

1. マイクロスライサ画像処理システムによる氷結晶3次元計測法の開発

Development of Three-dimensional Measurement Methods for Ice Crystals by Utilizing Micro-slicer Image Processing System

キーワード：氷結晶，3次元計測，マイクロスライサ，画像処理，牛肉，蛍光染色，近赤外分光イメージング
Ice crystal, Three-dimensional measurement, Micro-slicer, Image processing, Beef, Fluorescence staining, Near-infrared spectroscopic imaging

相良 泰行^{*} Yasuyuki SAGARA

荒木 徹也^{*} Tetsuya ARAKI

1. はじめに

一般に、生体や食品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。凍結現象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形成される^{1,2)}。通常、凍結操作は3次元的に行われ、材料そのものも固有の3次元内部構造・成分および物性を持っている。したがって、これらの材料における熱移動現象は、3次元情報に基づいて理論的解析または数値シミュレーションにより解明されるものと考えられる。しかし、これまで物質固有の情報、特に3次元内部構造・成分情報の計測が困難であったため、凍結操作に伴う凍結速度の推算や結晶成長挙動などの解析においては、対象材料を均一とみなした数理モデルに依存してきた。しかし、これらのモデルによる推算結果には本質的に上述した仮定に起因する誤差が含まれ、得られた結果の実用操作への適用が困難と判断される場合も多発している現状にある。

このような現状を打開するために、筆者らは対象とする試料を連続的に切削し、露出した試料断面をCCDカメラでワークステーション内に取り込み、3次元像を構築する機能を有する「マイクロスライサ画像処理システム」により、生体や食品内に生成される氷結晶を3次的に観察・計測する方法を開発した。しかし、このシステムによる凍結試料の温度維持能力は-40℃であり、また、供試料の組織を蛍光染色するなど、氷結晶と組織を識別するための前処理を必要とした。この前処理と凍結試料をシステムにセットする間の試料温度上昇により、組織や氷結晶のオリジナルな形態に変形が生じることが危惧されてきた。近年、筆者らはこれらの諸問題を解決することを目的とし、近赤外分光法の原理を応用した「極低温マイクロスライサ分光画像処理システム」を試作した。

本稿では、生体や食品内に形成される氷結晶の形態計

測法について概説するとともに、マイクロスライサの機能を利用した3次元氷結晶計測システム開発の経緯と進展について紹介する。

2. 氷結晶観察法の概要

氷結晶の成長過程においては、ある氷結晶の粒径が周囲の氷結晶よりも大きい場合、オストワルドのライプニング効果によって、この氷結晶が小さな氷結晶を吸収し、大きな氷結晶の成長が促進される。特に最大氷結晶生成帯においては、ライプニングによって大きい氷結晶が生成しやすくなるため食品の物理的障害が引き起こされ、品質が低下することがわかっている。

氷結晶の生成メカニズムに関する定性的な知見は数多く存在するが、これらを定量的に解析した研究は数少なく、特にその形態を3次元的に計測した報告は数少ない現状にある。

氷結晶の観察法は、観察時の氷結晶の性状により、間接観察法と直接観察法に分けられる。間接観察法には、凍結置換法、凍結固定法および凍結乾燥法がある。凍結置換法は、凍結試料を低温で親水性溶液に浸漬し、氷結晶を溶剤と置換する方法である。凍結固定法は、凍結試料をグルタルアルデヒド溶液に浸漬して他のアミノ酸との共有結合を促進させ、試料の構造をより強固にする方法である。凍結乾燥法は、凍結・乾燥プロセスを経て昇華したあとの氷結晶の痕跡を観察する方法である。これらの間接観察法は、置換または昇華プロセスの後において、元の氷結晶構造が維持されるという仮定に基づくものである。しかし、この仮定が妥当かどうかを検証することは困難である。たとえば、筆者らの観察によると、原理的には試料固有の形態を維持可能な方法とされている凍結乾燥法においても、氷結晶の昇華プロセスにおけ

^{*}東京大学大学院 農学生命科学研究科
The University of Tokyo, Graduate School of Agricultural and Life Sciences
原稿受理 2007年12月27日

る試料形態の変化を完全に防止することは困難である。また、これらの手法によって、氷結晶のサイズや分布状態などの二次元情報は得られるが、これらの三次元情報を定量的に把握することは不可能である。

