

蛍光パターン分析により食の安全を支える

—蛍光指紋による食品分析技術—

堀込 純
Horigome Jun

上妻 道成
Kozuma Michinari

白崎 俊浩
Shirasaki Toshihiro

試料中の有機物成分が発する蛍光パターンに含まれる大量の情報を活用する蛍光指紋分析は、品質や産地の判別、危害物質の検出などを簡便かつ低コストに行える手法として、食品分野への応用が注目されている。日立ハイテックスサイエンスのF-7100形分光蛍光光度計は、

蛍光指紋測定の高スループット化技術が適用されており、分光器特有の高次光の影響を簡便・迅速に取り除く自動フィルタ付属装置を新たに搭載するなど、蛍光指紋測定に特化した機能の充実を図っている。本稿では、その特長と事例について解説する。

1. はじめに

蛍光指紋分析は、試料が発する蛍光パターン（蛍光指紋）を計測し、蛍光の波長や強度の膨大な数値データを統計的に多変量解析する。近年の情報処理技術の発展に伴い、大量データの解析が可能になったことで実用レベルに達してきており、応用範囲が広がっている。特に食品分野への応用はここ数年で飛躍的に注目度が増しており、試料の種別や産地の判別^{1), 2)}、試料の混合割合の算出³⁾、カビ毒などの危害物質の検知^{4)~7)}、機能性成分の定量などへの応用が期待されている。

ここでは、蛍光指紋分析の手法とその特徴を説明し、最新の事例を紹介する。

2. 蛍光指紋分析

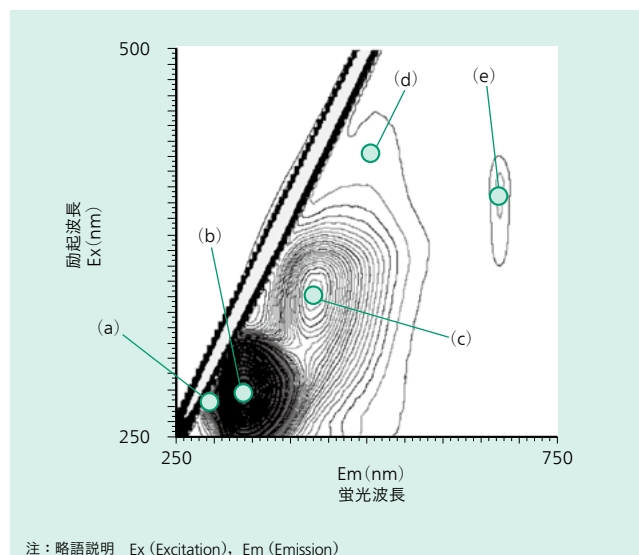
2.1 蛍光指紋とは

試料に光（励起光）を照射すると、試料に含まれる有機物などからさまざまな波長の光（蛍光）が発せられる。蛍光は、励起光の波長（励起波長）、試料からの蛍光の波長（蛍光波長）と強度（蛍光強度）の3種類の情報を持つ。蛍光指紋は、これらを三次元的に鳥瞰（かん）図や等高線図などでプロットすることで得られる。

パイナップルジュースの蛍光指紋を一例として図1に示す。励起波長を縦軸に、蛍光波長を横軸に、蛍光強度を等高線で示している。あたかも人の指の指紋状に見て取れることから、蛍光指紋と呼ばれている。蛍光は励起波長より

も長波長側に観測される（ストークスの法則）ことから、対角線の右下部分に蛍光指紋が現れている。また、同一成分であれば励起波長を変えても蛍光波長は変わらないことから、蛍光強度は等高線状に描かれる。

この蛍光指紋では、(a)~(e)のピークが検出されている。これらのピークは試料に含まれている蛍光性の成分に由来し、これまでの報告例⁸⁾より、(a) 芳香族アミノ酸由来の



注：略語説明 Ex (Excitation), Em (Emission)

