野並浩, 2001. 植物水分生理学, pp. 236–257.
- 2) 本郷千春, 他, 1998. 分光反射率からみた樹木の水ストレス反応, 写真測量とリモートセンシング, 37(4), pp. 43–50.
- 3) 西田顕郎, 他, 2000. 樹木単葉の分光反射率特性と光合成速度および水分欠乏との関係, 日本リモートセンシング学会誌, 20(3), pp. 6–16.
- 4) 兵頭竜二, 他, 2004. 果実育成期間に水分ストレスを与えられたウンシュウミカンの緑葉分光特性とその果実糖度との関係, 写真測量とリモートセンシング, 43(5), pp. 24–35.
- 5) Ryuji Hyodo, et al., 2005. Practical Use to Satsuma Mandarin Cultivation of the Red Edge Wavelength of Leaves, ACRS2005.
- 6) 兵頭竜二, 他, 非破壊検査手法を取り入れた農作物の高品質栽培技術の確立, 公設試連携プロジェクト平成17年度終了課題研究報告書, 長崎県科学技術振興局 (非公開).
- 7) 兵頭竜二, 2008. LED光源で計測した緑葉反射率による樹木水分ストレスの推定, 日本写真測量学会平成20年度秋季学術講演会発表論文集, pp. 103–106.
- 8) 兵頭竜二, 2009. 簡易型樹木水分ストレス計の試作開発, 日本写真測量学会平成21年度年次学術講演会発表論文集, pp. 119–122.

4.2. の参考文献

- 1) 尾崎幸洋、河田聡編：“近赤外分光法”日本分光学会測定法シリーズ32、学会出版センター、東京(1996)。
- 2) 下村義昭、岡田龍雄：“3波長の近赤外半導体レーザーを用いた果実糖度の非破壊計測手法の開発”、レーザー研究、33、9 (2005) 620。

5. ミリ波による非破壊型糖度計等のマニュアル（平成21年度）

宮崎県工業技術センター

5.1. はじめに

現在の私たちの身の回りにおいては、電波を活用した製品があふれている。電波がなければ現在の快適な生活は成り立たなくなっている。電波の利用状況については、2つの分野に大別できる。

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

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

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

- ・携帯電話等で使われているマイクロ波と比較した場合、
 - ① 小型・軽量のシステムを実現できる。
 - ② 周波数帯域が広いため、多くの情報を扱える。
 - ③ センシングに用いた場合に高分解能が得られる。
- ・可視光線あるいは赤外線と比較した場合、
 - ④ 表皮効果が深いので被測定物の内部情報が得られる。
 - ⑤ 塵・ほこりなどに対する耐環境性に優れる。

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

ミリ波を使った非破壊検査方式には、被測定物が熱エネルギーとして放射するインコヒーレントなミリ波を受信するパッシブ方式と、発振器を使ってコヒーレントな電波を被測定物に照射し、反射や透過した電波を受信するアクティブ方式とがある。

当センターでは、パッシブ方式のミリ波計測装置を使った果実糖度計の開発と、果実以外の農林畜産物等の品質判定への応用展開を図るためのアクティブ方式非破壊検査方法の開発を進めており、今回、測定のためのマニュアル作成を行った。

5.2. パッシブ方式非破壊型糖度計

5.2.1. 概要

出荷する果実の品質を高めブランド化を図るには、信頼性が高く、コンパクトで使いやすい検査装置が必要である。検査項目のなかでも特に糖度は、果実のおいしさを評価するうえで、最も重要な項目の一つである。糖度検査のために、従来はサンプルを抜き取り、果汁を

搾って、光屈折式糖度計により判定する方式が採られてきた。この方式には、化学分析のような前処理が不要であるために簡単に測定できる、分析者の技量に左右されない、同時に数項目の品質測定が可能であるなどのメリットがある。しかし、この方式は破壊検査であり全数検査ができないために、選別の際に規格外の果物が含まれてしまうことが問題となっている。このような理由で、果実の糖度を非破壊で測定するための研究が進められており、実用化も進んでいる[1], [2].

果実糖度の非破壊測定装置が広く普及すれば、全数検査が可能になり、例えばベルトコンベアーを使った糖度による自動選別を行えるようになる。また、携帯型であれば、生育中の検査が可能になり現場での生育管理や収穫時期の判定に用いることができる、小売り店で利用することにより他の小売り店との差別化をはかることができるなどの幅広い利用が考えられる。

現在一般的に行われている光センサーを用いた果実糖度の非破壊測定では、光を果実に照射し、果実の中で乱反射した後に出てきた光を分析して内部の情報を推定している。現在、分析に使用される光は、物質を通過する力のある赤外線のうち可視光線に近い近赤外線である。しかし、透過してくる光の中から指標となる波長を取り出すには、高価な分光器が必要であり、装置構成が複雑なものとなる。このため、メーカー数社から販売されている光センサーを利用した果実糖度の非破壊測定装置は非常に高額である、外からの光に影響されるため暗幕で覆うことが必要である、近赤外線の透過率の低さから皮の厚い果実の場合では測定精度が悪くなるなどの問題がある。

一方、マイクロ波などの電波を測定に応用するような研究はいまだなされていない。それは主に、マイクロ波は波長が長いために指向性が悪く、装置の小型化が実現できないためである。これに対して、ミリ波は、光とマイクロ波の中間の性質を有し、光のような直進性とマイクロ波に近い物質の透過性を持っている。また、装置の小型化・軽量化が期待されるなど、数々の優れた特長を持っている。さらに、近年ミリ波帯における素子・回路技術の発達とともに、ミリ波を用いた装置が多く開発され、低価格化も進んできた。本マニュアルは、ミリ波を使った果実糖度の非破壊測定法の開発を目的としている。

電波を利用する測定方式には、大きく分けてアクティブ方式とパッシブ方式の2種類がある。アクティブ方式は、発振器からの電波を物体に照射し、その反射波や散乱波を受信する方式である。一方、パッシブ方式は、物体が自ら放射する熱放射（熱雑音）を受信する方式であり、発振器を必要としないなどの特長を有する。しかし、測定信号が微弱なために、低雑音、高利得、広帯域のシステムが要求される。著者らは、パッシブ方式測定装置であるミリ波放射計の非破壊測定装置への応用を検討してきた。

本マニュアルでは、果実糖度の非破壊測定を実現するための、Ka 帯（周波数 26.5-40 GHz）ミリ波放射計およびミリ波パッシブ測定の原理、これを用いた果実糖度の測定方法について記述する。

5.2.2. 基本原理

一般に熱放射の電力は、等価な電力を放射する黒体の温度（輝度温度 T_{obj} ）を用いて表され

る。電力 P と輝度温度 T_{obj} の間には次式の関係がある。

$$P = kT_{obj}B \quad (1)$$

ここで、 k はボルツマン定数 ($1.38 \cdot 10^{-23}$ J/K)、 B は帯域幅 (Hz) を表す。

また、輝度温度 T_{obj} は理想的な黒体 (放射率 ε が 1 の物体) であれば物理的な温度 \bar{T}_{obj} と一致するが、通常 T_{obj} と \bar{T}_{obj} の関係は、

$$T_{obj} = \varepsilon \bar{T}_{obj} \quad (2)$$

と表され、放射率 ε によって輝度温度 T_{obj} が決まる。

Brix%とも呼称される果実の糖度は、ショ糖が対象に含まれる重量パーセント濃度である。多くの果実は若い時期にデンプンを蓄積するが、果実が成長するにしたがいデンプンは糖へと分解され甘くなる。

ミリ波放射計を用いて果実の糖度を測定する場合には、果実に含まれる糖の含有率によって放射率 ε が異なることが必要である。そこで、ミリ波放射計による果実糖度の非破壊測定の可能性を検証するために、ショ糖水溶液濃度と放射率 ε の間に相関があるかを調べた。放射率 ε は誘電率から求めることが可能であるので、はじめに濃度の異なるショ糖水溶液の誘電率を測定した。

放射率 ε は、物体の複素誘電率 (誘電率 ε' と誘電損失 ε'') を用いると、

$$\varepsilon = 1 - \frac{\left| \frac{1 - \sqrt{\varepsilon' - j\varepsilon''}}{1 + \sqrt{\varepsilon' - j\varepsilon''}} \right|^2}{\quad} \quad (3)$$

で表わすことができる [3]。

ショ糖水溶液の複素誘電率は、開放終端同軸プローブを用い、500MHz～50GHz における複素反射係数をネットワークアナライザで測定することにより求めた。ネットワークアナライザには Agilent Technologies 社製 8361A を、同軸プローブには Agilent Technologies 社製 85070A スリムプローブを使用した。被測定用として、0%、5%、10%、15% のショ糖水溶液を調製した。誘電率には温度依存性があるため、恒温水槽を用いてすべてのサンプルが 20°C になるようにした。

