

# 生牛肉試料内 3 次元氷結晶構造計測システムの開発

東京大学

都 甲 洙 ・ 相 良 泰 行 ・ 田 畑 み づ ほ

東京大学

工 藤 謙 一 ・ 樋 口 俊 郎

日本冷凍空調学会論文集 Vol.19 No.4 別刷

社団法人 日本冷凍空調学会

# 生牛肉試料内 3 次元氷結晶構造計測システムの開発

## Development of Measurement System for Three-Dimensional Structure of Ice Crystals in Raw Beef Samples

都 甲 洙\*      相 良 泰 行\*      田 畑 み づ ほ\*  
 Gab-Soo DO      Yasuyuki SAGARA      Mizuho TABATA

工 藤 謙 一\*\*      樋 口 俊 郎\*\*  
 Ken-ichi KUDOH      Toshiro HIGUCHI

\* 東京大学大学院農学生命科学研究科 (113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1)  
 Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo  
 (1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657)

\*\* 東京大学大学院工学系研究科 (113-8656 東京都文京区本郷 7-3-1)  
 Graduate School of Engineering, The University of Tokyo  
 (7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8656)

### Summary

Micro-Slicer Image Processing System (MSIPS) has been developed for measuring the three-dimensional (3-D) structure and distribution of ice crystals formed in biological materials. The system has functions to reconstruct the 3-D image based on the image data of exposed cross sections obtained by multi-slicing of a frozen sample with the minimum thickness of  $1\mu\text{m}$  and to display the internal structure as well as an arbitrary cross section of the sample choosing observation angles.

The effects of freezing conditions on the morphology and distribution of ice crystals were demonstrated quantitatively from the observations of raw beef stained by fluorescent indicator. The 3-D image of the sample demonstrated that the growth of ice columns was restricted by the intrinsic structure of muscle fibers. The proposed method provided a new tool to investigate the effects of freezing conditions on the size, morphology and distribution of ice crystals.

**Key words :** Ice crystal, Zone of maximum ice crystal, 3 Dimensional measurement, Micro-slicer, Image processing, Raw beef

### 1. 緒 言

一般に生体材料は、多様な物質を含む不均質多成分系として存在しているが、「水」は、大部分の凍結材料に共通して含まれる主要成分の一つである。生体の凍結は、材料内に含まれる水の相変化現象であり、凍結に伴って氷結晶が生成される<sup>1-2)</sup>。生体材料中に生成する氷結晶の形態は、凍結

曲線の最大氷結晶生成帯通過時間、すなわち、凍結速度に大きく影響される。動物性細胞質食品において凍結により形成される氷結晶は、組織の形態変化や破壊および含有成分の変性を生じさせ、これにより解凍後のドリップ生成、食味およびテクスチャの変化などを招くことが知られている<sup>4-5)</sup>。凍結食品の品質を向上させるためには、凍結プロセスにおける材料内氷結晶形成のメカニズムを

解明すると共に、最適な凍結操作法を検討する手法の開発が不可欠と考えられる。ここでは特に、凍結操作条件と氷結晶性状の定量的関係を3次元的に把握するための計測手法の開発が望まれている。