図1 蛍光指紋の一例（パイナップルジュース）

縦軸は励起波長を、横軸は蛍光波長を、等高線は蛍光強度をそれぞれ示している。試料に含まれている蛍光性の成分(a)~(e)のピークが検出されている。これらのピークは、これまでの報告例より、(a) 芳香族アミノ酸由来のL-チロシン、(b) L-トリプトファン、(c) 細胞壁由来のフェルラ酸やリグニン類、(d) ビタミンB₂（リボフラビン）、(e) クロロフィル類などと推定される。

L-チロシン, (b) L-トリプトファン, (c) 細胞壁由来のフェルラ酸やリグニン類, (d) ビタミンB₂ (リボフラビン), (e) クロロフィル類などと推定される。試料の産地や生育条件が異なると、これらの成分の含有量に変化が生じるため、試料固有の蛍光指紋が得られて産地などが判別できる。

2.2 蛍光指紋分析の方法と判別への応用

蛍光指紋は30年ほど前より知られた測定方法であった。しかし、当時は1回の測定に数十分～数時間を要するなど利便性が低く、データ解析にも時間を要していた。このため、従来は着目する成分についての励起光・蛍光ピークの単一の波長を用いて成分の判別や定量を行っていた。近年、測定装置の性能向上と大量データ解析技術の進展により、蛍光や励起光のスペクトル、すなわち多くの波長や強度の情報から成る大量データを統計手法によって網羅的に解析することで、判別への応用性が大きく広がっている。

蛍光指紋分析の方法の概念図を図2に示す。試料の特性(産地や良否など)があらかじめ分かっている試料(既知試料)を複数用意し、個々の蛍光指紋データを測定する。これを多変量解析して既知試料による「判別モデル」を作成する。判別モデルにおけるプロット点はそれぞれの既知試料に相当する。ここで未知試料の蛍光指紋データを測定し、判別モデル上にプロットすることで、未知試料がどの既知試料に近いかが分かり、試料の産地や良否が判別できる。

蛍光指紋データは数千点から数万点のデータの集合体で

ある。この大量データを用いるために、多変量解析によってデータの特徴を示す少数の変数に集約することを行っている。例えば主成分分析は、大量データを「主成分得点」と呼ばれる変数(特徴量)に低次元化して集約する手法である。図2の判別モデルでは、主成分得点1・主成分得点2を横軸・縦軸に用いることで、大量の蛍光指紋データが2つの主成分得点によって1点の座標に表示されている。これにより、未知試料がどのグループに属するかが分かり、判別が容易に行える。

2.3 蛍光指紋分析の特徴

蛍光指紋分析の大きな特徴として次の3つが挙げられる。

(1) 膨大な情報量で判別分析が可能

一般に励起光と蛍光の波長は、紫外域から可視域範囲(200～800 nm程度)で測定する。得られる強度情報は数万点となる。この膨大な数値データを多変量解析し、少数の変数に集約して判別分析に用いる。

(2) 分析の簡便性

一般に食品や農作物を機器分析する際には、さまざまな工程を伴う前処理を行う。一方、蛍光指紋分析は試料そのものが有する蛍光(自家蛍光)を測定する。そのため、粉碎、溶解、ろ過など必要最低限の前処理で測定することが可能であり、果実の切片や生肉などの試料を直接分析することもできる。また、試料は溶液状態、固体状態(板状・粉末状など)のいずれでも分析可能である。