図 5.1 に複素誘電率の測定結果を、図 5.2 にそれを用いて計算した放射率 ε を示す。図 5.2 の第 2Y 軸には液温 20°C (293K) のときの輝度温度に換算した場合の目盛りを表示した。

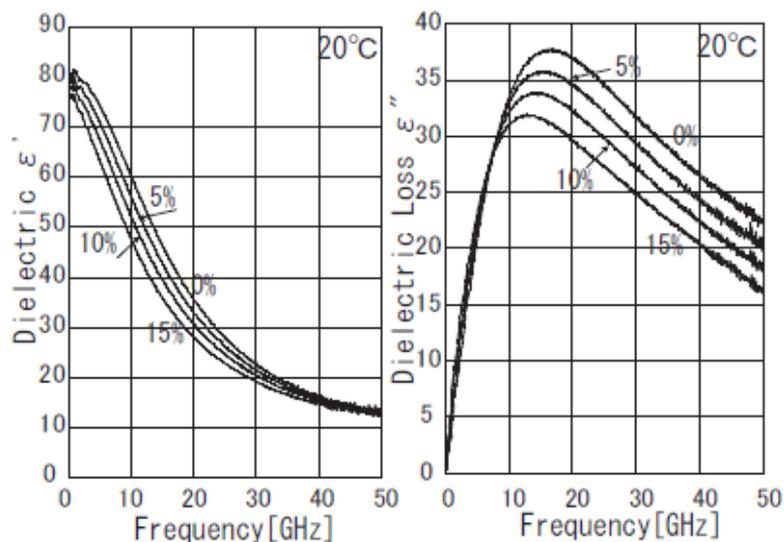


図5.1 20°Cにおけるシヨ糖水溶液の複素誘電率

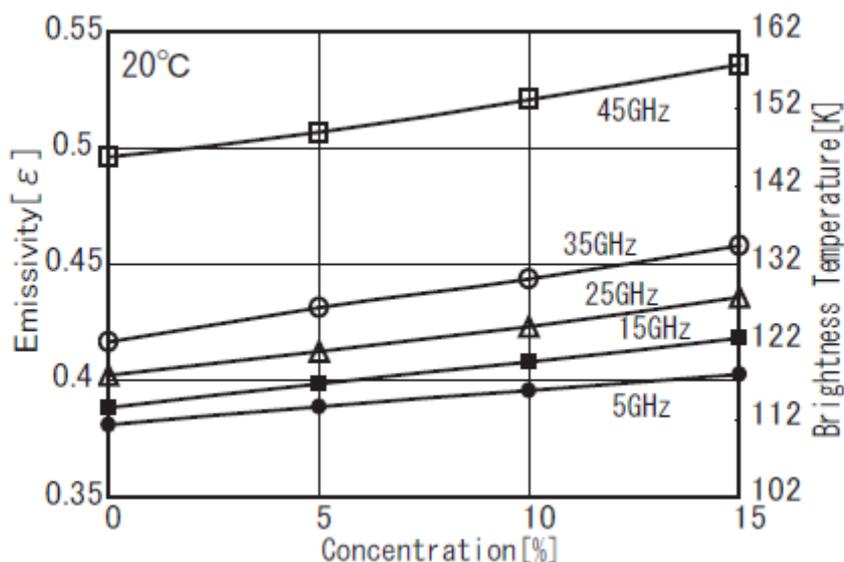


図5.2 20°Cにおけるシヨ糖水溶液の放射率

図 5.2 から、シヨ糖水溶液の濃度が高くなると放射率 ϵ は高くなり、放射計により測定した場合の受信強度は強くなると考えられる。また、図 5.2 に示した測定周波数範囲にわたって直線性があり、傾きをとるとシヨ糖水溶液の濃度変化に対する放射率 ϵ の変化は、周波数が Ka 帯のときに最も大きくなっていることから、製作する放射計の周波数帯域は Ka 帯が適していると考えられる。

さらに、図 5.3 に放射率 ϵ の温度依存性を調べるために温度を変えた場合の誘電率を測定し、それから放射率 ϵ を求めた結果を示す。グラフは 35GHz における結果である。実線は各濃度の放射率 ϵ の温度依存性を一次式で近似したものである。放射率 ϵ は、温度上昇とともに小さくなる傾向を示している。しかし、シヨ糖水溶液の濃度が高くなるにつれて、放射率 ϵ

が高くなるという相関には変わりがない。

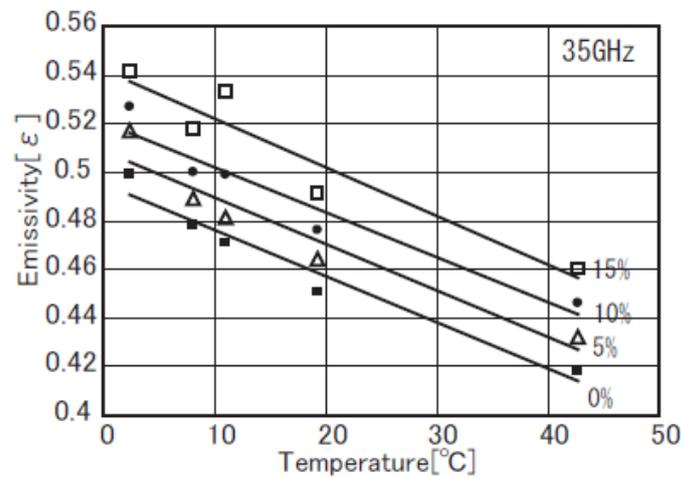


図5.3 ショ糖水溶液の放射率温度依存性

5.2.3. 測定装置の構成

本測定では、いくつかの種類がある放射計の中のディック型放射計を製作し実験に使用した。図5.4にブロック図を示す。

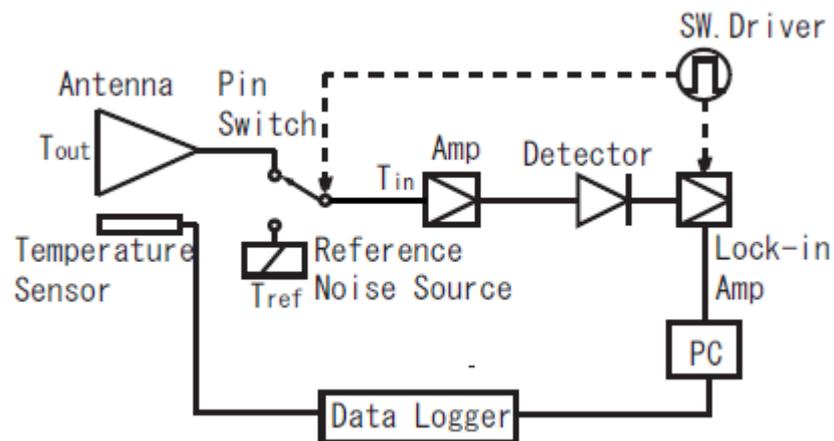


図5.4 ディック型放射計のブロック図

本装置は、入力部にスイッチを用いて、測定信号と比較用参照信号とを交互に切り替え、両者の差を出力として取り出すものである。この方法には、増幅器利得のドリフトをキャンセルできるという特長があるために、全電力型放射計に比べ、小さな信号を検出することに適している。また、雑音成分の直流出力が出てこないために全電力型放射計のように補正電

圧を加える必要がないという特長がある[4].