従来の氷結晶観察法には、冷凍顕微鏡および共焦点レーザ顕微鏡を用いて氷結晶を直接観察する直説法と、試料の前処理により氷結晶を間接的に観察する凍結置換法、凍結固定法および凍結乾燥法などの間接法がある。しかし、いずれの方法でも氷結晶の2次元観察は可能であるが、3次元情報の取得は困難である。例えば、J.Evansらは<sup>6)</sup>、共焦点レーザ顕微鏡を用い、凍結卵アルブミンゲルを蛍光染色して、その凍結状態を観察したが、この方法による観察範囲は試料表面から深さ方向の約100 $\mu\text{m}$ に限定される。他方、凍結置換法による氷結晶のサイズ・密度に関する研究がなされており<sup>2,5-8)</sup>、例えば、Bevilacquaら<sup>1)</sup>は、凍結牛肉の細胞内外における氷結晶のサイズが凍結条件に影響されることを確認した。また、Payneら<sup>8)</sup>は、不凍タンパク質に浸漬させた魚肉を用い、冷凍・冷蔵によって細胞構造の変化が異なる事を観察した。Hye-Won<sup>9)</sup>らは、凍結条件が氷結晶構造に与える影響を把握するために、 $-20^{\circ}\text{C}$ 、 $-80^{\circ}\text{C}$ 、液体窒素で凍結したハイドロゲルを走査型電子顕微鏡(Scanning Electron Microscope: SEM)で観察し、氷結晶サイズの計測およびその断面画像から3次元構造を推測した。この他に、クライオSEMにより氷結晶跡を観察する方法があるが、この方法は、試料中の氷結晶を昇華させ、多孔質になった試料から氷結晶の形態を間接的に観察する方式である。この方法は、高い分解能を有するが、氷結晶とこれが昇華した後に残される空隙形態の一致に疑問が残されている。

近年、コンピュータや画像処理技術の進歩につれて、3次元的な情報を求めるニーズが多方面で生じてきた。都<sup>10)</sup>らは、複雑な形態を有する農産物の外観、内部構造および色彩分布などを観察し、その形態に関する定量的情報を得るための計測装置、すなわち、「マイクロスライサ画像処理システム」を開発し、ブロックリーの個体質量から表面積、比表面積および体積を推算する方法を提唱している。

本研究の目的は、生牛肉の凍結プロセスにおい

て材料内に形成される氷結晶を立体的に観察し、さらに、氷結晶の構造、サイズおよびその材料内分布などを定量的に計測する方法を開発することにある。具体的には供試材料に生牛肉を選び、その組織を蛍光染色することによって氷結晶と組織を識別し、マイクロスライサ画像処理システムにより生牛肉内氷結晶を3次元的に観察する方法を開発することを目的とした。

## 2. 実験装置

### マイクロスライサ画像処理システム<sup>10-12)</sup>

#### 2.1 システムの構成と機能

本研究用に試作したマイクロスライサ画像処理システムのブロック図を図1に示す。後で述べるように、本システムの特徴は、包埋固定した試料を回転刃で連続的に切削、すなわちマルチスライシングして、試料断面を露出させる断面像作成装置①にある。露出した二次元断面像は断面画像取込装置②により、各種の顕微鏡を介してCCD(Charge Coupled Device: 電荷結合素子)カラーカメラで撮像され、画像記録装置③(レーザディスク)に収録される。これらの原画像は、ワークステーションとしての機能を有する3次元像構築装置④により、3次元画像に再構築される。また、実際には切断していない任意の試料断面画像を表示するなどの画像処理が可能である。上記装置①のスライシングと③の記録タイミングを同期させるための信号発生器⑤として、マイク