(3) 分析コストの低減

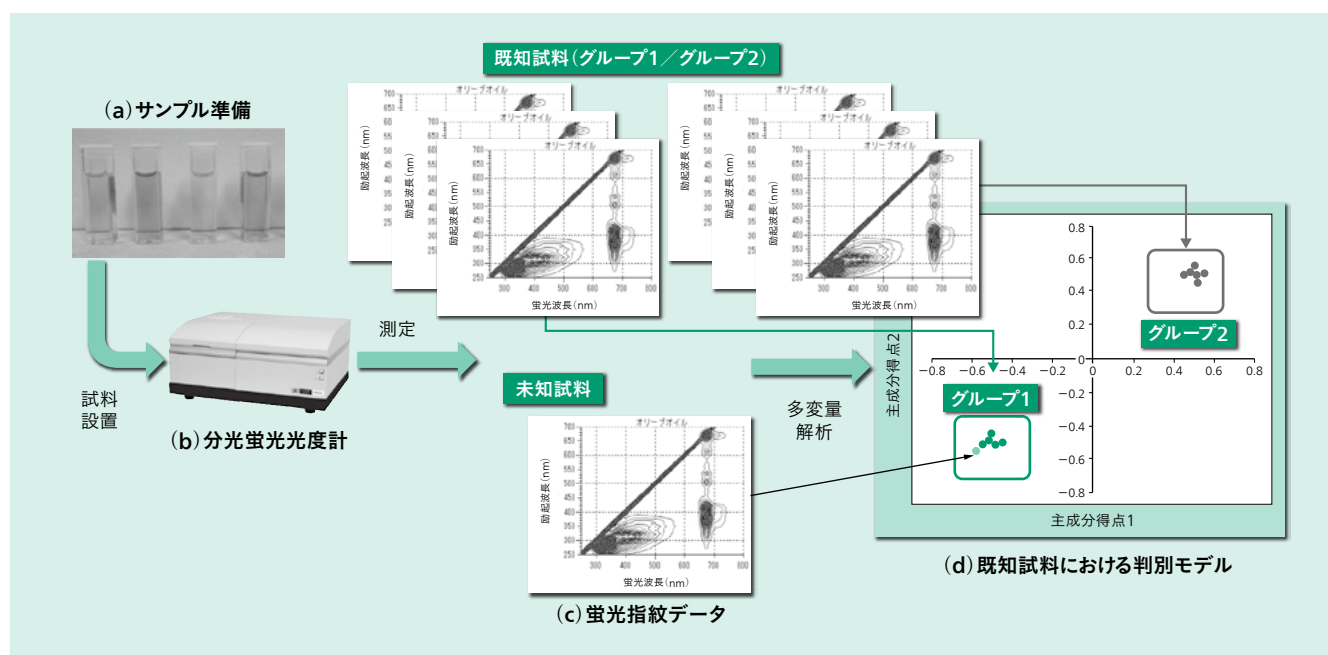


図2 蛍光指紋分析の方法の概念

特性があらかじめ分かっている試料(既知試料)を複数用意し、個々の蛍光指紋データを測定する。このデータを多変量解析して既知試料による「判別モデル」を作成する。続いて、未知試料の蛍光指紋データを測定し、多変量解析した結果を判別モデル上にプロットすることで、未知試料がどのグループに近いかなど推することができる。

本手法は、他の分析機器を利用する手法と比較して導入コストやランニングコストが安価である。その一例として、カビ毒の分析に関して藤田ら^{4)~7)}によって報告されているように、蛍光指紋分析は、高額な質量分析などの前段階の試料選別（スクリーニング分析）として用いることで分析コストの低減が期待される。

3. 蛍光指紋測定システム

蛍光指紋分析は、従来は測定に時間を要するために応用が限られていた。しかし、10年ほど前より蛍光測定を行う分光蛍光光度計の高感度化や高速化を進めることで、1回の測定が数分で済むほどまでにスループットが向上し、多量の蛍光指紋測定が可能となった。特に蛍光指紋測定では、励起光を紫外域から可視域まで走査（スキャン）し、蛍光の波長と強度（蛍光スペクトル）を連続的に計測する必要がある。このため、分光蛍光光度計には高速・高精度な測定性能が求められる。

株式会社日立ハイテクサイエンスのF-7100形分光蛍光光度計は、蛍光指紋測定用の三次元蛍光スペクトル測定モードを備え、クラス最高レベルのスキャンスピード（1分間に60,000 nm）、高速スキャンに対応したレスポンス処理の自動設定、迅速な励起波長切り替えなど、蛍光指紋測定の高スループット化技術が組み込まれている（**図3**参照）。