なお、図 5.4 でのロックインアンプは、低域での狭帯域フィルタの役割を持っており、今回の測定では時定数を 100ms に設定した。また、切り替え信号には、1kHz を使用した。ロックインアンプには (株) エヌエフ回路設計ブロック社製 LI5640 を使用した。

受信器の温度分解能は、増幅器で発生する雑音による影響を大きく受けるために、増幅器用の MMIC (モノリシックマイクロ波集積回路) には、NF (雑音指数) の低い MMIC (ユーディナデバイス社製 FMM5704X) を用いた[5]。表 1 に実験に使用したディック型放射計 (トキメック社製) の主な仕様を示す。なお、アンテナには利得 11.4dB の円錐ホーンアンテナを用いている。

表1. トキメック社製ディック型放射計の仕様

Frequency range	35±5GHz
Small signal gain	40dB
Small signal gain flatness	±3dB typ
Noise figure	3dB typ
Low-level sensitivity	>0.5mV/μW
Operating temperature	0 to +55 °C
Bias voltage and current	3.3V± 5% 150mA

次に、本放射計の温度分解能の評価を行った。温度分解能の定義は測定系によって区別できる最小の輝度温度変化であるが、これを実験で求めるために次のような方法を用いた。THOMAS KEATING LTD. 製 RAM (Radar Absorbing Material) を液体窒素で冷却し、その後空中に放置し、RAM の温度変化に対する受信電圧の変化を測定して、その傾きを温度感度 S とする。つぎに常温の RAM を長時間測定したときの受信電圧の変動幅を W とする。この変動幅 W は増幅器の雑音指数に依存するもので、平均値を中心とした正規分布に従うものとする。そこで、経時変化の標準偏差 σ をとり、信頼区間を 2σ として変動幅 W を定義する。このとき、温度分解能は、 $\Delta T = W / S$ となる。この性能が果実糖度測定時の糖度分解能に影響する。

図 5.5 に上記した方法で温度感度と受信電圧変動を測定した結果の例を示す。

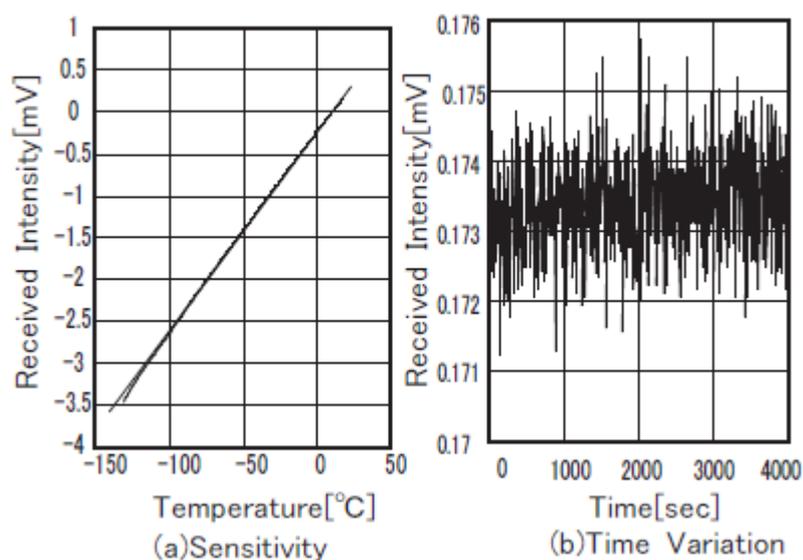


図 5.5 放射計の温度分解能

感度の測定値に対する近似直線の式は $V = 0.024T + 0.24$ であり，一方変動幅 W は 0.0013 [mV] なので，温度分解能は 0.055 [K] となる。

5.2.4. 測定方法

ミリ波放射計は，物体が放射する熱雑音（ホワイトノイズ）のうちミリ波帯をアンテナで受信する．アンテナで受信する熱雑音は，被測定物が放射する成分だけではない．図 5.6 にその様子を示す．

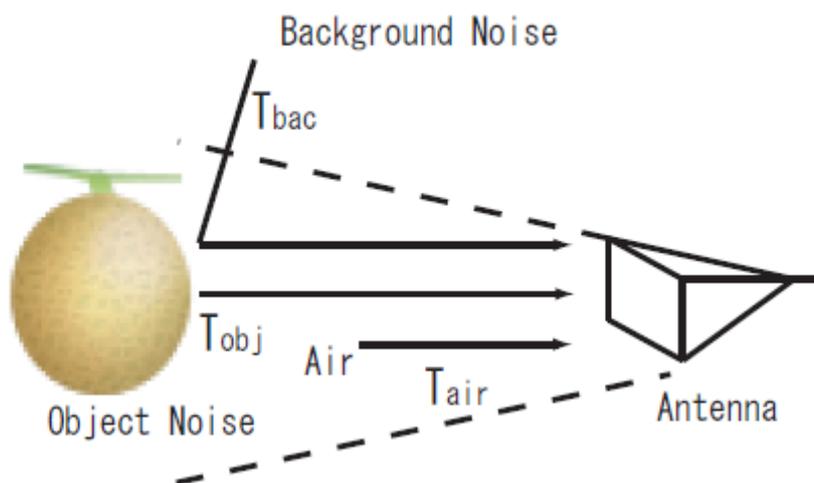


図5.6 アンテナに入る熱雑音

被測定物体が放射する熱雑音 T_{obj} および物体が反射した周辺物体からの熱雑音である背景

雑音 T_{bac} がアンテナに到達する熱雑音（見かけの輝度温度） T'_{obj} である．さらに物体とアンテナの間の大気の熱雑音 T_{air} もこれに加わるが，本測定の場合，近距離における果実の糖度測定を目的としているため，この項は省略する．物体の反射率を r とすると，測定される熱雑音 T'_{obj} は，背景放射が反射された rT_{bac} と物体の放射する熱雑音 $\varepsilon\bar{T}_{obj}$ の和で表され，

$$\begin{aligned} T'_{obj} &= rT_{bac} + \varepsilon\bar{T}_{obj} \\ &= (1-\varepsilon)T_{bac} + \varepsilon\bar{T}_{obj} \end{aligned} \quad (4)$$

となる．ここで，物体の反射率 r ，透過率 t ，放射率 ε の間には，

$$1 = \varepsilon + r + t \quad (5)$$

の関係があるが，ここでは，被測定物体は波長と比較して十分に厚いので，透過率 $t=0$ とした．また，今回の測定は距離が短いので，大気中を伝搬する際の減衰はないものとする．

本放射計の動作確認を兼ね，放射率 ε の異なる物体を測定してみた．室温約 20°C の電波暗室（熱容量が大きい）すなわち背景雑音 T_{bac} が 293K の環境において，放射率 ε が 1 に近い電波吸収体と放射率 ε が 0 に近い金属板（アルミニウム）の熱雑音 T'_{obj} を測定した．図 5.7 に結果を示す．図で横軸はそれぞれの物体の（物理）温度であり，Metal1 の測定では，アンテナと物体との距離はフレネル領域より遠方，Metal2 の測定ではアンテナと物体をほぼ接触させた状態である．横軸は，アンテナを電波吸収体に接触させた場合の値で校正してある．

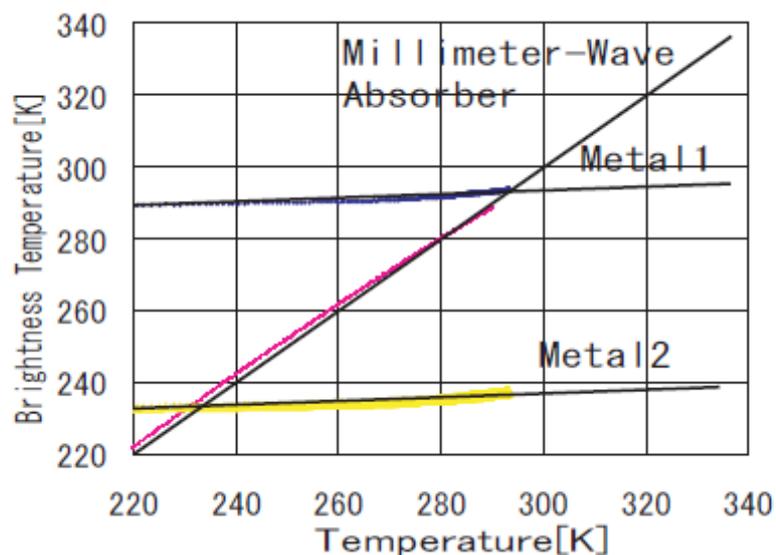


図5.7 試料温度と輝度温度の関係

図に示されているように、電波吸収体の場合には、熱雑音 T'_{obj} は自分自身の物理的な温度 \bar{T}_{obj} と等しく、また金属板のほうは、自分自身の温度はほとんど関係せずに、ほぼ背景雑音によって決まっていることがわかる。また、金属板を接触させた場合には、測定された熱雑音 T'_{obj} の大部分は放射計の雑音によるものと考えられる。

放射計で測定する場合、被測定物（果実）のみからの熱雑音を観測するためには、アンテナと果実の距離を短くするか、アンテナの指向性を鋭くする必要がある。筆者らは、実用性を考慮して放射計を果実に近づけ測定するスタイルを想定し、測定距離に対する条件を求めた。実験では被測定物とアンテナとの距離を 0.1mm ステップで変化させ、放射計の出力変化をプロットした。被測定物は 500mm×500mm のアルミ板と電波吸収体である。結果を図 5.8 に示す。電波吸収体を測定した結果が距離に対して一定であるのに対し、反射率の高いアルミ板を測定した場合には、測定値は距離に対して振動的に変化することがわかる。これは、被測定物とミリ波放射計の距離が近い状態、すなわちフレネル領域では、マルチパスによる干渉効果が現れるためと考えられる。これは、熱雑音はインコヒーレントではあるが、帯域が有限のためであると考えられ、実際 ピークの間隔は、増幅器の中心周波数である 35GHz の約半波長程度となっている。この結果から、果実の糖度測定に際しては、各々の果実とアンテナの距離を同じにするために、アンテナを果実に接触させて測定を行う必要があることがわかった。