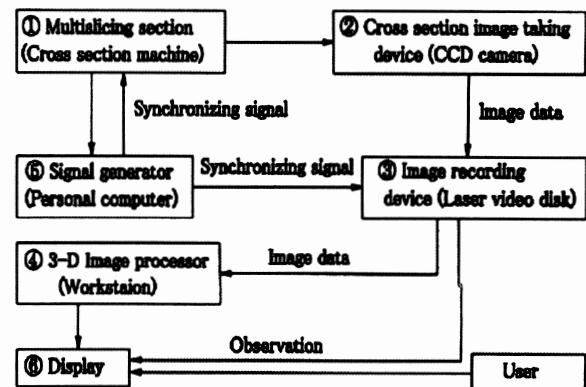


Fig.1 Block diagram of micro-slicer image processing system

ロコンピュータを使用している。この他に、②で撮像中の画像や③に収録された原画像、さらに④で得られた再構築画像を観察者に表示するためのモニタ⑥が付属している。

## 2.2 スライサ部の機能

本システムの特徴は、マイクロスライサ部における切削・撮像方式にある。すなわち、通常の顕微鏡観察などで行われるように、試料から切り取った切片を観察する方法を採らず、マルチスライシングして得られる試料自体の露出断面像を順次撮像する方式を採用した点にある。この方式の採用により試料の変形を少なくし、また、固定試料の作成にも熟練を要しない等の利点を得られた。さらに、切削するサンプルの大きさによって小型（ $\phi 4 \times 20\text{mm}$ ）と大型（ $59 \times 46 \times 100\text{mm}$ ）の2種類のシステムを試作したが、本稿では氷結晶の計測に用いた小型のスライサ部について述べる。

図2のマイクロスライサ部に示すように試料は、ステップモータで駆動する一軸ステージで間欠的に押し上げ、その上端を連続的に切削する。切削用ナイフは、試料硬度によりマイクロトーム、ダイヤモンドバイト、ガラスナイフなどを選択可能であるが、生体や食品の切削にはマイクロトームを使用する。切削用ナイフは、60rpmで回転するスピンドル上端部に装備したナイフホルダの先端部分に取り付ける。また、スピンドルは、モータとタイミングベルトにより駆動する機構となっている。この機構による試料の最小切削厚さは、押

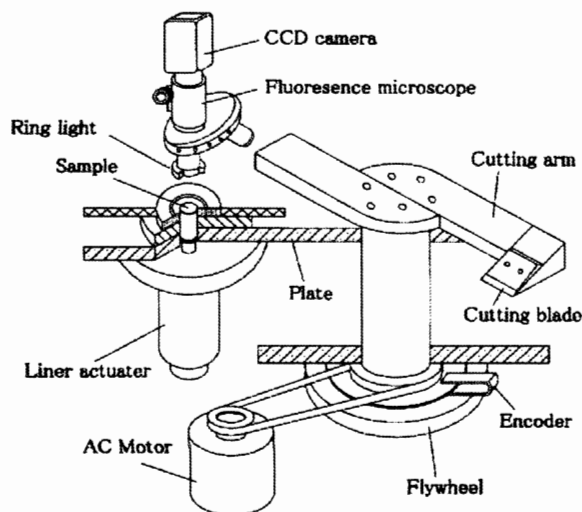


Fig. 2. Multislicing section

し上げストローク 22mm に対し  $1\mu\text{m}$  である。試料の押し上げと断面画像の記録のタイミングは回転刃の主軸に取り付けたエンコーダからのトリガ信号により制御する。試料断面像は、光学あるいは蛍光顕微鏡と CCD カメラおよび超長焦点距離の対物レンズを用い、倍率 100 倍までの観察が可能である。また、切削中の試料の融解を防止するため、マイクロスライサ部の外周部に設けたジャケットにブラインを循環させることにより試料の温度を  $-40^\circ\text{C}$  に維持可能である。

## 2.3 システムの測定精度および画像処理法

3次元再構築において最も重要なことは、切削厚さである。その精度は、渦電流式センサを用い、真鍮製の土台上部の変位量を非接触で計測し、評価した。その結果、試料の送りは  $0.5 \sim 50\mu\text{m}$  まで可能であり、ライナアクチュエータモータは連続的に安定した送り動作を行っていることを確認した。

一時記録した断面画像を利用して立体像を再構築する方法として、ワイヤフレーム法やサーフェース法などの画像処理法があるが、表面データのみでの立体像ではなく、内部情報の観察が可能なボリュームレンダリング法を採用した。図3に示したように、スライスして得られた断面画像の二値化処理を行い、これらを積み上げることにより3次元立体を構築する。また、材料の表面積と体積は、切削厚さに、それぞれ断面画像の周囲長と面積を乗じることにより求められる。