直接観察法には、低温走査型顕微鏡 (Cryo-SEM)、冷凍顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡などがあり、いずれの手法も低温条件下で試料を直接観察する方法である。Cryo-SEMによる観察では、試料の凍結によって構造の固定が可能であるが、氷結晶形態の凍結速度依存性を定量的に把握するためには、高度な技術の習熟が必要である。また、装置のコストも高いために冷凍食品製造の現場では普及していない。

冷凍顕微鏡観察法は、円筒型の容器を顕微鏡ステージに載せ、その容器の内部雰囲気を液体窒素とヒータを用いて制御しながら観察する手法である。この手法では、凍結・解凍速度と凍結乾燥条件の制御が可能であるが、サイズの大きい試料の観察には不向きである。

これまで述べたように、従来の氷結晶形態計測法にはそれぞれ技術的得失があり、計測結果の評価にも常に困難を伴う場合が多かった。そこで筆者らは、これらの諸問題を解決することを目的として、東京大学大学院工学系研究科の樋口俊郎教授のグループが開発した「マイクロスライサ」の機能を利用した氷結晶三次元形態計測法を考究してきた。次節以降には、これらの研究の経緯と最新システム開発の現状について概説する。

3. マイクロスライサ画像処理システム^{3.8-10)}

3.1 システムの構成

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。本システムはパラフィンおよび凍結包埋した試料を連続的に切削、すなわちマルチスライシングして、その断面を露出させるマイクロスライサ部を含む①断面像作成装置、露出した二次元断面像をCCDカラーカメラで取り込む②断面画像取込装置、取り込んだ原画像をレーザーディスクに収録する③画像記録装置、記録した原画

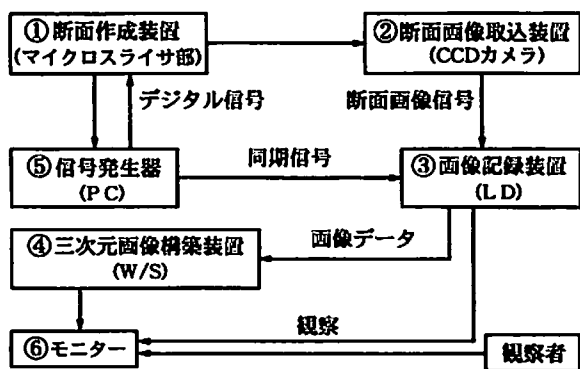


図1 マイクロスライサ画像処理システムブロック図

像の情報に基づきボリュームレンダリング法により三次元画像を再構築したり、実際には切断していない任意の試料断面画像を再構成して表示するなど、画像情報処理を行うワークステーションとしての機能を有する④三次元画像構築装置、マイクロコンピュータにより上記装置①のスライスと③の記録タイミングを同期させるための信号を発生する⑤信号発生器、および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⑥モニターで構成される。

3.2 スライサ部の構成と機能

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 (図3, 5)。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観察用切片の画像を取り込む方法を探らず、包埋剤で冷却固定化した試料をマイクロスライサにより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

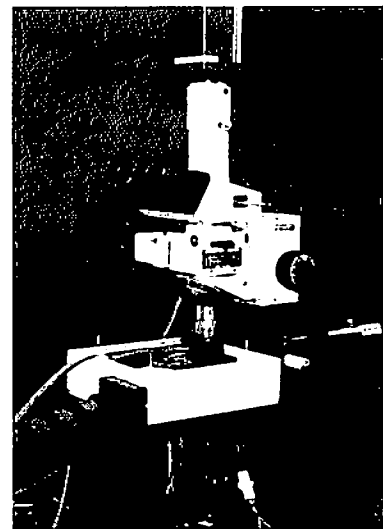


図2 小型のマイクロスライサ

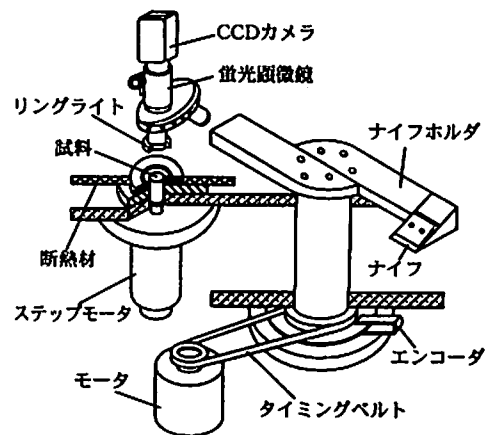


図3 小型のマイクロスライサ部

形を少なくし、また、固定試料の作成にも熟練を要しないなどの利点を得られた。マイクロスライサ画像処理システムは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機種を試作した。