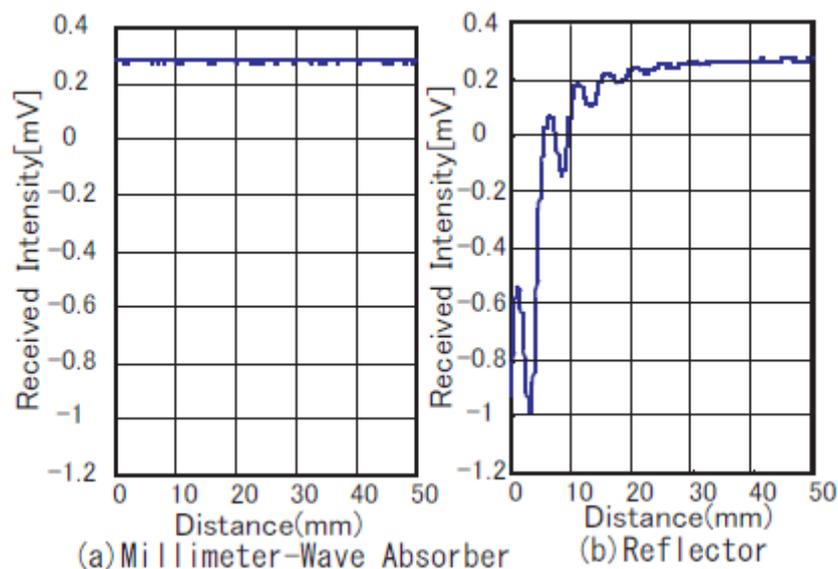


図5.8 測定距離による影響

5.2.5. 果物への適用例

以上の結果を踏まえ、実際の果実糖度測定の可能性について検証した。アンテナには、果実の接触測定に適していると考えられる金属導波管プローブを用いた。ミリ波強度は果実に含まれる糖の含有量によってだけでなく、果実の温度によっても異なる。このため果実温度により熱雑音測定値を補正する必要がある。

果実温度の影響を考慮するために、温度と熱雑音測定値より糖度を求めるための検量線の作成を行った。放射計の出力（熱雑音測定値） V は、果実の糖度 c と温度 T の関数となる。下記回帰式を仮定し、実際の果実を測定して求めた出力 V ，糖度 c および温度 T を使い、最小二乗法の修正マルコト法によりその係数を求める。

$$V = (a_0 \times c + a_1) \times (T - a_2) + a_3 \quad (6)$$

この場合、未知数 a_0 ， a_1 ， a_2 ， a_3 についての偏導関数は次のようになる[6]。

$$\left. \begin{aligned} \frac{dV}{da_0} &= c \times (T - a_2) \\ \frac{dV}{da_1} &= T - a_2 \\ \frac{dV}{da_2} &= -(a_0 \times c + a_1) \\ \frac{dV}{da_3} &= 1 \end{aligned} \right\} \quad (7)$$

果実のサンプルとして10個のりんご（サンふじ，青森産）を用い、検量線作成を行った。あらかじめ冷蔵庫で10℃程度まで冷やしておいた果実を室温におき、温度上昇していく過程を数分間記録した。測定結果を図5.9に示す。この結果をもとに回帰式(6)の係数を推定した結果、 $a_0 = 0.001496$ ， $a_1 = -0.01331$ ， $a_2 = 2.675$ ， $a_3 = -0.7034$ となった。

$$V = (0.001496c - 0.01331) \times (T - 2.675) - 0.7034 \quad (8)$$

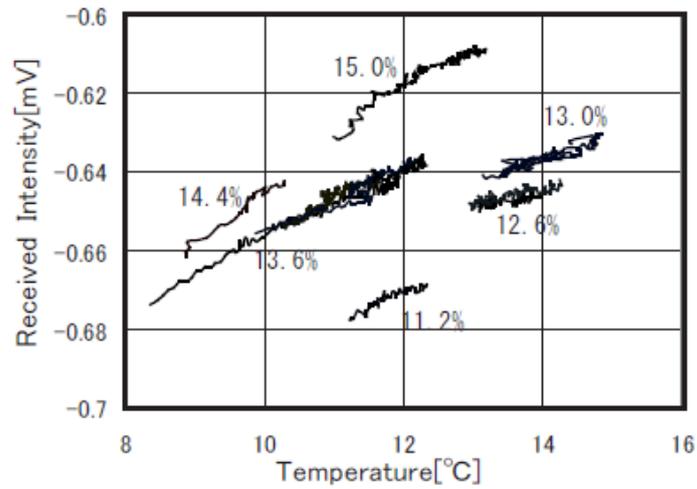


図5.9 検量線

作成した検量線を使って果実の糖度測定実験を行った. 図 5. 10 に糖度が未知のりんごについて, 放射計出力と温度測定結果から式 (8) を使って糖度を推定し, その後にデジタル糖度計で糖度を測定した結果を示す. 測定には 25 個のりんごを使用した. 解析の結果, 相関係数 $R=0.85$, 標準誤差 $SE=0.54$ であった. この結果は, 市販されている近赤外線方式非破壊糖度計の実力値と近いものである. 以上の結果から, ミリ波放射計によって果実の糖度測定が可能であることを確認できた.

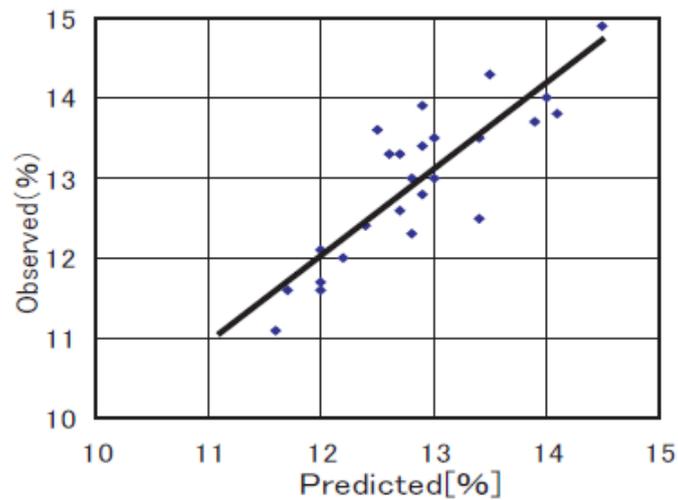


図5.10 りんごの糖度測定

5.3. アクティブ方式ミリ波計測装置

5.3.1 概要

宮崎県工業技術センターでは、アクティブ方式ミリ波計測装置として、ミリ波の中でも、特に Ka 帯 (26.5~40GHz) の電波を用いた機器の開発を行っている。

また、アクティブ方式ミリ波計測装置の中でも、発信側の装置と受信側の装置を測定試料を挟んで対向に置き、ミリ波を測定試料に照射し、測定試料を透過してきたミリ波を受信する透過型と、測定試料に対して、発信側の装置と受信側の装置が同一側にあり、ミリ波を測定試料に照射し、測定試料を反射してきたミリ波を受信する反射型の両方で検討を行っているが、今回、検討が進んでいる透過型について、マニュアル化を行った。