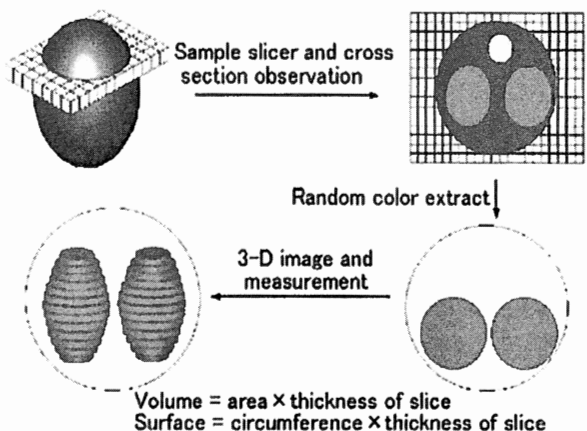


Fig. 3 Construction of 3-D internal structure and the measurement of surface area and volume

### 3. 供試材料および方法

#### 3.1 試料の調製および予備試験

供試試料に生牛肉を選び、筋繊維の方向に沿って切り出し、これを濃度  $10 \mu\text{M}$  の蛍光試薬 (CellTracker™ Blue CMF<sub>2</sub>HC, Molecular Probes) 溶液に約3時間浸漬して染色した。この試料を $-30^\circ\text{C}$ で3時間凍結した後、厚さ  $20 \mu\text{m}$  で切削し、蛍光顕微鏡により観察した。

#### 3.2 計測法

図4にパラフィン製のサンプルホルダおよび試料の固定状態を示す。供試材料である牛もも肉を円筒形 ( $\phi 4 \times 15\text{mm}$ ) に切り出し、染色した後、サンプルホルダに充填した。試料凍結中の熱流束を計測するために、試料底部に銅柱を挿入、さらに、サンプルホルダの外周囲を発泡スチロールで断熱した。また、サンプルホルダ下部から5mm間隔で熱電対を挿入し、凍結プロセスにおける温度分布の経時変化を測定した。液体窒素を冷媒とするフリーザ上部部に設けた冷却銅板は、一定温度に制御され、この冷却板により試料は、底面より冷却される。凍結食品中に生成する氷結晶の大きさは、凍結曲線の最大氷結晶生成滞通過時間に影響されるため、試料の凍結条件には緩慢凍結 ( $-15^\circ\text{C}$ ) 急速凍結 ( $-120^\circ\text{C}$ ) を採用し、凍結開始から2時間後の試料を観察に供した。凍結した試料は、切削回転数60rpm、切削厚さ  $5 \mu\text{m}$  で連続的にスライスし、蛍光顕微鏡を介して画像を記録した。

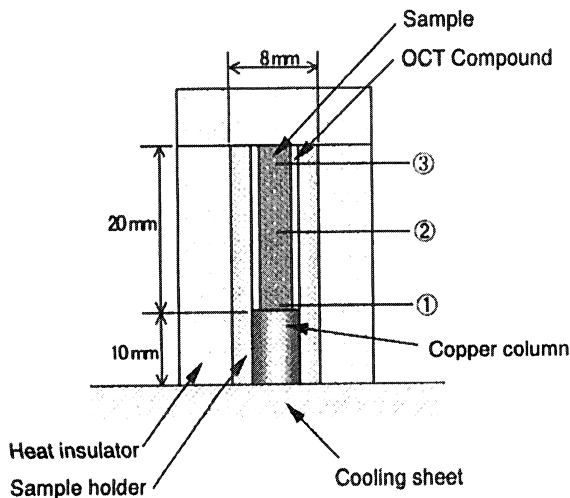


Fig. 4 Specimen fixed in sample holder

### 4. 結果及び考察

#### 4.1 氷結晶識別

蛍光試薬により染色された筋繊維を図5に示す。生牛肉細胞内に取り込まれた蛍光性のクロロメチル誘導体は、タンパク質と結合し蛍光標識体を形成した。これにより牛肉組織と凍結によって生成される氷結晶の識別が可能となった。