小型のマイクロスライサ画像処理システムとそのマイクロスライサ部を図2と3に示す。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、ガラスナイフを用い、60 rpmで回転するスピンドル上端部に装着したナイフホルダの先端部分に取り付け、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、押し上げストローク22 mm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、回転刃の軸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。試料断面画像は光学あるいは蛍光顕微鏡とCCDカメラ (SONY: DXC-930) および超長焦点距離の対物レンズ (M Plan Apo: Mitutoyo) を用い100倍まで観察可能である。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°C に維持可能である。

図4と5に大型マイクロスライサ画像処理システムとそのマイクロスライサ部を示す。切削最小厚さは試料の押し上げストローク100 mmに対し $10 \mu\text{m}$ である。切削用ナイフはマイクロトームまたは超硬合金製のナイフを使用する。断面画像は試料の大きさによりCCDカメラ (SONY: DXC-930) とこれに接続したレンズ (Canon: マクロレンズPH $\times 10\text{BM}$, またはクローズアップレンズCL-UP67-240) を組み合わせて撮像する。

3.3 画像処理法とシステムの測定精度

一時記録したアナログ画像データはビデオ入力ボードを介してワークステーションに送り、デジタルデータに変換後、光磁気ディスクに記録し、これを画像処理に供する。図6に画像処理により円錐試料の表面積と体積を

求める手順を概念図として示した。この図に示すように、両者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。測定精度は、1) 試料の切削厚さ、2) 切削した円錐台試片を円盤とみなして計算することによる誤差、3) ワークステーションで取り扱うデジタル画像データのピクセル長 (25.8 または $54 \mu\text{m}$)、4) 撮像の2値化操作に必要なRGBスケールの閾値の設定変化に伴うピクセル・カウント数の変動、などに依存するものと考えられる。

そこで、本システム自体の表面積・体積の大まかな測定精度を把握することを目的とし、図に示すような色鉛筆芯用材料 (通称: クービー色鉛筆) を旋盤で精密加工した円錐形テストピースを厚さ $30 \mu\text{m}$ で切削し、表面積と体積を求めた。その結果、ピクセル長 $54 \mu\text{m}$ で画像処理した表面積には約10%、体積には約1%の誤差が含まれることがわかった。さらに、表面積の測定精度を向上させるために、ピクセル長 $25.8 \mu\text{m}$ で処理した結果、測定誤差は約8%に減少することがわかった。

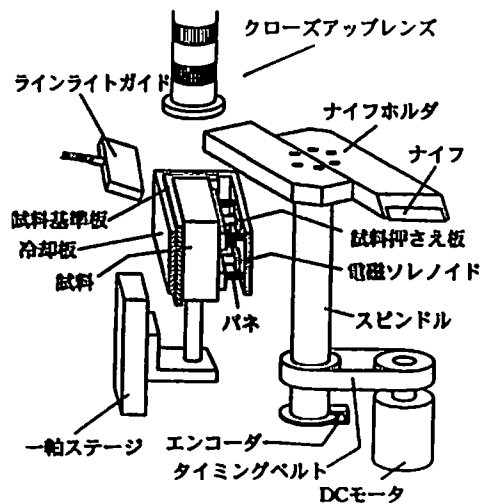


図5 大型のマイクロスライサ部



図4 大型のマイクロスライサ

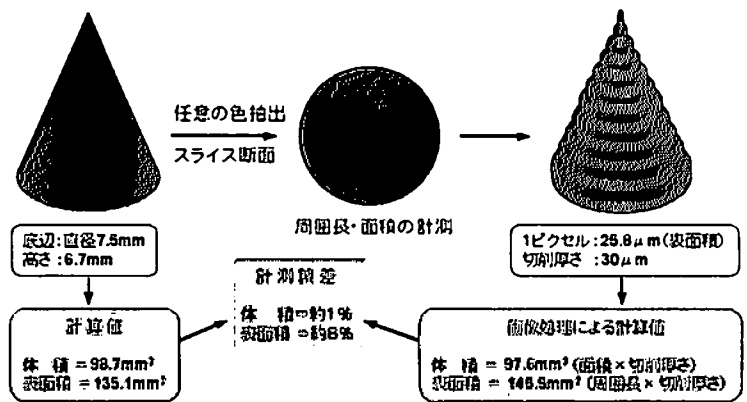


図6 計測法の手順と体積・表面積測定誤差の検証

4. 供試試料および方法

4.1 試料の準備

供試試料に生牛肉を選んで、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, CMF₂HC, Molecular Probes) 溶液に約3時間浸漬して染色した。この試料を -30°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を行った。蛍光試薬により染色された筋繊維を図7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、牛肉細胞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 計測法