また、蛍光指紋測定では、ゴーストピークとして出現する分光器特有の高次光（2次光、3次光など）の影響を取り除くことが課題であった。そのため、測定条件に合わせて自動でフィルタを挿入し、高次光の影響を簡便・迅速に取り除く自動フィルタ付属装置を新たに開発した（**図4**参照）。さらに、蛍光指紋解析に使用できる有効データ数は、標準的な波長範囲の場合、約4,500点から約1万点に増やし、データ解析精度の向上を図った。データ処理部についても、蛍光指紋のピーク表示機能や多変量解析ソフトウェアへのデータ転送機能など、蛍光指紋測定に特化した機能の充実を図っている。

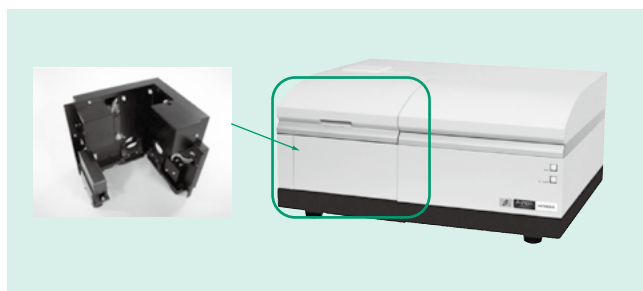


図3 F-7100形と自動フィルタ付属装置の外観

F-7100形に自動フィルタ付属装置を搭載することで、ゴーストピークとして出現する高次光の影響を簡便・迅速に取り除くことが可能である。

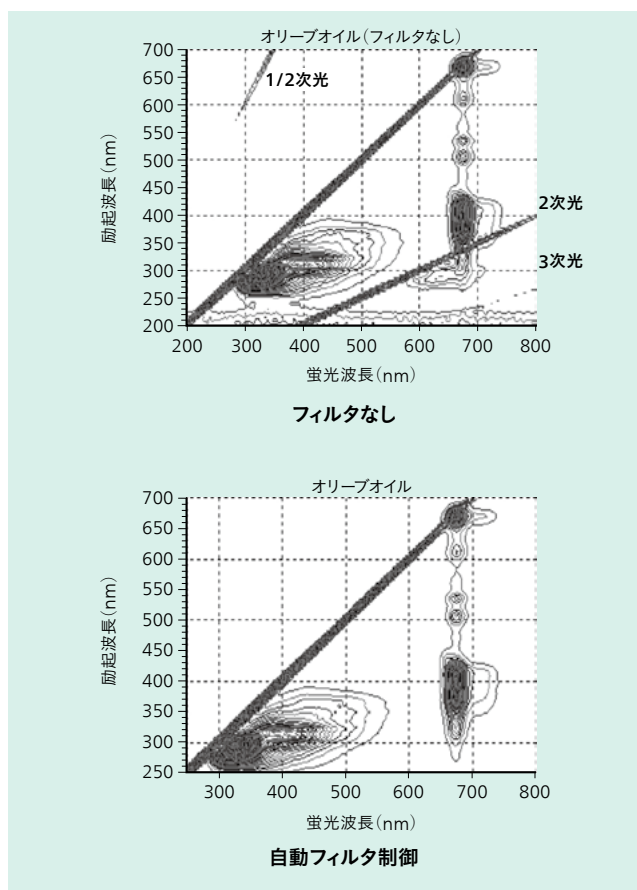


図4 フィルタの有無による蛍光指紋データの比較

オリーブオイルの蛍光指紋を図に示す。フィルタなしでは、分光器特有の高次光（2次光、3次光など）の不要光が蛍光指紋に重複している。自動フィルタ付属装置は、測定条件に合わせて自動でフィルタが挿入され、高次光の影響をなくすることができる。

4. 応用事例

4.1 でんぶんの原材料ごとの判別例

とうもろこし、ばれいしょ、小麦を原料とするでんぶんを用い、蛍光指紋の測定結果からでんぶんの種別の判別を試みた。試料は粉末セルに0.7 mL程度を封入し、試料表面の蛍光を測光できる固体試料ホルダに設置した（**図5**参照）。