5.3.2 透過型・アクティブ方式ミリ波計測装置の構成

図 5.11 に、本計測装置の構成図、及び図 5.12 にブロック図を示す。

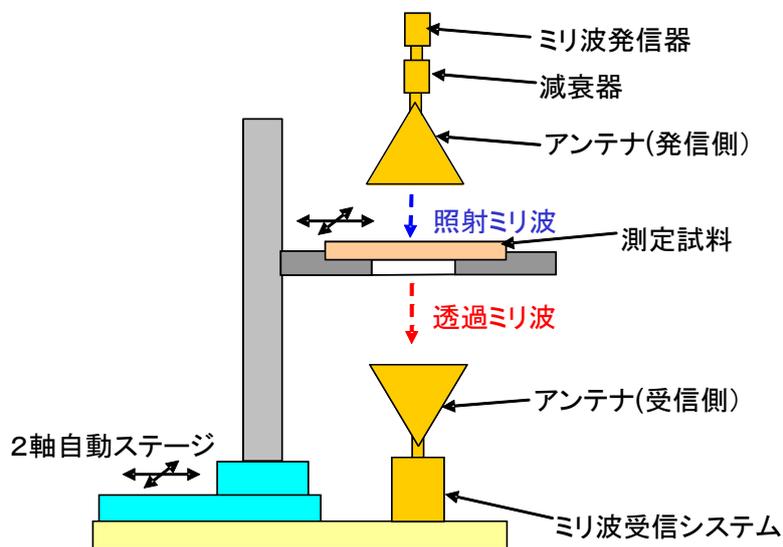


図 5.11 アクティブ方式ミリ波計測装置の構成

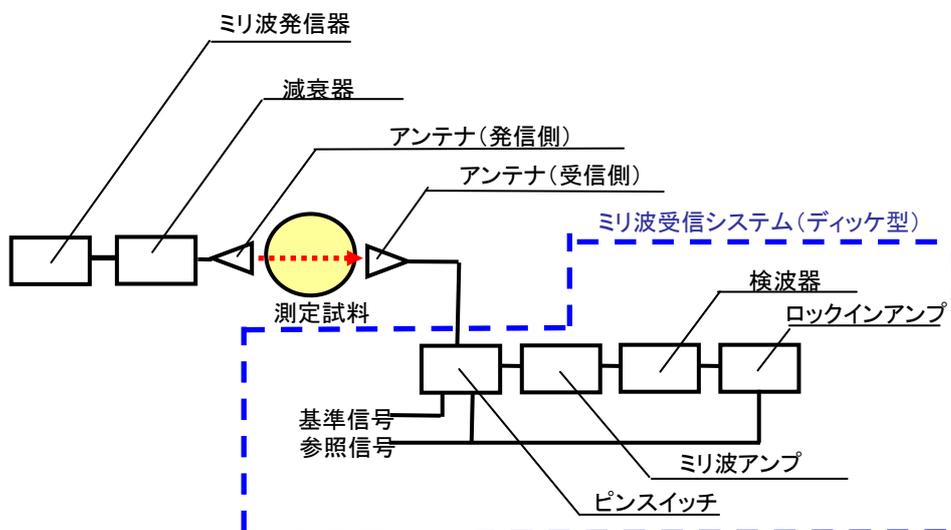


図 5.12 アクティブ方式ミリ波計測装置のブロック図

図 5.11 及び図 5.12 のように、発信器側の装置と受信器側の装置を測定試料を挟んで対向に置く。発信器側にはガンダイオードなどのミリ波発信器を置き、その発するミリ波をレンズアンテナを通して、測定試料に照射する。ミリ波発信器とレンズアンテナの間には、減衰率が最大-60dB の減衰器を挿入しており、測定対象物によって測定試料へ照射するミリ波強度を調整することが可能である。測定試料を透過してきたミリ波は、受信機側に配置したレンズアンテナを通して、受信される。さらにその受信したミリ波を、ミリ波受信システムに導波し、受信強度を測定する。アクティブ方式については、パッシブ方式と異なり、被測定物が放射する熱雑音より強度の高いミリ波を照射するため、測定信号が背景ノイズに埋もれることは少ないが、透過強度または透過強度の微妙な差を捉える必要がある場合があるため、パッシブ方式と同じくディック型の受信機を構成している。

さらに、2軸の自動ステージを用いて、測定試料に対して送・受信機の相対位置を2次元でスキャンしていく方式（以下、「イメージング測定方式」と呼ぶ。）により、可視化（イメージング）画像を得ることが可能である。また、自動ステージを用いずに、測定試料のある特定の箇所を選び透過率を測定する方式（以下、「ワンポイント測定方式」と呼ぶ）も可能である。

発信側及び受信側のレンズアンテナには、その先端に、片凸レンズ、両凸レンズなどが搭載できるようになっている。また、発信機としては、Ka 帯（26.5～40GHz）の電波を発するものを用いている。また、ディック型のミリ波受信システムは、発信機と同じく Ka 帯の電波に感度を持つミリ波アンプ、検波器などを搭載している。ミリ波アンプは、微小なミリ波でも測定できるよう、20dB のプリアンプ×三段で構成し、計 60dB のゲインを稼いでいる。

アンテナに備えるべきレンズは、イメージング測定方式については、イメージングの精度を上げるため、ミリ波を集束し、測定試料上のなるべく微小範囲に照射するためのレンズとして、図 5.13 の構成のように、発信側、受信側とも両凸レンズ（両面とも同じ曲率の双曲面）とした。

一方、ワンポイント測定方式については、なるべく広い面積での平均透過率とし、かつ、透過率等を正確に計るため、測定試料に対して垂直に照射できるよう、図 5.14 の構成のように、発信側及び受信側両方とも片凸レンズとした。（測定試料側が平型）

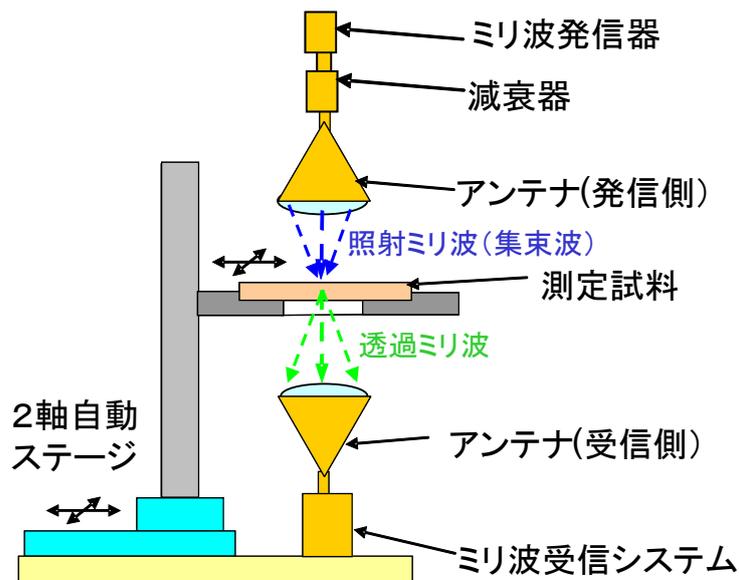


図 5.13 イメージング測定方式の構成（レンズは、発信側、受信側とも両凸レンズ）

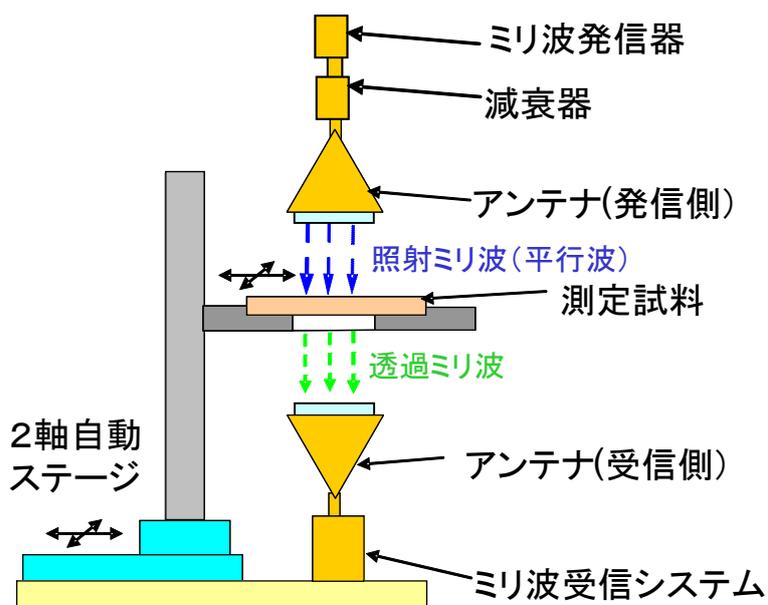


図 5.14 ワンポイント測定方式の構成（レンズは、発信側、受信側とも片凸レンズ）

5.3.3 受信システムのリニアリティの検証

本装置を用いて、ミリ波透過率を測定する場合には、測定試料がある場合とない場合とで、ミリ波受信強度の比を求める必要がある。そこで、ミリ波アンプ及び検波器を含めた受信システムのリニアリティ（受信システムに到達するミリ波に対して、受信され受信強度として出力される数値の直進性）について検証を行った。図 5.14 の構成のミリ波発信器と減衰器の間に別の減衰器（-25dB）を挿入した。これら 2 つの減衰器を合わせた減衰率を変化させることにより、発信側のレンズアンテナから放射されるミリ波の強度を変えながら、受信システムのミリ波受信強度を測定し、減衰率とミリ波受信強度との関係を求めた。測定結果を図 5.15 に示す。減衰器の減衰率が-40dB~-85dB の範囲である程度のリニアリティが確保されている

ことがわかる。減衰率が-40dB の場合と-85dB とで、強度比率で約 3.1×10^{-5} であるため、この程度の透過率（100 分率で 0.003%程度）は本装置で測定できることが分かった。