図8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、図8に示すパラフィン製サンプルホルダに充填した。試料凍結中の熱流速を計測するために、試料底部に銅柱を挿入し、さらにサン

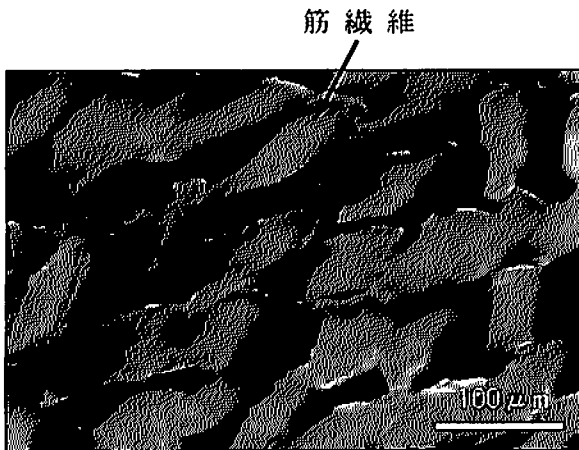


図7 蛍光試薬により染色された筋繊維

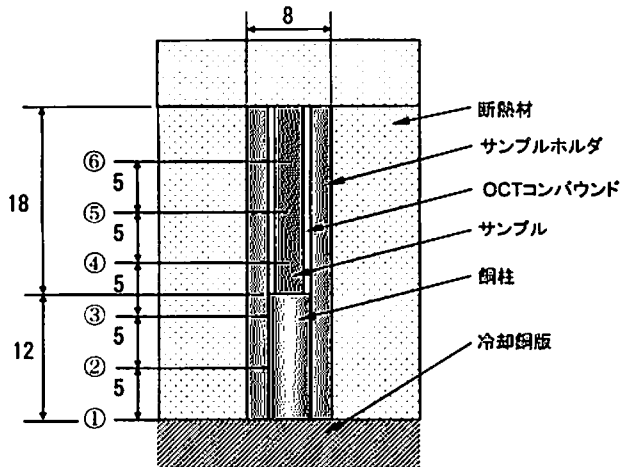


図8 サンプルホルダと試料の固定状態

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5 mm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。

試料は液体窒素ガスを冷媒とするプログラムフリーザ槽の上面部に設けた冷却銅板の上にサンプルホルダ底面を接触させて凍結した。冷却銅板の表面温度は室温から -150°C の範囲で一定値に制御可能である。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 ($0^\circ\text{C} \sim -5^\circ\text{C}$) 通過時間に影響されるため、この比較のために試料の凍結は氷結晶が大きくなる緩慢凍結 (-15°C) と氷結晶が小さくなる急速凍結 (-120°C) をそれぞれ2時間行った。凍結した試料は蛍光顕微鏡を用い、切削回転数60 rpm、切削厚さ $5\mu\text{m}$ で連続的にスライスした。

5. 凍結牛肉中の氷結晶観察

図9と10に蛍光染色した試料を設定温度 -15°C (Slow freezing : S), -120°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8に示した温度測定箇所④を中心に厚さ1 mm (上下0.5 mm) 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ている。