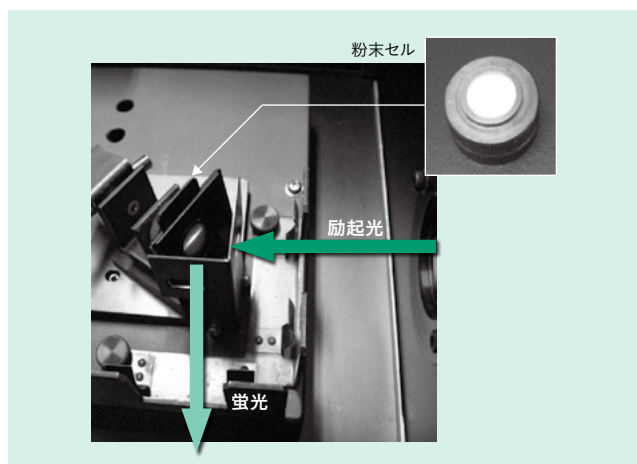


図5 サンプル設置の様子

でんぶんの蛍光指紋測定では、試料は粉末セルに0.7 mL程度を封入し、試料表面の蛍光を測光することができる固体試料ホルダに設置した。

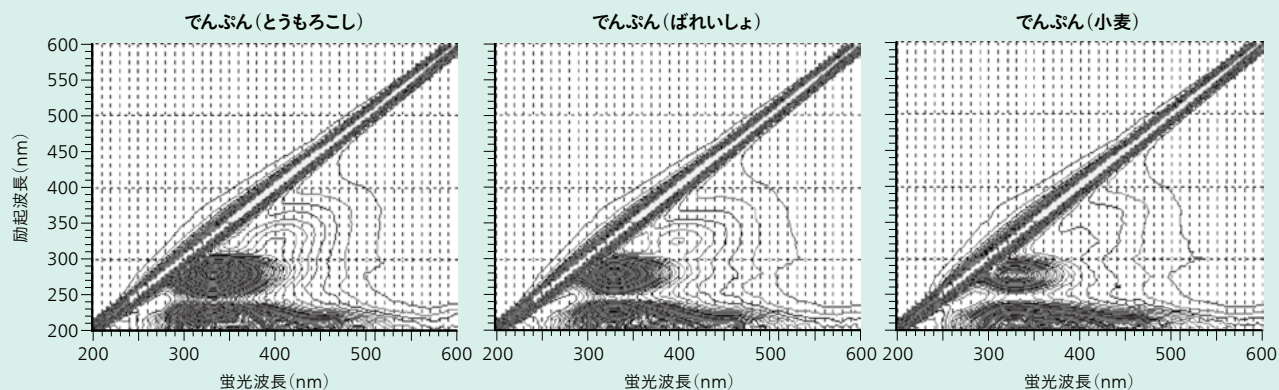


図6 原材料ごとのでんぷんの蛍光指紋

とうもろこし(左), ばれいしょ(中央), 小麦(右)を原料とするでんぷんの蛍光指紋である。蛍光波長300 nm付近に観測されたピークは、たんぱく質を構成するアミノ酸に由来するピークと推測される。出現するピーク波長は試料間で大きな差は確認されず、蛍光指紋を俯瞰(ふかん)的に見てもその違いを判別することは難しい。

照)。得られた蛍光指紋を図6に示す。それぞれの試料において、いくつかのピークが確認された。蛍光波長300 nm付近に観測されたピークは、たんぱく質を構成するアミノ酸に由来するピークと推測される。ここで、蛍光指紋を俯瞰(ふかん)的に見てもその違いを判別することは難しい。しかし、試料間で、ピーク波長に大きな差はないが、ピーク強度の違いが確認された。そこで、強度のピーク(山)やバレー(谷)に相当する代表的な波長の蛍光強度を抽出し、多変量解析(主成分分析)を行った。

結果を図7に示す。それぞれの原料ごとにプロットがグループ化されていることが分かる。さらに、混合品ではプロット位置が純品と異なり、とうもろこしとばれいしょ由来の混合品と推定される。このように蛍光指紋データに主成分分析を適用することで、未知試料の原材料の把握、品

