

近赤外分光法によるデンプン γ 線照射の影響評価

薦 瑞樹*, **, 丸林夏彦***, 等々力節子*, 杉山純一*§, 相良泰行**

* 独立行政法人食品総合研究所

** 東京大学大学院農学生命科学研究科

*** 東京大学農学部

Evaluation of the Effect of γ -Ray Irradiation on Starch by Near-Infrared Spectroscopy

Mizuki Tsuta*, **, Natsuhiko Marubayashi***, Setsuko Todoriki*,
Junichi Sugiyama*§ and Yasuyuki Sagara**

* National Food Research Institute, 2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642

** Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo,

1-1-1 Yayoi, Bunkyo, Tokyo 113-8657

*** Faculty of Agriculture, The University of Tokyo,

1-1-1 Yayoi, Bunkyo, Tokyo 113-8657

In order to evaluate the effect of γ -ray irradiation on starch, near-infrared absorption spectra of four groups of starch samples, control, 10, 20 and 30 kGy irradiated, were measured. By the preliminary analysis, it was revealed that 1702 and 2100 nm were effective in predicting the irradiation dose on starch. On the other hand, samples were divided into calibration and validation set. The multi-regression analysis of the calibration set was carried out with adopting 1702 or 2100 nm as the first wavelength, and the resulting calibration curves were named calibration A and B. Using these calibration curves, the irradiation dose of the validation set was predicted. Although the accuracy of the prediction was poor, it seemed that the non-irradiated and the irradiated samples could be discriminated by an appropriate borderline. Therefore, a new irradiation index was defined as non-irradiated=0 and irradiated=1. In the same way as the case of four groups, calibration C and D, in addition, calibration E, which using 1702 nm only, were developed and the irradiation index of the validation set was predicted. Although there were a few samples that could not be accurately predicted with calibration C and D, there was only one wrong discrimination with calibration E and its prediction accuracy was 96.2%.

(Received Nov. 12, 2004 ; Accepted Jan. 18, 2005)

日本は香辛料のほぼ全量を輸入に頼っている。1999年度には34466トンを輸入しており、輸入元の上位5カ国はマレーシア、中国、インド、インドネシア及びタイである。香辛料は微生物に汚染されやすく、殺菌処理が必要不可欠であり、近年では香辛料独特のフレーバーや色の保持に優れる放射線殺菌の利用が急速に増えている。実際に、上記で述べた日本の主な香辛料輸入元のうち、マレーシア、中国及びタイでは香辛料に対する放射線殺菌が実用化されている¹⁾。香辛料に対する放射線照射及び照射香辛料の流通を適切に管理するためには、香辛料が適正に照射されたか否かを正確に知る必要があるため、香辛料に対する照射線

量を予測する技術の開発が求められている。

一方、代表的な香辛料であるコショウに関しては、 γ 線照射処理を行うと、その粘度が変化するという報告がある^{2)~4)}。したがって、 γ 線照射処理によってコショウの含有成分に変化が起きることが推察され、この成分変化を光学的手法で捉えることができれば、簡便かつ大量に γ 線照射処理を検知する手法が開発可能であると考えられる。

そこで本研究では、コショウの主成分であるデンプンを対象に、 γ 線を照射したデンプンに近赤外分光法を適用し、 γ 線照射の影響評価を行うことにより、照射検知に関する基礎的な知見を得ることとした。