図9のS-U, C, Lに示すように、設定温度 -15°C の試料断面画像で観察された氷結晶は、直径 $70 \sim 150\mu\text{m}$ の

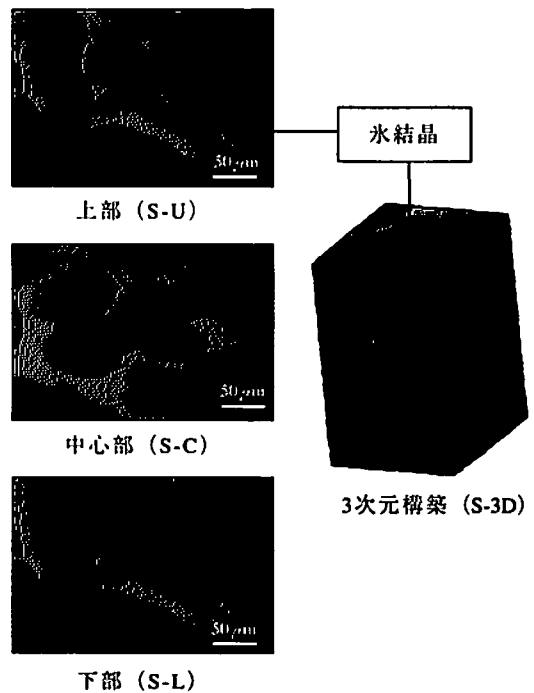


図9 断面画像と3次元構築像 (-15°C)

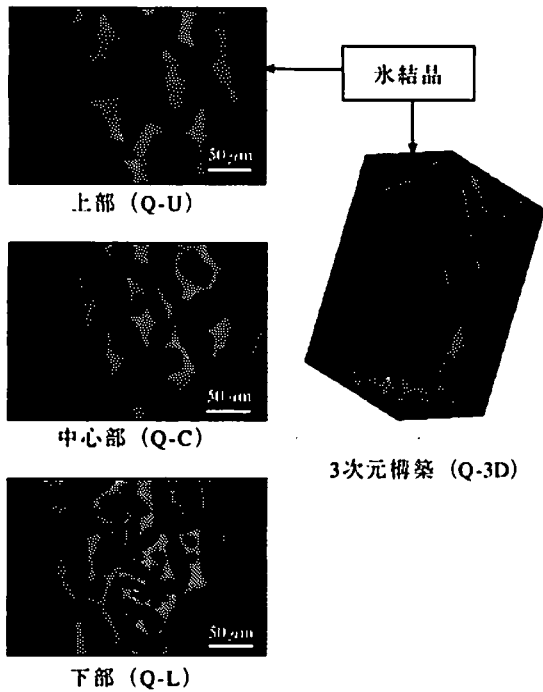


図10 断面画像と3次元構築像 (-120℃)

丸みを帯びた不定形な形状を示し、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、凍結速度が遅くなるにしたがって上部断面画像に示されるように、氷結晶は筋繊維を圧迫して取りまくように発達し、球形に近い形状を示すことがわかった。

設定温度-120℃で凍結した断面画像を図10-Q-U, C, Lに示す。試料の下部(Q-L)では細胞内に単体として球形の氷結晶が形成され、その直径は10~20μm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30μm程度であり、上部(Q-U)では直径50μm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。

これらの図に示すように、凍結により生成される氷結晶のサイズ、分布、構造は冷却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「緩慢凍結において氷結晶は細胞外に生成し、その大きさは細胞間の水分を吸収して大きくなり、急速凍結では氷結晶が細胞内に生成し、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。

6. 氷結晶の3次元構築

図9(S-3D)と図10(Q-3D)に設定温度-15℃、-120℃で凍結した試料の3次元構築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わかる。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分けながら上方へ成長する傾向が観られた。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。これは凍結速度の向上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球形を形成してゆく能力、すなわち、柱形成能力が低下し、その連続柱が失われるためであると考えられた。

7. 近赤外分光イメージングシステムの開発

これまで述べたシステム(以下、従来型システムと称す)では凍結試料を観察する場合、下記の問題点が指摘されてきた。

- 1) 観察サンプルはプログラムフリーザで凍結後、マイクロスライサ部に移設する必要があり、このハンドリング時間にサンプルの温度上昇による氷結晶性状の変化が生起する可能性がある。
- 2) マイクロスライサにセットした試料温度は-40℃に維持可能であるが、極低温領域(-80℃程度)における観察は不可能である。
- 3) 蛍光染色法では氷結晶の直接観察が不可能であり、また、試料の前処理、すなわち蛍光染色による試料固有の形態変化防止が困難である。

このような問題点を改善するために、システムの機能を拡大・強化した極低温マイクロスライサ分光画像処理システム(Cryogenic Micro-Slicer Spectral Imaging System: CMSIS)を開発した。具体的にはこれまでに、1)本システムの基本機能とする近赤外分光イメージングを用いた氷結晶性状の可視化法を開発し、2)この機能をシステムとして実現するための機器仕様を選択およびシステム設計と試作を行い、現段階では3)試作システムの性能試験結果に基づいて開発目標の達成度と今後の改善指針を明らかにしつつある。