質管理、不良品解析への応用が期待される。

4.2 オリーブオイルの判別分析例

市販のオリーブオイルとバージンオリーブオイルの蛍光指紋を測定した。測定結果を図8に示す。希釈などの前処理を行わず、PMMA (Polymethyl Methacrylate) 製のセルに試料を入れ、試料表面からの蛍光を測光した。すべてのオリーブオイルで、領域1(励起波長250~450 nm, 蛍光波長300~600 nm付近)と領域2(励起波長300~700 nm, 蛍光波長650~750 nm)の2つの領域で蛍光ピークが確認された。領域1は酸化生成物、領域2はクロロフィルに相当する蛍光と示唆されている⁸⁾。領域1から蛍光ピーク(i)(励起波長320 nm, 蛍光波長400 nm)、領域2から蛍光ピーク(ii)(励起波長415 nm, 蛍光波長675 nm)の蛍光強度をピックアップし、蛍光強度比[(ii)/(i)]を算出した。蛍光強度比を比較したところ、同図中の各グラフに数値を示すように、バージンオリーブオイルのほうが、オリーブオイルよりも高い値を示した。

バージンオリーブオイルは、オリーブ果実から搾り取った油であり、精製などの処理を行っていないことから、オリーブ果実に含まれるクロロフィル[蛍光ピーク(ii)]が高く検出されている。一方、オリーブオイルは、精製などの処理の過程でクロロフィルの含有量が低下したため低く検出されたものと考えられる。また、酸化生成物に相当する蛍光[蛍光ピーク(i)]もバージンオリーブオイルのほうが低い値となっている。オリーブオイルの品質は、実際には酸度や香り・風味などの基準によって定められるため、本方法によってオリーブオイルの品質を決定づけることはできないが、蛍光指紋データを昨今話題となっている食用油の偽造品などの簡易判定へ応用可能と考えられる。

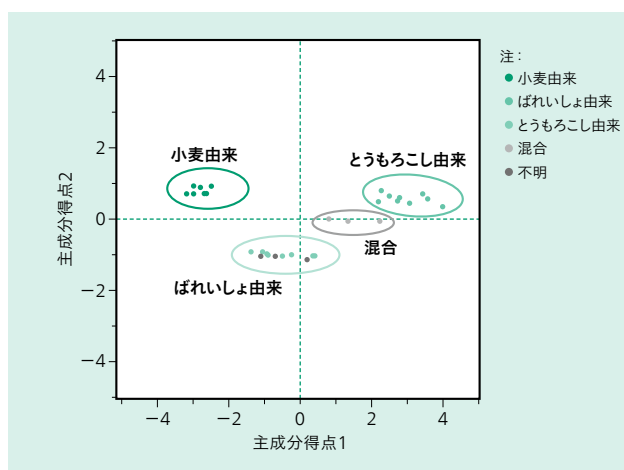
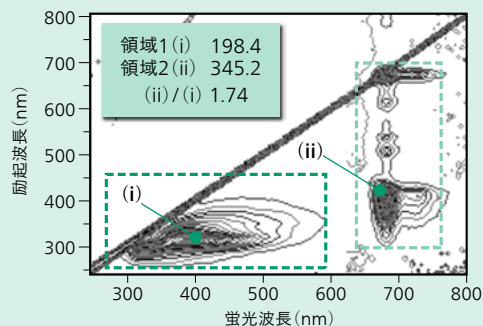
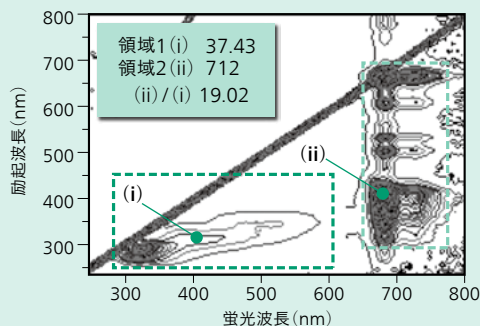