#### 4.2 凍結牛肉中の氷結晶観察

図6と7に蛍光染色した試料を設定温度 $-15^\circ\text{C}$  (Slow freezing:S),  $-120^\circ\text{C}$  (Quick freezing:Q) でそれぞれ2時間凍結した試料の断面画像と3次元構築像を示す。3次元構築像は、図4に示した温度測定箇所①を中心に厚さ1mm (上下0.5mm) 範囲の断面画像から再構築した。断面画像は、再構築した3次元像における上部, 中心部, 下部に相当する。これらの画像は、蛍光染色により蛍光を発している組織と発していない氷結晶が明確に識別されることを示している。

図6のS-U (上部), C (中部), L (下部) に示す緩慢凍結試料の断面画像に観察された氷結晶は、直径  $70 \sim 150 \mu\text{m}$  の丸みを帯びた不定形状であり、筋繊維は氷結晶の生成, 成長に圧迫されて多大なストレスを受けていることが観察された。また、比較的凍結速度の速い試料下部では筋繊維周囲に氷結晶が生成し、上部断面画像に示されるように、凍結速度の小さいところでは、氷結晶は筋繊維を圧迫して取りまくように発達し、円形に近い形状を示すことが分かった。急速凍結試料断面画像を図7のQ-U, C, Lに示す。試料の下部(Q-L)では細胞内に粒状で断面が円形の氷結晶が形成され、その直径は、 $10 \sim 20 \mu\text{m}$  である。中部(Q-C)では細胞の形状が消失し、氷結晶のサイズは、直径  $30 \mu\text{m}$  程度であり、上部(Q-U)では直径  $50 \mu\text{m}$  程度の氷結晶が連なって筋繊維を取り囲むように生成していることが観察された。

これらの図から、凍結により生成される氷結晶のサイズ, 分布, 構造は凍結速度に影響されることが確認された。すなわち、従来指摘されてきた「氷結晶は、緩慢凍結では細胞外に生成し、その大きさは細胞間の水分を吸収して大きくなり、急速凍結では細胞内に生成し、その大きさは小さくなる」という定説が定量的に裏付けられた。



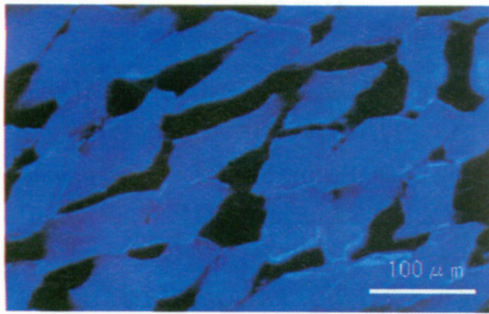


Fig. 5 Muscle fibers of raw beef stained by celltracker probes (-30°C)

4.3 凍結牛肉中の氷結晶の3次元構造

図6 (S-3D) と図7 (Q-3D) および図8・9に設定温度-15°C, -120°Cで凍結した試料の3次元構築画像とこれを任意の断面で切断した画像をそれぞれ示す. これらの画像より本システムは, 凍結材料内の3次元内部構造の観察に有効であることが確認された. いずれの設定温度条件でも氷結晶は筋繊維の方向に沿って生成し, 氷柱を形成していることが分かる. また, 筋繊維にゆがみや屈折が存在すると, 筋繊維の方向に沿いながらも氷柱は, 組織を押しわけながら上方へ成長する

