蛍光指紋によるかび毒の簡易迅速計測法の開発

杉山純一*

(独)農研機構食品総合研究所食品工学研究領域計測情報工学ユニット (〒 305-8642 茨城県つくば市観音台 2-1-12)

要旨

従来の蛍光測定を発展させ、励起光の波長をスキャンさせて得られる数多くの蛍光スペクトルの集合体である蛍光指紋は、試料固有の膨大な光学特性が含まれている。これらの情報を、多変量解析を使うことにより、必要な情報を推定するモデルを作成することで、従来にはない感度で様々な判別・定量ができることが明らかになりつつある。この蛍光指紋を利用し、小麦のかび毒、アフラトキシンの迅速計測を試みた事例を紹介する。

キーワード：蛍光指紋、励起蛍光マトリクス、小麦かび毒、ナツメグ、アフラトキシン

(2013年8月12日受理)

1. 蛍光指紋とは

蛍光指紋の説明をする前に、まず既存の蛍光という現象を説明する。通常、蛍光とは、図1(左)に示すように、ある特定波長成分だけからなる光(励起光)を試料に照射し、それによって生じる様々な波長の光(蛍光スペクトル)のことを指す。日常では、蛍光灯の白色光は、蛍光管の内側から目に見えない紫外域の光が蛍光管内側に塗られた蛍光体に照射され、幅広い波長域を持った白色光を生じる蛍光現象である。そして、このような蛍光現象を利用して、さまざまな化学成分の判別・定量を行うのが蛍光分析法で、感度が通常の吸収分光法と比較して非常に高いのが特徴である。しかし、この場合は、刺激(特定の励起波長)が1種類、それに対する応答(蛍光スペクトル)が1本というひと組の刺激と応答の情報を解析することになる。しかしながら、情報は多ければ多いほど、その中に含まれる有用な情報が抽出できる可能性が高い。そこで、情報量を多くすることを考える。それには、刺激を複数にし(つまり、複数の励起波長を順次走査して照射)、それに対する応答(蛍光スペクトル)も複数本、得られれば、図1(右)のような3次元の膨大な情報が得られる。この3次元データを上から見れば、等高線図のようなパターンが観察される。このパターンは、その試料特有の蛍光特性が全て表現されたものと考えられ、蛍光指紋(Fluorescence Fingerprint)、または励起蛍光マトリクス(Excitation Emission Matrix)と呼ばれている。

さて、この蛍光指紋は、実際に測定するとなると、かなりの手間がかかる。我々が、7年ほど前にこの計測法に興味を持ち、たまたま隣の研究室にあった海外製の非常に高価な蛍光分光光度計に

連絡先

*〒 305-8642 茨城県つくば市観音台 2-1-12 (独)農研機構食品総合研究所食品工学研究領域計測情報工学ユニット

電話：029-838-8047. ファックス：029-839-1552. 電子メール：sugiyama@affrc.go.jp

カラーリプリントが本誌 WEB サイトよりダウンロードできます

図1 蛍光から蛍光指紋へ

その測定機能があることを知り、データの蓄積を始めた時は、1つの試料の測定に6時間かかっていた。励起側、蛍光側の双方をスキャンするため、仕方ないのであるが、データ蓄積が遅々として進まないもどかしさがあった。ところが、ある時、国内メーカーが世界最高速の蛍光分光光度計を開発したと聞き、わらをもすがる思いで、分析センターを訪問し、実機のデモを見せて頂いた。なんと、今まで6時間かかっていた測定が、わずか4分程度でできることに驚愕するとともに、一気に研究の進展を予感させるものであった。現在、当研究室では、2台の蛍光分光光度計 (F7000, 日立ハイテクノロジーズ) を導入し、食品分野への様々な応用を試みている。本稿では、その実例の一部を紹介する。

2. データ処理のパラダイム・シフト

従来の蛍光は主に輝度値がピークの情報のみを解析することが多かった。確かに単一の際立った蛍光成分が目的ならそれで済むが、最近のセンサ技術は飛躍的に向上し、目に見えるような強い光の情報だけでなく、僅かなエネルギー収支による様々な反応もデジタル量でとらえることができる。すなわち、蛍光スペクトル上の微小な凹凸、ショルダや、さらに蛍光のない低レベルでも拡大すればなんらかの情報が確認できる。そこで、解析対象を、ピークだけに限定せず、全ての領域を平等に取扱いながら、必要な情報のみをうまく抽出するモデルを構築すること、すなわちデータマイニングは、昨今のコンピュータ技術が得意とするところである。