以下に、CMSISの主な開発目標およびシステムの概念図を図11に示す。

- 1) マイクロスライサ部に温度履歴測定部と切削観察部を持ち、この2つの観察部分に同一のサンプルをセットする。これらのサンプルの底面温度を等速度・等温度に制御・維持する。
- 2) 観察部の冷却媒体として液体窒素を用いることにより、-80℃以下の極低温領域における計測を可能とする。
- 3) 撮像系装置類の容易な交換を可能とし、多目的計測

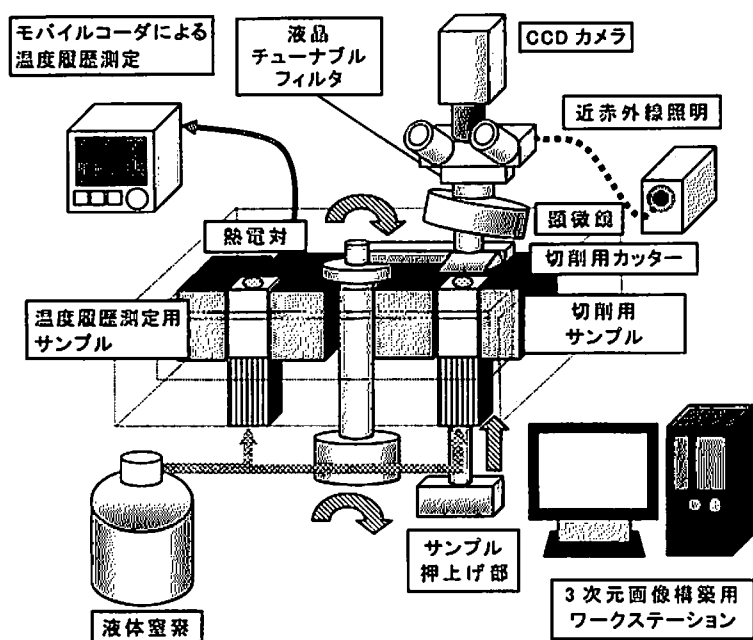


図11 極低温マイクロスライサ分光画像処理システム

に対応する。

- 4) 近赤外分光イメージング法により試料内部構造・成分（氷結晶）分布の3次元画像処理を可能とする。

本システムの基本性能試験結果などについては、2007年度本学会年次大会にて発表済みであるので参照されたい。

8. おわりに

食品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「マイクロスライサ画像処理システム」の機能を利用して、供試サンプルを蛍光染色法または近赤外分光イメージング法によって3次的に観察する方法を提唱した。

これらの方法は、従来不可能であった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。また、近赤外分光イメージングによる方法は、従来の氷結晶計測方法、いわゆる試料を凍結乾燥し、昇華した氷結晶の跡を顕微鏡で間接的に観察する方法などとは異なり、氷結晶を直接に観察できることに大きな意味がある。

今後、この手法は氷結晶生成メカニズム解明、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。

文献

- 1) 熊谷義光：冷凍，74 (855)，1 (1999)。
- 2) M. N. Martino and N. E. Zaritzky：J. of Food Sci., 53 (6)，1631，(1988)。
- 3) 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)。
- 4) Hye-Won, Y. Tabata and Y. Ikada：Biomaterials, 20, 1339 (1999)。
- 5) Yau-Ling Chen and Bonnie Sun Pan：International J. of Food Sci. and Tech., 32, 159 (1997)。
- 6) S. R. Payne, D. Sandford, A. Harris and O. A. Young：Meat Science, 37, 429 (1994)。
- 7) A. E. Bevilacqua and N. E. Zaritzky：J. of Food Tech., 15, 589 (1980)。
- 8) 小林賢知，樋口俊郎，青木 勇，工藤謙一：精密工学会誌，61 (1)，100 (1995)。
- 9) 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)。
- 10) 井口征士：計測と制御，31 (9)，968 (1992)。

Summary

Three-dimensional (3-D) structure and distribution of ice crystals formed in frozen bio- and food samples have been measured by utilizing a Micro-slicer Image Processing System. 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 arbitrary cross sections 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. Recently, a Cryogenic Micro-slicer Spectral Imaging System has been developed and successfully applied for direct measurement of ice crystals by using near-infrared spectroscopic imaging.