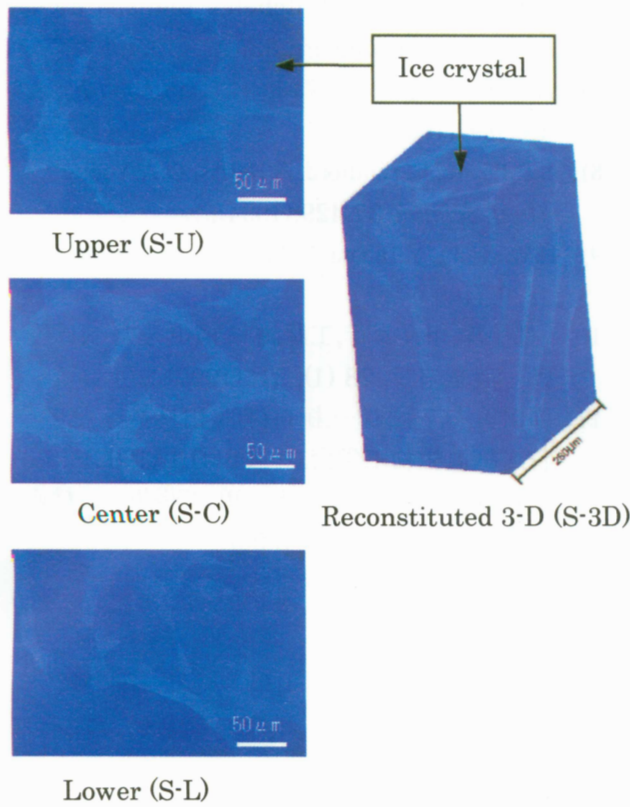


Fig. 6 Cross section and 3-D images (-15°C)

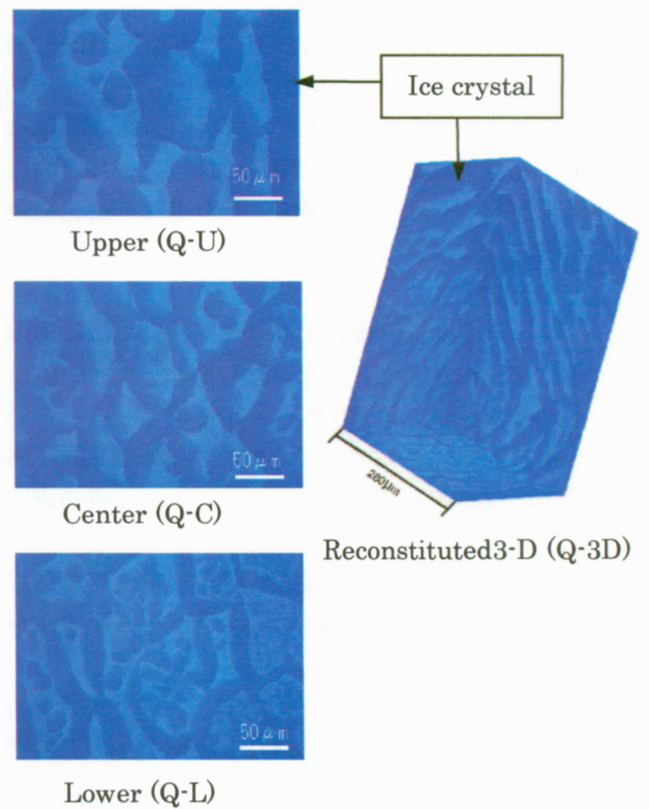


Fig. 7 Cross section and 3-D images (-120°C)

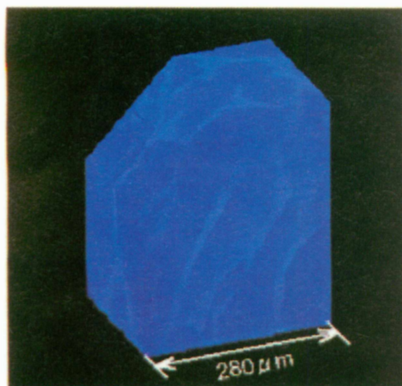


Fig. 8 Reconstituted 3-D image (-15°C)