さらに昨今の ICT (情報通信技術) の進展は、これまでの不可能を可能にする。近年、デジカメが普及し、解像度の高い写真が携帯電話でも撮れるようになった。また、写真が画素という小さな点の集まりであることは誰もが認識しつつある。この画素を上記の蛍光指紋の検出器として使えば、画素ごとに蛍光指紋を取得することも可能である。そして、画素毎にその特徴を判断し、色に置き換えれば、これまで見えなかったものも可視化することができる。これが、我々が世界初の技術として開発を進めている蛍光指紋イメージングである。

- ① 非蛍光成分除去: 励起波長(E_x) > 蛍光波長(E_m)
- ② 散乱光除去: 1次($\pm 30\text{nm}$), 2次($\pm 40\text{nm}$), 3次($\pm 40\text{nm}$)
- ③ 低感度領域の削除: 低波長励起 $E_x \leq 230[\text{nm}]$ 長波長蛍光 $E_m \geq 810[\text{nm}]$

図2 蛍光指紋データの前処理 (不要な波長域の削除)

3. 蛍光指紋の計測

測定された蛍光指紋の一例を、図2左に示す。この図では、X軸が蛍光波長、Y軸が励起波長として描かれている。対角にあたる45度の線上は、照射した励起光と観察する蛍光の波長が同じことを意味し、いわゆる散乱光(分光反射スペクトルがZ軸方向に観察される位置)である。この散乱光は、計測原理から、整数倍の位置(2次光, 3次光……)にも表れる。また、蛍光は、励起波長より必ず長い波長に表れるため(ストークスの法則)、前述の45度の対角線より蛍光波長軸側(図2の場合は対角線より下側)に描かれるパターンが蛍光指紋である。

従って、実際にデータ解析に用いる情報は、これらの不要な情報を削除し、残った情報のみを蛍光指紋として用いる必要がある。すなわち、①蛍光波長より大きい励起波長部分(対角線より励起波長寄りの部分)、②1次, 2次, 3次……の散乱光除去、③ノイズの多い低感度領域を削除することが必要となる。これらの前処理をおこなうと、得られる蛍光指紋領域は、図2右のような領域になり、一例として、生データで5,041点あった蛍光強度値(Z軸の数値)が、2063点に削減される。最終的には、この残ったデータを、離散データとして、X軸方向にスキャンし、1次元のベクトルデータとして、以降の解析に用いる。

4. 小麦かび毒の推定^{1)~5)}

小麦やトウモロコシ類の赤かび病菌で産生されるかび毒には、デオキシニバレノール(Deoxynivalenol, DON)、ニバレノール(Nivalenol, NIV)、ゼアラレノン(Zearalenone, ZEA)等がある。かび毒汚染は、穀類の収量・品質低下を招くばかりでなく、汚染穀物を摂取したヒトや動物に嘔吐、下痢、頭痛などの有害作用を示すため、世界中で重大な問題となっている。そこで、かび毒汚染の

図3 3つのかび毒の同時推定（バリデーション結果）

迅速・簡易な非破壊計測技術の開発を目的として、小麦粉の状態で、それぞれのかび毒の同時定量推定の検討を行った。

かび毒汚染小麦（品種：ホクシン）は、圃場にて赤かび病発病程度（低，中，高，甚）の異なる4つの試験区から収穫し、それを粉碎した小麦粉を試料とした。レファレンスとなるDON，NIV，ZEAの化学分析値は、DONは、公定法にもとづく液体クロマトグラフィー法により濃度を算出した。NIV，ZEAに関しては、公定法ではND（不検出）となる微量であったため、LC/MS/MSにて測定を行った。蛍光指紋は粉のまま分光蛍光光度計（日立F7000）で計測した。得られた蛍光指紋にPLS回帰分析を適用し、蛍光指紋情報による各かび毒の汚染濃度の定量推定を試みた。

図3に、DON，NIV，ZEAにおけるPLS回帰分析のバリデーション試料における結果を示す。化学分析値と蛍光指紋に基づく推定値の間にいずれも直線性が見られ、各かび毒で濃度推定が可能であった。これは、かび毒種による蛍光特性の僅かな違いが反映された結果であると推察された。これらから、蛍光指紋計測と多変量解析を組み合わせることで、一次スクリーニングとしての小麦粉中のかび毒汚染濃度の推定や、異なるかび毒の同時定量への応用の可能性が示唆された。

5. ナツメグにおけるアフラトキシンの推定^{6)~8)}

アフラトキシンは熱帯から亜熱帯地域にかけて生息する *Aspergillus flavus* などのカビにより生成されるカビ毒の一種であり、天然物の中で最も強力な発ガン物質として知られている。日本ではアフラトキシンB1を対象に規制値（10 ppb）が定められており（注：2011年10月よりTotal AFでの規制に変更）、香辛料中のアフラトキシンB1を検出する手法として、多機能カラムを使用したHPLCやLC/MSなどの化学分析が公定法として採用されている。しかし、これらの手法は、煩雑な前処理や機器の操作・習熟を要するため、香辛料の産地や流通段階で実施可能な簡易・迅速なスクリーニング手法の開発が望まれている。ここでは、蛍光指紋により、煩雑な前処理をせずに簡易・迅速にナツメグ抽出液中のアフラトキシンB1を検出する手法について検討を行った。