実験方法

1. 試料

図1に、本実験の流れを示す。まず、供試材料として、

* 〒305-8642 茨城県つくば市観音台 2-1-12

** 〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

*** 〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

§ 連絡先 (Corresponding author), sugiyama@affrc.go.jp

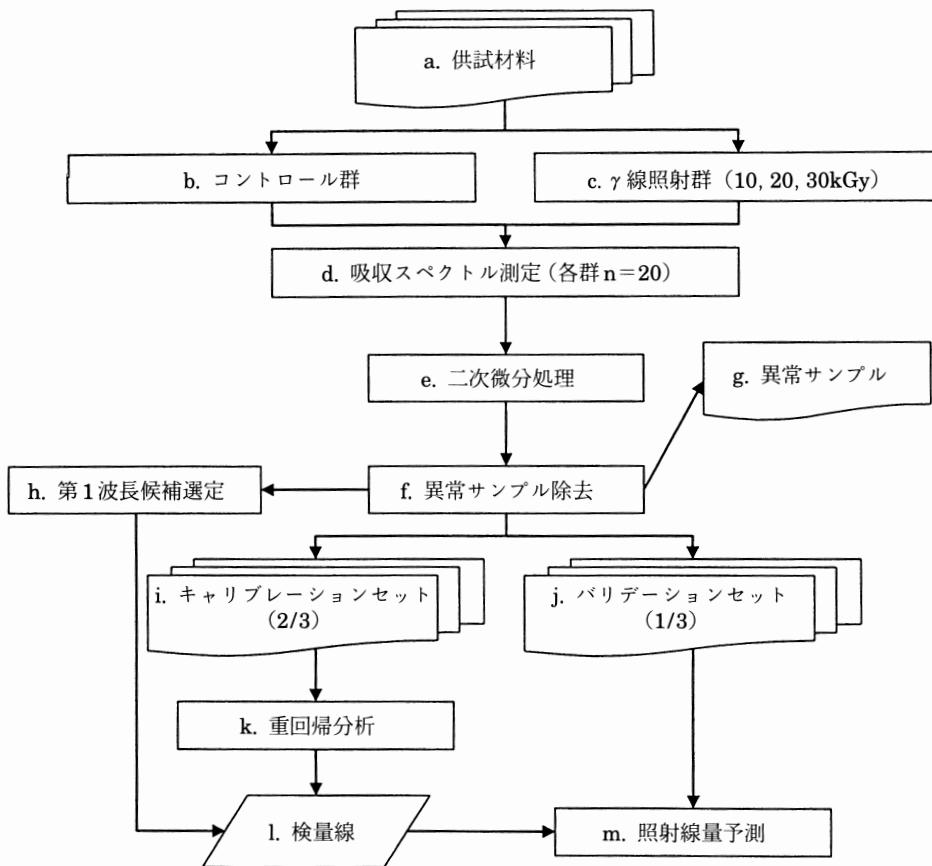


図 1 本研究の流れ

デンプン（トウモロコシ製、和光純薬工業（株））2000 g を用いた（図 1-a）。これを 500 g ずつ 4 群に分け、1 群をコントロール群とした（図 1-b）。残りの 3 群については、独立行政法人食品総合研究所内のコバルト 60 を線源としたガンマセルを用い、室温にて、照射線量率 900 Gy/h でそれぞれ 10, 20, 30 kGy の γ 線照射を行った（図 1-c）。線量は Friche 線量計を用いて測定した⁵⁾。

2. 吸光スペクトル測定

コントロール群より 13 g の試料を抜き出し、粉体試料の吸光スペクトル測定用カップに封入した。次に、近赤外分光分析装置 (NIR6500, Foss NIR Systems Inc.) を用い、1100～2500 nm の範囲で、2 nm おきに吸光スペクトルを測定した。同様にして、コントロール群について、計 20 サンプルの吸光スペクトル測定を行った。また、残りの 3 群についても同様の吸光スペクトル測定を行い、各群 20、合計 80 の吸光スペクトルを得た（図 1-d）。

3. 予備解析

(1) 2 次微分处理

得られた吸光スペクトルのベースライン変動を除去し、極大吸収ピークを強調するため⁶⁾、統計処理ソフト（Excel 2003, Microsoft Inc.）を用いて2次微分処理を行い、2次微分スペクトルを得た（図1-e, 図2）。以後、解析には得ら

れた2次微分スペクトルを用いた。

(2) 異常サンプル除外

一般的に、検量線を作成する際に異常データを含むサンプルが混入していると、検量線の信頼性が低下し、未知試料の予測精度も減少する。そこで、2次微分スペクトルに対して主成分分析を行い、外れ値分析を適用して、異常サンプルを除去した（図1-f）。具体的には、主成分空間における80サンプルの重心を求め、図3に示すように、各サンプルと重心とのマハラノビス距離をヒストグラムで表した上で、箱ひげ図を作成した。箱ひげ図における長方形の中央の線は中央値、上下の辺はそれぞれ75%，25%の4分位点を表している⁷⁾。長方形の上下に伸びるひげの長さは、下記の式で算出される。