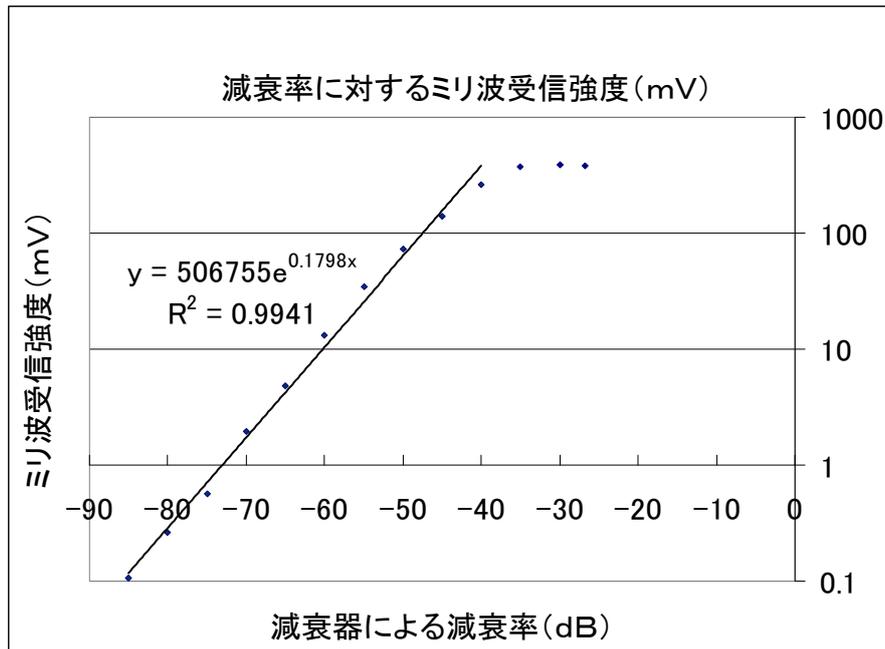


図 5.15 受信システムのリニアリティ測定結果

5.3.4 実施例

5.3.4.1 木材の非破壊検査の概要

アクティブミリ波計測装置の応用例として考えられるものの一つとして、木材の非破壊検査がある。木材は比較的空隙率が高いため、ミリ波帯の電波がある程度内部に浸透すると考えられる。

このようなミリ波を木材の非破壊検査として使用する場合のニーズとしては、主に以下のものが挙げられる。

- ① 材の内部及び表面の節の検出
- ② 外構材（公園遊具、ウッドテラス材など）や木造家屋内の柱等の劣化（空洞、腐朽）具合

5.3.4.2 木材の透過特性の測定

最初に、木材の非破壊検査に適用可能かどうかを調べるために、図 5.14 の構成によるワンポイント測定方式によって、木材のミリ波の透過特性を測定した。発信器はガンダイオード（中心周波数 35GHz）とし、減衰器の減衰率は約-40dB で固定とした。

木材は繊維方向（年輪方向）とそうでない方向とで、内部組織に異方性があるため、照射するミリ波の偏波方向と繊維方向との関係により、透過率が異なる可能性がある。ミリ波透過率は木材の厚み、密度によって変化すると考えられるため、すべて同じ厚み（48mm）で、密度に大きな差が無い（0.36~0.40g/cm³）杉の気乾材 13 枚を用意し、照射するミリ波の電場方向と繊維方向が平行な場合と垂直な場合とで、ミリ波透過率を比較した。結果を表 5.1 に示す。ミリ波の電場方向と平行な場合の方が、垂直の場合に比べて、透過率が格段に高く、

効率良く測定できることが分かる。したがって、本装置においては、測定はすべて、ミリ波の電場方向を繊維方向に平行に合わせることにした。

表 5.1 繊維方向とミリ波電場方向の違いによるミリ波透過率比較測定結果
(厚み 48mm、杉 13 枚の平均)

ミリ波透過率 ($T_{//}$) (木材繊維方向とミリ波電場方向とが平行)	ミリ波透過率 (T_{\perp}) (木材繊維方向とミリ波電場方向とが垂直)	透過率比 ($= T_{//} / T_{\perp}$)
4.3%	0.36%	11.9

次に、本装置による透過率の測定限界を探るため、あらゆる厚み、密度の木材について測定を行った。杉の気乾材で厚み 4 種 (15mm, 28mm, 48mm, 75mm) のものを計 88 枚用意し、ミリ波透過率を図 5.14 の構成により測定した。発信器はガンダイオード (中心周波数 35GHz) とし、減衰器の減衰率は約 -40dB で固定とした。同時に各木材の重量と体積を計測し、密度へ換算した。

測定は表面から見て、節が存在しないと思われる箇所を一箇所選び測定した。測定結果として、ミリ波透過率と材密度との関係を図 5.16 に示す。密度が低いほど、ミリ波透過率が高く、また、木材が厚いほど透過率が低いことがわかる。厚み 75mm の杉では、材の密度によって異なるが、一番密度の大きい材でも約 0.008% であり、測定可能範囲 (0.003% 以上) であることが判った。しかし、それ以上に厚いものの場合においては、材によっては、測定可能範囲 (0.003% 以上) を下回るものと予測されるため、透過率をワンポイント測定方式により測定する場合は、杉においては、この程度の厚みが限界であると考えられる。

しかし、本装置の受信機のリニアリティからすると限界であるが、減衰器の減衰率は -40dB 程度としており、減衰率を下げ、照射するミリ波の強度を最大で 40dB 程度は上げる (強度比率で約 10000 倍程度) ことが可能であるため、75mm 以上の厚みのものでも透過比率としての相対測定は可能である。たとえば、ワンポイント測定方式として、基準となる木材を用意し、基準木材と測定対象とする試料とのミリ波受信出力とを比較する、あるいは、同一木材内で、数ポイント比較測定を行うなどの利用方法としては可能である。なお、イメージング測定方式については、イメージング測定範囲内でのある種の比較測定と考えられるため、厚い木材でも測定可能である。

また、減衰器の減衰率は約 -40dB としているが、今回測定した 28mm の厚みの場合には、透過率は約 4%~40% であるため、減衰器及びミリ波アンプ (ゲイン 60dB) を無くしても、透過率約 0.04%~0.4% と換算できるため、この程度の厚み以下のもの限定で使用する場合は、減衰器及びミリ波アンプは不要となるものと考えられる。

以上のように、Ka 帯のミリ波を用いた本装置を用いて、木材の非破壊検査に十分利用できることが判った。

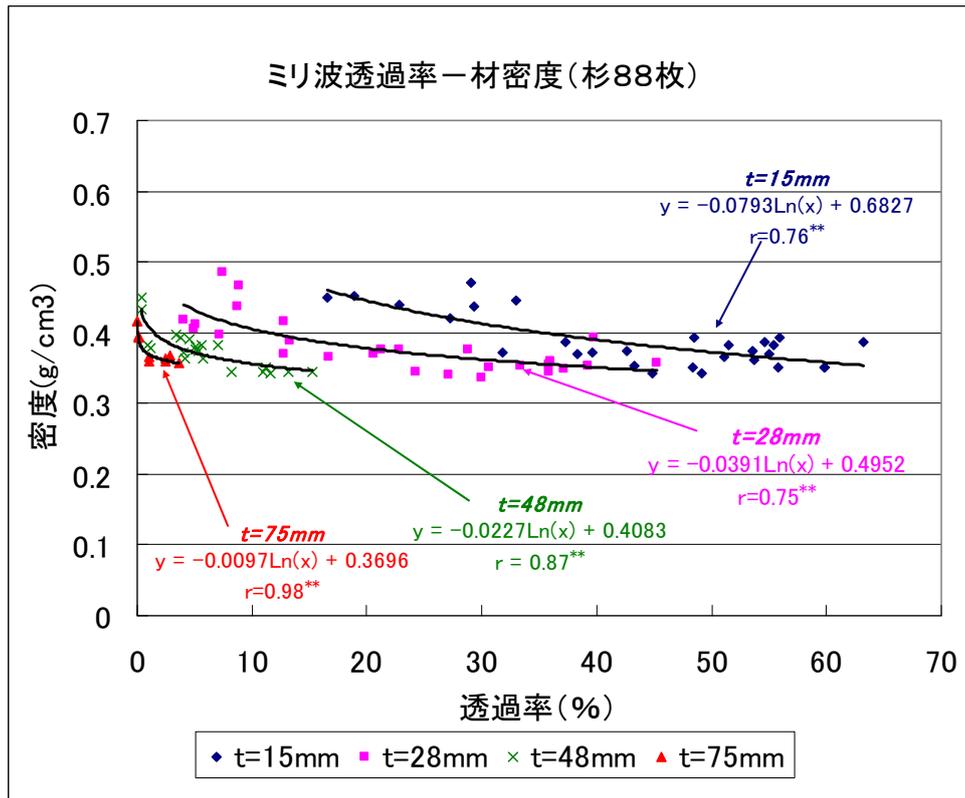


図 5.16 ミリ波透過率測定結果（材密度との関係、杉材）

5.3.4.3 イメージング測定方式による節のイメージング

木材中に節があると木材強度が下がるため、木材表面の節、さらに内部の節を検出することは重要である。

木材の節は節周辺と密度が異なるため、イメージング測定方式を用いることにより節部分の可視化画像として可視化できる可能性がある。

節がミリ波で検出可能かどうか、実験を行った。図 5.13 の構成により、厚み 28mm の杉の気乾材についてイメージング実験を行った。

この実験では、ミリ波発信器として中心周波数 35GHz のガンダイオードを用いた。また、発信側、受信側双方において、このレンズアンテナの焦点位置が測定試料の厚み方向に対して概ね中心となるように配置し、実験を行った。なお、測定試料をスキャンするピッチは 2.5mm とした。