アフラトキシン未検出のナツメグを粉碎した後、メタノール溶液（メタノール：水＝8：2）で振とう抽出を行い、遠心器で抽出残渣を取り除いたものをナツメグ抽出液とした。この抽出液にアフラトキシンB1標準試薬（メタノール：水＝8：2）を添加し、0.0～4.0 ppb（23濃度段階）の疑似汚染濃度となるよう調製した。アフラトキシンB1標準溶液と疑似汚染試料は、前処理をせずに、

反射測定により夾雑物の影響を抑える

図4 蛍光指紋計測における透過測定と反射測定

図5 アフラトキシン B1 の蛍光指紋計測

そのまま蛍光指紋計測に供試した。蛍光指紋の測定条件を検討するために、透過計測と反射計測(図4)を試みた。

図5に、その結果を示す。図5(a)においては、透明なメタノールだけであるので、ほとんど蛍光情報はみられない。そこにアフラトキシンB1を添加した場合は、アフラトキシンの特徴的な蛍光ピークが観察される。しかし、メタノールに替わってナツメグ抽出液にアフラトキシンB1を添加すると、ナツメグ抽出液の色素による励起光の吸収が生じ、透過法においては図4の下部に図解したように、キュベットセルの内部まで励起光が到達できないため、蛍光情報はほとんど得られなくなる。しかし、反射法においては、キュベットセル表面のみにおいては蛍光現象が生じうるので、図5(d)のようなアフラトキシンの情報も含んだ蛍光指紋が得られることが明らかになった。すなわち、蛍光指紋の測定に反射法を用いることで、煩雑な前処理を経ずに疑似汚染試料に含まれるアフラトキシンの計測が可能となった。得られた蛍光指紋データにPLS回帰分析を適用するこ

図6 PLS 回帰分析によるアフラトキシン B1 濃度推定
(●△■は、便宜的につけた3段階の濃度)

とにより、推定値は、実際のアフラトキシン B1 添加濃度と高い直線性を示した (図6)。これらの結果から、蛍光指紋を用いることで、ナツメグ抽出液中における ppb レベルの低濃度のアフラトキシン B1 濃度を簡易に推定可能になると推察された。

6. 蛍光指紋の可能性

蛍光指紋は、励起蛍光マトリクスともよばれ、その概念は決して新しいものではない。しかしながら、実際に手間をかけずに比較的短時間で計測ができるようになったのは、ここ4、5年のことであり、また、得られた膨大なデータを十分な精度で判別や定量に応用できるようになったのも、最近のコンピュータと情報科学の進歩によるところが大きい。ここに紹介した以外にも、マンガーの産地判別⁹⁾、そば乾麺におけるそば粉と小麦粉の混合割合の推定^{10), 11)}、穀粉の種類・等級の判別¹²⁾、食肉表面における一般生菌数の推定¹³⁾などに成功している。我々は、さらに、そのアドバンテージを活かし、蛍光指紋計測を点から面に拡張した蛍光指紋イメージングの研究も行っており、その事例として、パン生地中におけるグルテン、デンプン分布の可視化^{14)~16)}、食肉表面の生菌数分布の可視化¹⁷⁾なども実現している。今後は、さらに使いやすい蛍光分光光度計の改善、現場で使える小型・迅速検査装置、あるいは蛍光指紋イメージング装置などのハードウェアの開発とともに、食品産業におけるさまざまな物質・成分の判別・定量および新しい用途開発を進めることにより、社会に役立つ基盤技術としての発展が期待される。

参考文献

- 1) 藤田かおり, 蔦瑞樹, 杉山純一, 励起蛍光マトリクス計測を応用したデオキシニバレノールの新規判別法, 日本食品科学工学会誌, **55**, 177-182 (2008)
- 2) Fujita, K., Tsuta, M., Kokawa, M., Sugiyama, J.: Detection of deoxynivalenol using fluorescence excitation-emission matrix. Food and Bioprocess Technol, **3**, 922-927 (2010)
- 3) 藤田かおり, 蔦瑞樹, 杉山純一, 久城真代, 柴田真理朗: 蛍光指紋による小麦粉中のデオキシニバレノールの非破壊計測. 日本食品科学工学会誌, **58**, 375-381 (2011)
- 4) 藤田かおり, 杉山純一, 蔦瑞樹, 小澤徹, 柴田真理朗, 吉村正俊, 粉川美踏, 久城真代: 蛍光指紋を利用したコムギ中のカビ毒の非破壊簡易検出法の開発. 農業情報研究, **21**, 11-19 (2012)