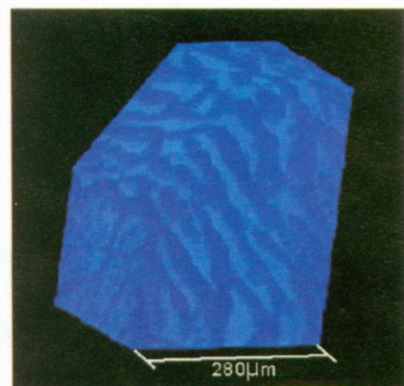


Fig. 9 Reconstituted 3-D image (-120°C)

傾向が観られた。しかし、設定温度が低くなるに伴って細胞内に球状の氷結晶が存在し、氷柱サイズおよび氷柱高さが小さくなる傾向が観察された。これは凍結速度の増加によって氷結晶のサイズが小さくなり、このために氷柱形成能力が組織構造に対し相対的に弱くなり、氷結晶が垂直方向へ連なって形成される氷柱形成能力が低下し、その連続性が失われるためであると考えられる。

## 5. 摘 要

生体の凍結プロセスにおいて凍結材料内に形成される氷結晶を立体的に観察し、さらに、氷結晶の構造、サイズおよびその材料内分布などについて定量的に計測する方法を開発した。具体的には供試材料に生牛肉を選び、その組織を蛍光染色することによって氷結晶を3次元的に観察する方法を提唱した。

得られた断面画像により「急速凍結では細胞内凍結で、氷結晶が小さく、緩慢凍結では細胞外に氷結晶が生成し、そのサイズは大きくなる」という定説が定量的に裏づけられた。また、氷柱は、筋繊維の構造に拘束されて生成していき、凍結速度の増大に伴って氷柱形成能力が組織構造に対し相対的に弱くなり、氷結晶が垂直方向へ連なって形成される氷柱形成能力が低下し、その連続性が失われた。

本研究で開発したシステムは、凍結速度が氷晶の立体的サイズやその材料内分布に及ぼす影響を定量的に計測するツールとして有効であることが検証された。今後、この手法は、氷結晶生成メカニズムの解明、冷凍食品の品質や解凍後の品質評価、さらには生体組織・血液の活性維持などのための最適凍結法の研究開発ツールとして有効利用されることが期待されている。

## 謝 辞

本研究は、日本学術振興会外国人特別研究員の Gab-Soo, DO の課題（課題番号 P00199）の一部であり、文部省科学研究費の補助を受けた成果である。ここに感謝の意を示す。

## 参考文献

- 1) A. Bevilacqua, N.E. Zaritzky, A. Calvelo : *J. Food of Tech.*, **14**, 237, (1979).
- 2) Yau-Ling Chen, Bonnie Sun Pan : *International J. of Food Sci. and Tech.*, **32**, 159, (1997).
- 3) 田中武夫 : 冷凍, **74** (865), 65, 1999
- 4) 熊谷義光 : *REFRIGERATION*, **74** (855), 1, (1999).
- 5) M.N. Martion, N.E. Zaritzky : *J. of Food Sci.*, **53** (6), 1631, (1988).
- 6) J. Evans, J. Adler, J. Mitchell, J. Blanshard, G. Rodger : *Cryobiology*, **33**, 27, (1996).
- 7) A.E. Bevilacqua, N.E. Zaritzky : *J. of Food Tech.*, **15**, 589, (1980).
- 8) S.R. Payne, D. Sandford, A. Harris, O.A. Young : *Meat Science*, **37**, 429, (1994).
- 9) H.W. Kang, Y. Tabata, Y. Ikada : *Biomaterials*, **20**, 1339, (1999).
- 10) 都甲洙, 相良泰行, 工藤謙一, 横田秀夫, 樋口俊郎 : 農業施設, **28** (1), 21, (1997).
- 11) 横田秀夫, 工藤謙一, 樋口俊郎, 相良泰行, 都甲洙 : 低温生物工学会誌, **44** (1), 1, (1998).
- 12) 小林賢知, 樋口俊郎, 青木 勇, 工藤謙一 : 精密工学会誌, **61**(1), 99, (1995).