結果を図 5.17 に示す。図中、白色が最も透過率が高く、黒色が最も透過率が低く、中間が赤色である。図によると、節と思われる透過率の低い領域が可視化できている。しかし、その領域の大きさは、実際の節よりかなり大きく検出された。これは、表側と裏側で節が斜めに入っており、その中間ならびに裏側の節までもが検出されたものと考えられる。

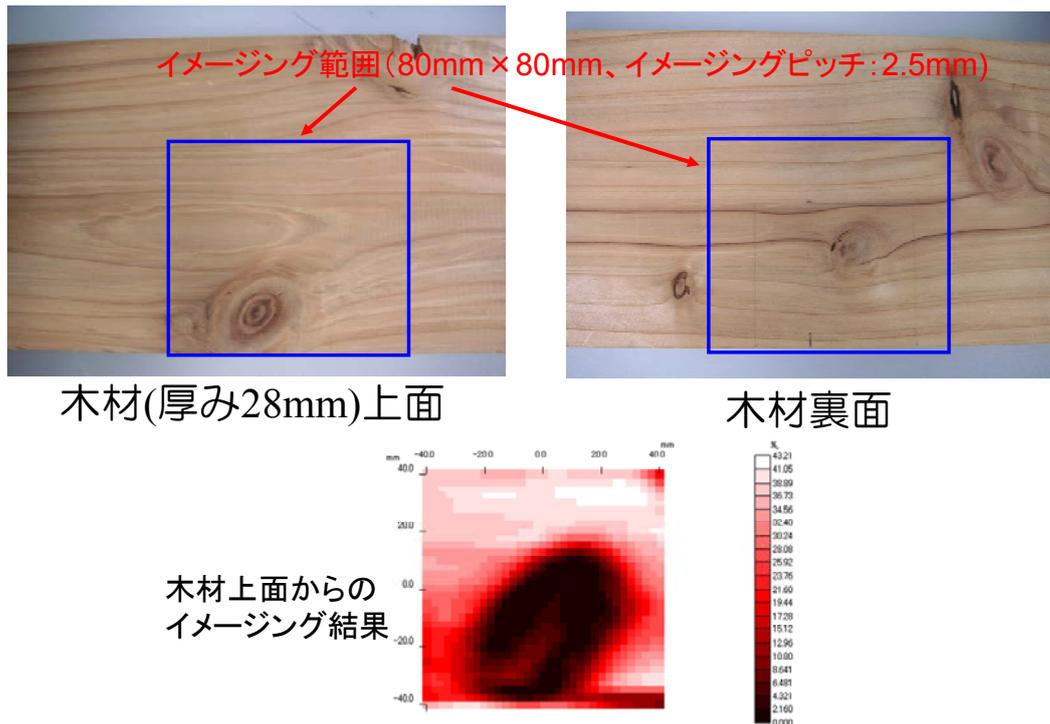


図 5.17 節のイメージング例

5.3.4.4 イメージング測定方式による空洞のイメージング

木材内の劣化（腐朽、シロアリの食害などによる空洞）部分の測定は、後述のワンポイント測定方式でも可能と思われるが、イメージング測定方式により可視化画像を得ることができれば、より精度良い検査ができるものと考えられる。

イメージング測定方式による木材空洞の可視化が可能かどうか確かめるために、図 5.13 の構成にて、イメージング実験を行った。厚み 48mm の杉の気乾材を用意し、側面からドリルで 30mm、20mm、10mm の穴を空け、上面からミリ波を当て、イメージングを行った。

この実験では、ミリ波発信器として中心周波数 35GHz のガンダイオードを用いた。また、発信側、受信側双方において、このレンズアンテナの焦点位置が測定試料の厚み方向に対して概ね中心となるように配置し、実験を行った。なお、測定試料をスキャンするピッチは 2.5mm とした。

結果を図 5.18 に示す。30mm 及び 20mm の穴を空けた個所については、穴と穴周辺部との境界に、透過率が低い領域（以下、「境界領域」と呼ぶ。）ができていのが分かる。この境界領域は、図中に見えている材端部でも現れている現象と同様なものとして、穴の側面で生じているものと思われる。なお、この境界領域は一定の幅を持っており、その幅の中心部分の左右の間隔がおおよそ穴の大きさに該当している。したがって、境界領域を観測すれば、穴形状・大きさが確認できるものと考えられる。

一方、10mm の穴については、30mm 及び 20mm の境界領域と同様な透過率が低い領域のみが現れている。したがって、30mm 及び 20mm の穴と異なり、左右の透過率の低い領域の部分の間隔は観測できない。しかし、当該境界領域の外枠の大きさは一定割合で増加しており、外枠の大きさを計測して、実際の穴径に換算する方法もある。

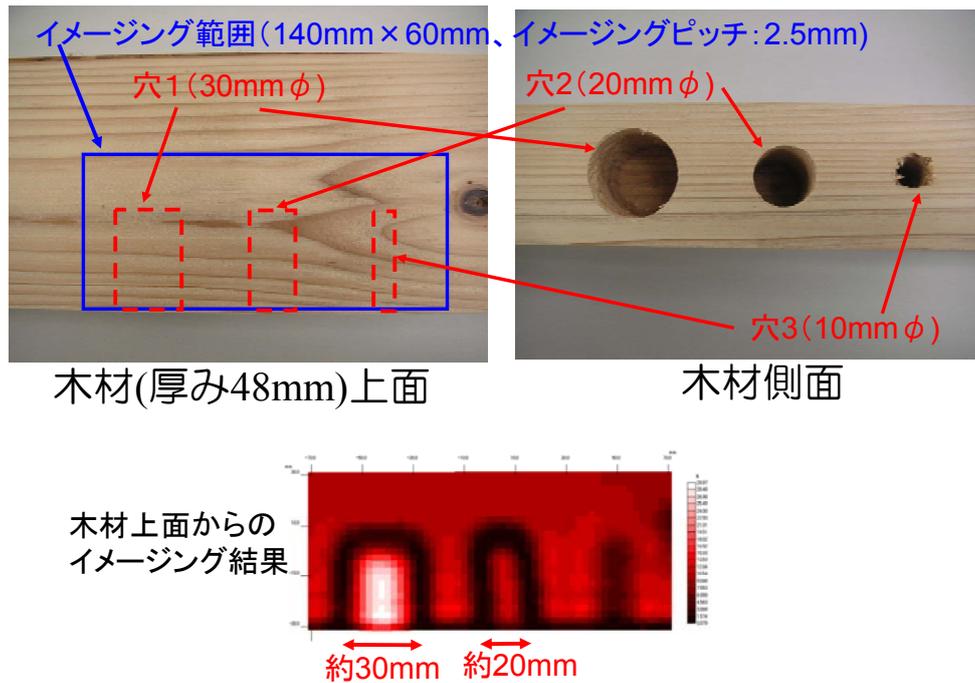


図 5.18 空洞のイメージング例

5.3.4.5 ワンポイント測定方式による木材の腐朽診断

外構材などの腐朽は、現状では、一次診断として目視や打音などで、腐朽が疑わしい個所を見つけ、その後、二次診断として、衝撃ピン打ち込み器を用いた破壊方式による診断が主に行われている。この二次診断についてミリ波を利用して、非破壊で診断できるようになれば、従来の破壊方式による木材強度劣化を防げるため、非常に有効である。