- 5) 杉山純一, 蔦瑞樹, 富田 (藤田) かおり, 吉村正俊, 危害要因検知方法, 危害要因検知装置, および, プログラム, 公開特許公報, 特開 2012-177606 (2012.9.13)
- 6) Fujita, K., Sugiyama, J., Tsuta, M., Shibata, M., Kokawa, M., Onda, H., and Sagawa, T.: Detection of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in nutmeg extract using fluorescence fingerprint, *J Food Sci Technol Res*, (in press)
- 7) 杉山純一, 蔦瑞樹, 富田 (藤田) かおり, 佐川岳人, アフラトキシン検知方法, アフラトキシン検知装置, および, プログラム, 公開特許公報, 特開 2012-177607 (2012.9.13)
- 8) Fujita, K., Sugiyama, J., Tsuta, M., Shibata, M., Kokawa, M., Onda, H., Sagawa, T.: Detection of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in nutmeg extract using fluorescence fingerprint. *Food Science and Technology Research*, (in press)
- 9) 中村結花子, 藤田かおり, 杉山純一, 蔦瑞樹, 柴田真理朗, 吉村正俊, 粉川美踏, 鍋谷浩志, 荒木徹也: 蛍光指紋計測によるマンゴーの産地判別. *日本食品科学工学会誌*, **59**, 387-393 (2012)
- 10) 杉山武裕, 藤田かおり, 蔦瑞樹, 杉山純一, 柴田真理朗, 粉川美踏, 荒木徹也, 鍋谷浩志, 相良泰行: 励起蛍光マトリクスによるそば粉と小麦粉の混合割合の推定. *日本食品科学工学会誌*, **57**, 238-242 (2010)
- 11) Shibata, M., Fujita, K., Sugiyama, J., Tsuta, M., Kokawa, M., Mori, Y., and Sakabe, H.: Predicting the buckwheat flour ratio for commercial dried buckwheat noodles based on the fluorescence fingerprint. *Biosci, Biotechnol and Biochem*, **75**, 1312-1316 (2011)
- 12) 蔦瑞樹, 杉山純一, 前田竜郎, 遠藤繁: 穀粉の判別方法及び装置. 特許第 5274288 号 (2013.5.24)
- 13) Oto, N., Oshita, S., Makino, Y., Kawagoe, Y., Sugiyama, J., and Yoshimura, M.: Non-destructive evaluation of ATP content and plate count on pork meat surface by fluorescence spectroscopy. *Meat Sci*, **93**, 579-585 (2012)
- 14) Kokawa, M., Fujita, K., Sugiyama, J., Tsuta, M., Shibata, M., Araki, T., and Nabetani, H.: Visualization of gluten and starch distributions in dough by fluorescence fingerprint imaging. *Biosci, Biotechnol and Biochem*, **75**, 2112-2118 (2011)
- 15) Kokawa, M., Fujita, K., Sugiyama, J., Tsuta, M., Shibata, M., Araki, T., and Nabetani, H.: Quantification of the distributions of gluten, starch and air bubbles in dough at different mixing stages by fluorescence fingerprint imaging. *J Cereal Sci*, **55**, 15-21 (2011)
- 16) Kokawa, M., Sugiyama, J., Tsuta, M., Yoshimura, M., Fujita, K., Shibata, M., Araki, T., and Nabetani, H.: Development of a quantitative visualization technique for gluten in dough using fluorescence fingerprint imaging. *Food and Bioprocess Technol*, **5**, (2012)
- 17) Nishino, K., Nakamura, K., Tsuta, M., Yoshimura, M., Sugiyama, J., and Nakauchi, S.: Optimization of excitation-emission band-pass filter for visualization of viable bacteria distribution on the surface of pork meat. *Optics Express*, **21** (2013) DOI:10.1364/OE.21.012579

Development of quick detection system of mycotoxins using fluorescence fingerprint

Junichi SUGIYAMA

Food Engineering Division, National Food Research Institute, NARO, Tsukuba, Ibaraki 305-8642, Japan

The fluorescence fingerprint, also known as the excitation-emission matrix (EEM), is a set of fluorescence spectra acquired at consecutive excitation wavelengths to create a three-dimensional diagram. The pattern of this diagram, rather like the actual fingerprint, is unique for each measured sample, containing abundant information about the constituents making up the sample. Therefore, fine distinctions can be made between samples, which would otherwise be indistinguishable. Detection of mycotoxins in wheat and nutmeg using this technology are introduced in this paper.