上のひげの長さ

=上側 4 分位點 + 1.5 × 4 分位範圍……………(1)

下のひげの長さ

=下側 4 分位點 - 1.5 × 4 分位範圍

ひげの外側に位置するサンプルは外れ値と考えられ、本研究では 10 kGy 照射群から得られたサンプルが一つひげの外側に位置したので、これを異常サンプルと判定し、以降

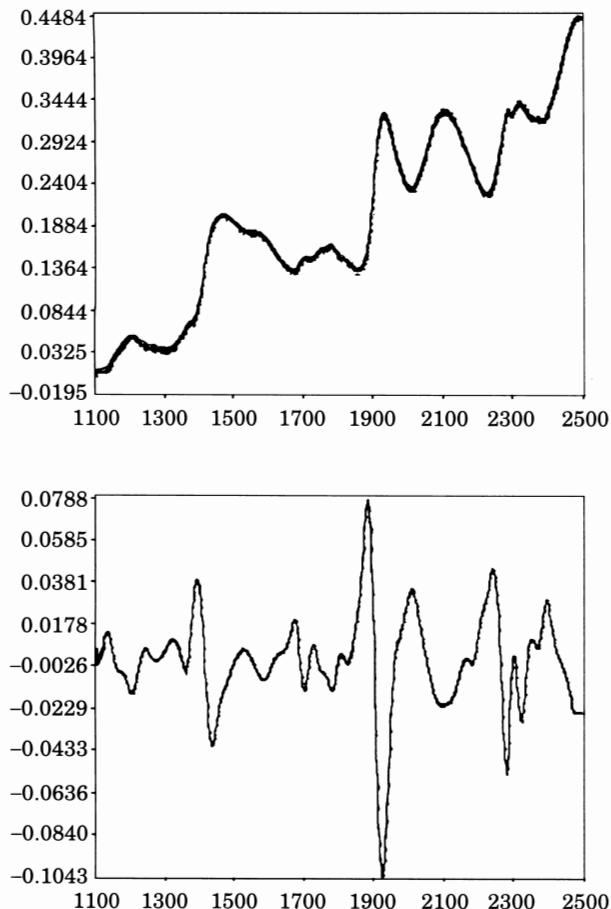


図 2 デンプンの吸光スペクトル（上）と2次微分スペクトル（下）

の解析から除外した(図1-g).

(3) 検量線第1波長候補の選定

近赤外分光法を利用して検量線を作成する際に、パソコンによる自動解析で波長を選択すると、吸光ピークがない波長、あるいは測定対象物質とは異なる物質の吸光ピークが第1波長として選択され、十分な予測精度が得られない場合がある⁶⁾⁸⁾。そのため、測定対象物質の吸収ピークを第1波長として手動で選択した後、残りの波長を自動選択する手法が一般的である。しかしながら、本研究で対象としたデンプン、及びデンプンが分解した際に生じるグルコースには多数の吸光ピークが報告されており⁶⁾⁹⁾、その全てについて検量線を作成し、予測精度を評価するには膨大な手間がかかる。そこで本研究では、異常サンプルを除いた79サンプルに対して予備的に重回帰分析を行い、照射線量の予測に効果的な第1波長の候補を選定した（図1-h）。具体的には、表1に示すように、2次微分スペクトルの吸光ピークのうち、近傍にデンプンあるいはグルコースの吸収帯が存在するものを選び、これらを対象に変数増減法にて照射線量を予測する検量線を作成して、選択された波長を後に述べるキャリブレーションセットの検量線に採用する第1波長の候補として選定した。その結果、表2に示すよ