図7 でんぷんの蛍光指紋に対する主成分分析結果

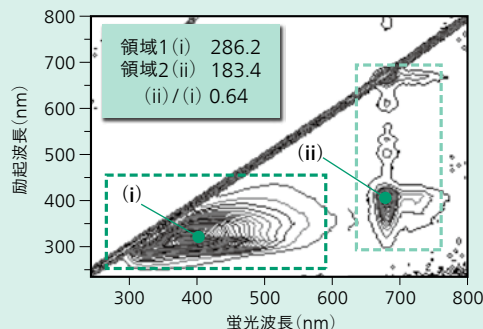
主成分分析は、多量のデータをその特徴を示す変数である「主成分得点」に集約し、低次元化する。それぞれの原料ごとにプロットが大別されており、試料間の判別が容易になることが分かる。混合試料はとうもろこし由来とばれいしょ由来の混合であること、不明試料はばれいしょ由来であることが推定される。



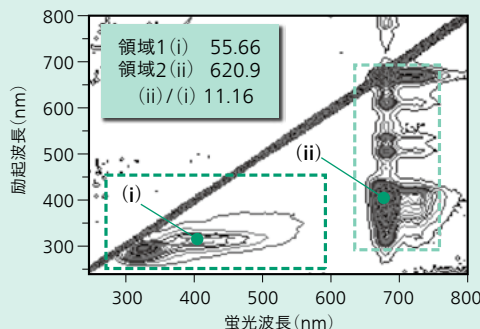
オリーブオイル(ブランドA)の蛍光指紋



バージンオリーブオイル(ブランドA)の蛍光指紋



オリーブオイル(ブランドB)の蛍光指紋



バージンオリーブオイル(ブランドB)の蛍光指紋

図8 | オリーブオイルの蛍光指紋

2つの領域〔領域1(励起波長250~450 nm, 蛍光波長300~600 nm), 領域2(励起波長300~700 nm, 蛍光波長650~750 nm)〕で蛍光ピークが確認された。蛍光強度比 [(ii)/(i)] を算出することで、オリーブオイルとバージンオリーブオイルの違いが判別される。

5. おわりに

食品分野では、多種多様な試料が存在し、注目する観点も目的によって大きく異なる。そのため、試料・目的に応じた分析手法の確立など、応用事例の拡充に関する研究がなされている⁶⁾。蛍光指紋分析を食品分野に応用する試みは、多方面の研究成果が報告されており、ここ数年で注目度が飛躍的に向上してきている。蛍光指紋分析が、従来の方法よりも簡便で迅速な測定手法として確立され、社会に貢献できる技術となるよう、アプリケーション開発と装置の機能・性能の向上を進めていく。

謝辞

本稿で述べた蛍光指紋データの多変量解析方法において、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構食品研究部門 杉山純一氏をはじめとする関係各位より多くの助言をいただいた。深く感謝の意を表する次第である。

参考文献

- 1) 杉山：光の指紋による食品の鑑別・定量，食品と容器，54，308~315 (2013)
- 2) 中村，外：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)
- 3) 杉山，外：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)

- 4) 藤田，外：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)
- 5) K. Fujita, et al.: Detection of Deoxynivalenol Using Fluorescence Excitation-Emission Matrix, Food and Bioprocess Technol., 3, 922-927 (2010)
- 6) 藤田，外：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)
- 7) 藤田，外：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)
- 8) J. Christensen, et al.: Multivariate Autofluorescence of Intact Food Systems, Chemical Reviews, Vol. 106, No.6 (2006)

執筆者紹介



堀込 純

株式会社日立ハイテクサイエンス 那珂事業所 光学設計部 所属
現在，光学設計部にて蛍光光度計の設計開発に従事



上妻 道成

株式会社日立ハイテクサイエンス 那珂事業所 光学設計部 所属
現在，光学設計部にて分光光度計・蛍光光度計の設計開発に従事



白崎 俊浩

株式会社日立ハイテクサイエンス 那珂事業所 光学設計部 所属
現在，光学設計部にて光度計・液体クロマトグラフのアプリケーション開発に従事
理学博士
日本分析化学会会員