木材は腐朽が進むと、内部組織が破壊され密度が減少してくるため、ミリ波透過率が増加してくるものと予測される。

まず、腐朽材と健全材とで、ミリ波透過率の違いを図 5.14 の構成によるワンポイント測定方式により測定した。測定試料として、イペ材の気乾材で、厚み 48mm の腐朽材 7 枚と健全材 7 枚を用意し、測定を行った。図 5.19 に結果を示す。横軸がミリ波透過率で縦軸が材料の質量と体積から換算した材密度である。腐朽材 7 枚の密度平均が約 0.51g/cm^3 で、健全材 7 枚の密度平均が約 0.97g/cm^3 であった。一般的にイペ材の気乾密度は $0.8\sim 1.1\text{g/cm}^3$ とされており、腐朽材は密度が低くなっていることがわかる。これに対して、ミリ波透過率は腐朽材 7 枚の平均で約 2.4%、健全材 7 枚の平均が約 0.01% であり、腐れによる材の密度減少に応じて、ミリ波透過率が極端に上がっている。このことから、ミリ波透過率を測定すれば、材の腐朽程度がわかるのではないかと推測される。

したがって、健全材で考えられるミリ波透過率より、透過率が高い場合には、腐朽などの劣化があるのではないかと推定することが可能である。

そこで、再び杉のミリ波透過率について考える。前述のとおり、厚みによってミリ波透過率は変化する。そこで、図 5.16 で示したそれぞれの厚みのデータを対数近似した式から、予測される近似式として、次の式を用いて、最小二乗近似を行った。

$$d = (a_0 \cdot \ln(t) - a_1) \cdot \ln(v) + a_2 \cdot t^{-a_3}$$

ここで、 d :密度(g/cm^3)、 t :厚み(mm)、 v :ミリ波透過率(%)である。

計 88 枚の測定データから修正マルコード法を用いて、最小二乗フィッティングにより、係数 $a_0 \sim a_3$ の値を求めた。結果を図 5.20 に示す。近似式の精度としては、相関係数 0.77 で、有意水準 1% で有意であった。

たとえば、一次診断にて健全と思われる個所の密度を、当該経験式から推定し、次に腐朽が疑わしいと思われる個所の密度を当該経験式から推定、比較することにより、腐朽の程度が判定できると思われる。

また、経年劣化として、厚みとミリ波透過率から材の密度を推定し、同一個所において定期的にミリ波透過率を測定することにより、密度変化を求め、腐朽の程度を判定するような利用方法も可能である。

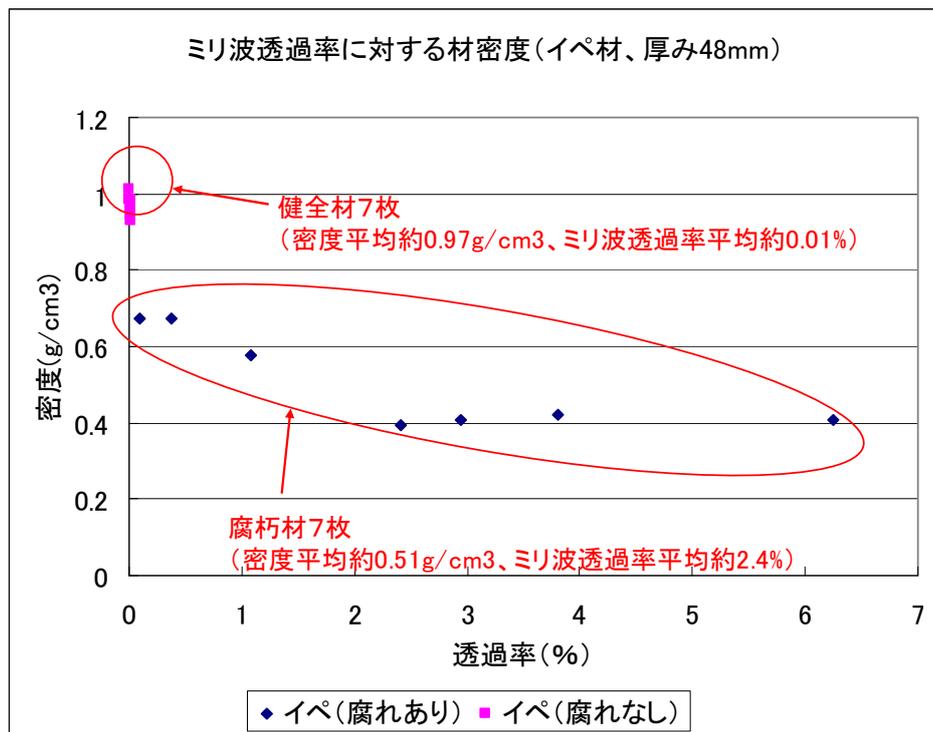


図 5.19 ミリ波透過率測定 (健全材と腐朽材比較、イペ材)

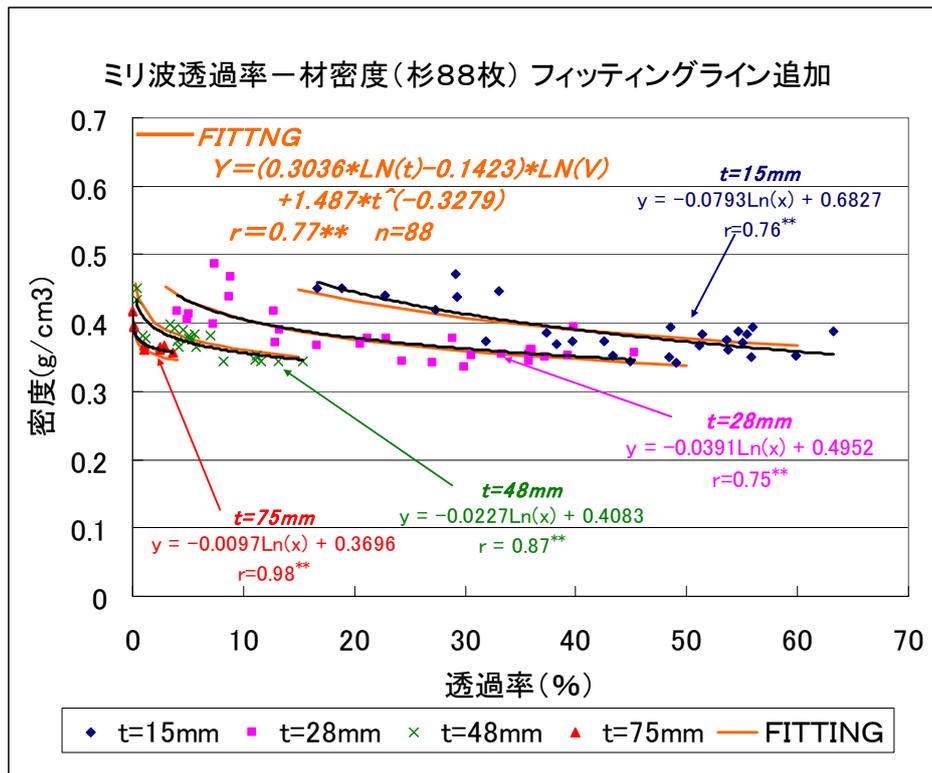


図 5.20 ミリ波透過率測定結果（材密度との関係、フィッティングライン追加、杉材）

5.4. おわりに

完全非侵襲のミリ波パッシブ測定（放射計）を果実の糖度測定に応用することを目的に、まず、ディック型ミリ波帯放射計を作製し、装置特性の測定・評価を行った。次に、本放射計を果実へ応用することに先だって、果実のモデルとしてショ糖溶液を用い、糖度と放射計出力との相関を確認した。最後に実物のりんごを測定対象にした検量線作成および糖度測定実験を実施した。これらの結果をミリ波放射計による糖度測定法のマニュアルとしてまとめた。

また、アクティブ方式ミリ波計測装置の木材の非破壊検査への適用について検討を行い、その可能性提示と具体的評価手法についてのマニュアルを作成した。

5.2.2. の参考文献

- [1] S.Kawano, H.Watanabe and M.Iwamoto, "Determination of Sugar Content in Intact Peaches by Near Infrared Spectroscopy with Fiber Optics in Interactance Mode" J. Japan Soc.Hort. Soc. 61(2), pp445-451, 1992.
- [2] S.Kawano, T.Fujiwara and M.Iwamoto, "Nondestructive Determination of Sugar Content in Satsuma Mandarin using Near Infrared(NIR) Transmittance" J. Japan Soc.Hort. Soc. 62(2), pp465-470, 1993.
- [3] 水野皓司, "ミリ波を用いたイメージング技術 -パッシブ・イメージングを中心に-", Microwave Workshop Digest, WS01-01, 2007.
- [4] 中野洋, 井上武海, 加藤吉彦, "マイクロ波雑音測定用トータルパワー型ラジオメータ",

電学論(C), vol. 120-C, No. 11, pp. 1609-1614, 2000.

[5] 水野皓司, “ミリ波を用いたイメージング”, 電子情報通信学会誌, vol. 191, No. 12, pp. 1047-1053, 2008.

[6] 中川 徹, 小柳義夫, 最小二乗法による実験データ解析, 伊理正夫他(編), 東京大学出版会, 東京, 1982.