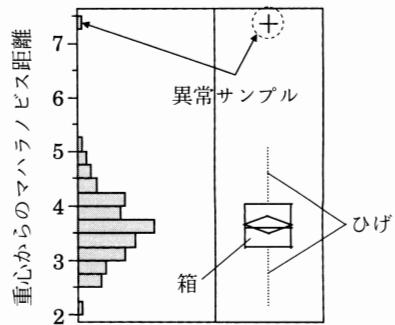


図 3 ヒストグラム（左）と箱ひげ図（右）による異常サンプルの除外

うに、1702, 2100, 2280, 1582 nm の 4 波長が照射線量の予測に適した波長として選択された。この際、ある説明変数と他の説明変数との間に強い相関関係が存在する多重共線性⁶⁾⁷⁾により、検量線の予測精度が低下する現象を避けるため、VIF (Variance Inflation Factors; 分散拡大要因) を基準として検量線に採用する波長をさらに限定した。VIF は、i 番目の説明変数を、残りの説明変数で回帰した際の重相関係数を R_i とおき、下記の式 1 で定義される指標である⁷⁾。

VIF の値が 1 の場合、変数 i と他の変数間には相関関係はなく、VIF の値が大きくなるほど、相関関係が強いと判断できる。本研究では、一回の変数増減毎に採用された全ての波長について VIF を算出し、「やや強い相関関係」が示唆される 2.7 を閾値として⁷⁾、VIF の最大値がこれを超えない波長を第 1 波長の候補とした。以上により、照射線量の予測に有効で、かつ他の波長との多重共線性が少ない波長が選択され、表 2 右端にあるとおり、1 702 及び 2 100 nm の 2 波長が、第 1 波長の候補として選定された。

(4) キャリブレーション・バリデーションセットの作成

照射線量の予測精度を検証するためには、検量線を作成するだけでなく、その検量線を用いて未知試料の照射線量を予測し、その精度を検証する必要がある。そこで本研究では、異常サンプルを除いた79サンプルの3分の2を検量線作成用のキャリブレーションセット、残り3分の1を未知試料であるバリデーションセットとした(図1-i, j)。具体的には、全サンプルを照射線量順に並べ替え、 k を整数として、 $3k-2$ 及び $3k-1$ 番目のサンプルをキャリブレーションセット、 $3k$ 番目のサンプルをバリデーションセットに指定した。その結果、 $n=53$ のキャリブレーションセットと、 $n=26$ のバリデーションセットを得た。

4. 檢量線作成

キャリブレーションセットを対象に、2次微分吸光度と照射線量について重回帰分析を行った(図1-k)。この際、3.(3)で第1波長候補となった1702 nmを第1波長に指定

表1 デンプンの2次微分スペクトルにおけるピーク波長と近傍吸収波長帯の帰属

2次微分スペクトルの ピーク波長 (nm)	近傍の吸収波長帯 (nm) とその帰属	
	デンプン	グルコース
1200	—	1196
1270	—	1264
1360	1360	—
1436	1440	—
1582	1580	1580
1702	1700	—
1780	1780	—
1826	1825	—
2100	2100	—
2280	2282	2280
2322	2320	—
2368	—	2368

表2 検量線の第1波長候補の選定

変数増減 回数	選択波長 (nm)				VIF の 最大値	第1波長 候補
1	1702	—	—	—	—	適
2	1702	2100	—	—	2.205	適
3	1702	2100	2280	—	4.009	不適
4	1702	2100	2280	1582	5.186	不適

表3 照射線量予測検量線とその精度

検量線名	選択波長 (nm)		相関係数	SEC (kGy)	SEP (kGy)
	第1波長	第2波長			
A	1702	2018	0.898	5.104	5.829
B	2100	1700	0.825	6.549	5.760

した検量線を検量線A, 2100 nmを第1波長としたものを検量線Bとした(図1-l). また、VIFが2.7を超えない範囲で変数増減法を適用し、第2波長以降の波長を選択した。さらに、それぞれの検量線について、相関係数及び照射線量の実測値と予測値の残差の標準誤差であるSEC(Standard Error of Calibration)を求め、その妥当性を検証した。

5. 予測精度の検証

検量線A, Bをバリデーションセットに適用し、照射線量を予測した(図1-m). また、照射線量の実測値と予測値の残差の標準誤差であるSEP(Standard Error of Prediction)を求め、その精度を検証した。なお、以上の3.(2)以降のデータ解析には、統計解析ソフト(JMP 5.1.1, SAS Institute Inc.)を用いた。

実験結果及び考察

1. 検量線

キャリブレーションセットの2次微分スペクトルと照射線量に対する重回帰分析の結果、以下に示す検量線A, Bが得られた。

$$\begin{aligned} \text{予測照射線量} &= 4.831 \times 10^2 + 2.006 \times 10^5 d^2 A_{1702} \\ &\quad + 8.808 \times 10^4 d^2 A_{2018} \dots \text{検量線 A} \\ \text{予測照射線量} &= 1.468 \times 10^3 - 6.121 \times 10^4 d^2 A_{2100} \\ &\quad + 1.849 \times 10^5 d^2 A_{1700} \dots \text{検量線 B} \end{aligned}$$

($d^2 A_\lambda$: 波長 λ における二次微分吸光度)

表3に検量線A, Bで採用された波長、相関係数、SECを示す。両者とも相関係数が0.9に及ばず、SECは5 kGy以上であった。あるデータ群が正規分布に従う場合、平均士標準偏差の範囲外に約30%のデータが存在することが知られている。したがって、SECが5 kGyを超えるということは、予測値の30%以上が実測値より5 kGy以上大きい、

あるいは小さいことを示し、各群間の照射線量の差が10 kGyである本研究においては、隣り合う群間で30%以上のサンプルが重なり合うことを意味する。図4左に、キャリブレーションサンプルの照射線量実測値と、検量線A及びBによる予測値をプロットした図を示す。各群間でサンプルが重なり合っている様子が明確であり、両者とも照射線量の検量線としては妥当ではないことが示唆された。しかしながら、検量線Bにおいては、コントロール群と他の3群との間にはほぼ重なり合う部分がなく、図4の左下に示す点線のように、両者の境界線を引くことが可能であると考えられ、適切な判別条件を設定することにより、非照射・照射サンプルを判別することが可能であると推測された。

2. 予測精度

表3右端に、検量線A, Bを用いてバリデーションセットの照射線量を予測した際のSEPを示す。SECと同様、SEPも5 kGyを超えており、両者とも未知試料の照射線量予測には不適当であると考えられた。しかしながら、図4右下に示すように、キャリブレーションセットと同様、適切な判別条件を設定することにより、未知試料の非照射・照射の判別が可能になると考えられた。そこで、非照射=0, 照射=1となる照射指標を新たに設定し、全サンプルを非照射・照射の2群に分割した上で、2次微分スペクトルと照射指標について、4群に分けた場合と同様にして検量線の作成、評価及び未知試料の検定を行うこととした。

3. 非照射/照射サンプルの判別

(1) 検量線

4群の場合と同様に、キャリブレーションセットを対象に、VIFが2.7を超えない範囲で変数増減法を適用し、2次微分吸光度と照射指標の検量線を作成した。この際、下記の通り、1702 nmを第1波長に指定した検量線を検量線C, 2100 nmを第1波長としたものを検量線Dとした。

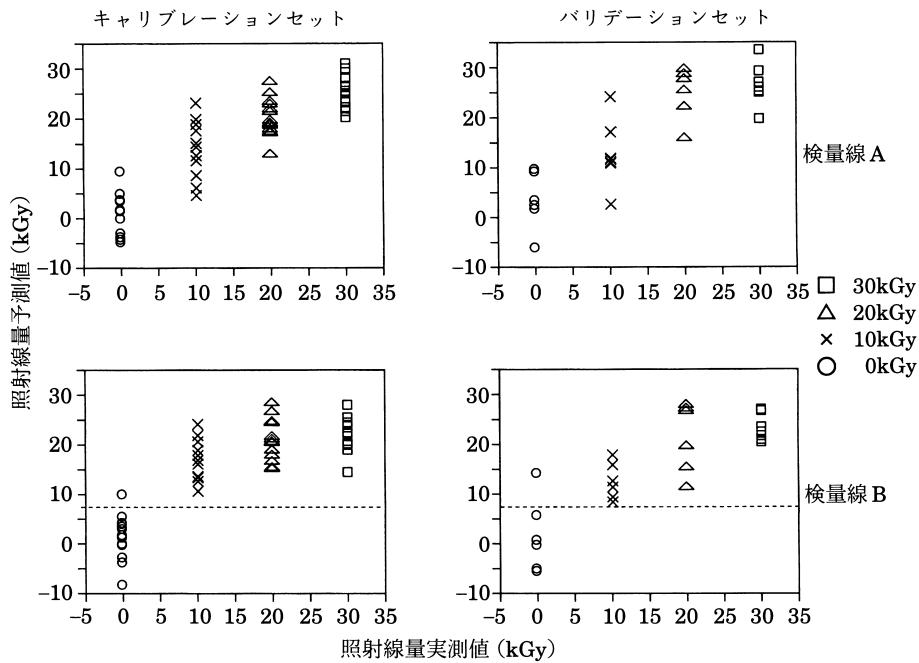


図4 照射線量予測検量線の適用結果

表4 非照射・照射判別用検量線とその精度

検量線名	選択波長 (nm)				相関係数	SEC	SEP
	第1波長	第2波長	第3波長	第4波長			
C	1702	1468	1536	2222	0.954	0.139	0.258
D	2100	1700	—	—	0.909	0.189	0.249
E	1702	—	—	—	0.895	0.200	0.227

$$\text{予測照射指標} = 2.311 \times 10 + 3.710 \times 10^3 d^2 A_{1702} - 2.276 E \times 10^3 d^2 A_{1468} \quad \dots \dots \dots \text{検量線 C}$$

$$\text{予測照射指標} = 7.240 \times 10 - 8.997 \times 10^2 d^2 A_{2100} + 6.655 \times 10^3 d^2 A_{1702} \quad \dots \dots \dots \text{検量線 D}$$

表4に、検量線C, Dで採用された波長、相関係数、SECを示す。両者とも相関係数は0.9以上、SECは0.2以下であった。特に前者においては、SECが0.139と小さな値であり、非照射サンプルと照射サンプルの照射指標予測値が重なり合わないことが期待された。図5左にキャリブレーションサンプル照射指標の実測値と、検量線C及びDによる予測値をプロットした図を示す。両者とも非照射群と照射群を明確に区別でき、 γ 線の非照射・照射を予測する検量線として妥当であることが示唆された。そこで、両群を判別する条件を設定し、未知試料の非照射・照射判別を試みることとした。

(2) 判別条件の設定

図6に判別条件の設定方法を示す。まず、キャリブレーションセットにおいて、非照射群・照射群個別に、検量線C及びDによる照射指標予測値の平均 \bar{x} , \bar{y} 及び標準偏差

σ_x , σ_y を算出した。次に、図6中の点線に示すように、非照射群の上側95%信頼限界 $\bar{x}+2\sigma_x$ 及び照射群の下側95%信頼限界 $\bar{y}-2\sigma_y$ を算出した。さらに、照射指標の予測値が前者より下に位置すれば非照射サンプル、後者より上に位置すれば照射サンプルと判定することとした。なお、両信頼限界の間の部分(図6網掛け部分)を境界領域とし、照射指標の予測値がここに含まれるサンプルについては、判定不能とすることとした。

(3) 予測精度の検証

表4右端に、検量線C及びDを用いてバリデーションセットの照射指標を予測した際のSEPを示す。両者ともにSECよりも1.3~2倍程度増加しており、検量線がキャリブレーションセットにのみ適合し、バリデーションセットなどの他の試料への適合度が低下する過剰適合⁶⁾が生じていることが示唆された。また、図5右に、バリデーションセットの照射指標実測値と、検量線C及びDによる予測値をプロットした図を示す。図中の網掛け部分は前項で設定した境界領域である。さらに、表5に各検量線による照射指標の予測結果を示す。検量線Cにおいては、非照射サンプルのうち1つ、照射サンプルのうち4サンプルが判

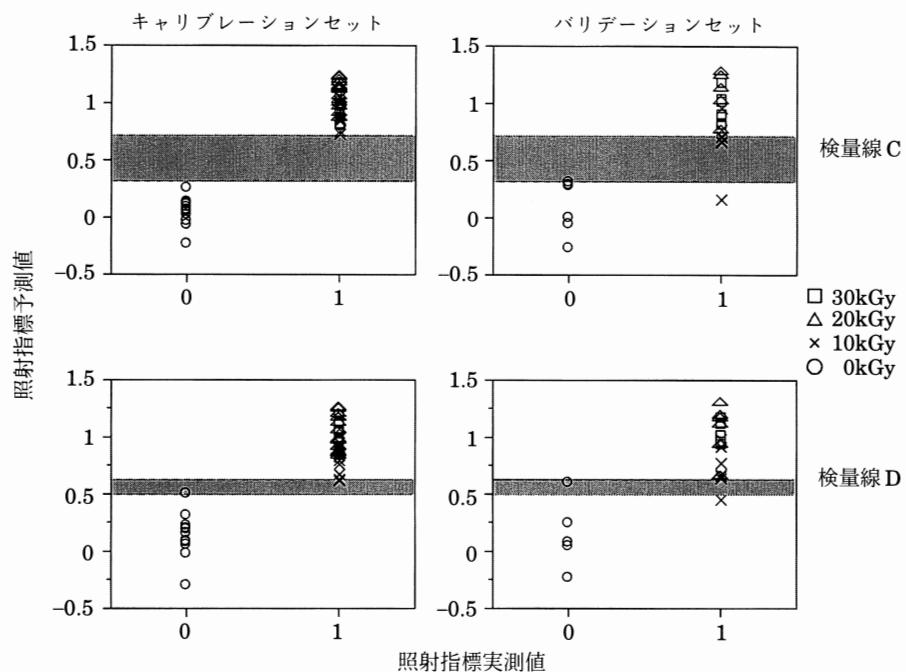


図5 非照射・照射判別用検量線の適用結果

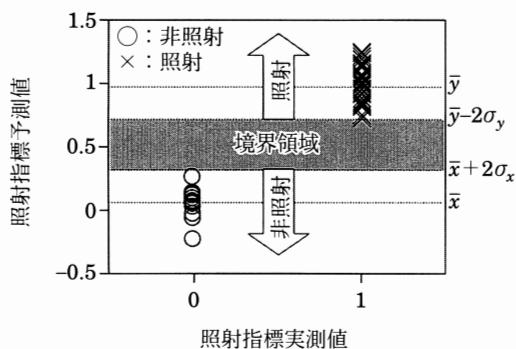


図6 判別境界の設定方法

別不能であり、照射サンプルのうち1サンプルが非照射サンプルと誤判別され、正答率は76.2%であった。また、検量線Dにおいては、非照射サンプルのうち1つが判定不能であり、照射サンプルのうち1サンプルが非照射サンプルと誤判別され、正答率は92.3%であった。検量線Cについては、正答率が低かったこと、また、誤判別となったサンプルが境界領域の下方、非照射サンプル群の分布域の中央付近に位置していることからも、過剰適合が生じていることが示唆された。一般的に、重回帰分析において、説明変数を多く採用しすぎると過剰適合が生じることが知られており、検量線Cにおいては4つの波長が選択されていることから、冗長な波長が採用されていると考えられた。そこで、検量線Cの第1波長、1702 nmのみを用い、未知試料の非照射・照射の検知を試みることとした。

(4) 単一波長による非照射/照射サンプルの判別

表5 照射指標の予測結果

		照射指標予測値			正回答率 (%)
		非照射	照射	判定不能	
検量線 C	非照射	5	0	1	76.9
	照射	1	15	4	
検量線 D	非照射	5	0	1	92.3
	照射	1	19	0	
検量線 E	非照射	6	0	0	96.2
	照射	1	19	0	

キャリブレーションセットを対象に、1702 nmにおける2次微分吸光度と照射指標に回帰分析を適用し、下記の通り検量線Eを作成した。

予測照射指数

$$= 7.110 \times 10 + 5.491E \times 10^3 d^2 A_{1702} \quad \dots \text{検量線 E}$$

表4最下段に、検量線Eの相関係数、SEC及びバリデーションセットに適用した際のSEPを示す。相関係数は検量線C,Dに比べて低いものの、SEPがSECの1.1倍程度であり、SECの値自体も検量線C,Dに比べて低下した。また、図7に、キャリブレーションセット及びバリデーションセットの照射指標実測値と、検量線Eによる予測値をプロットした図を、表5最下段に予測結果を示す。検量線Eによる予測では、照射サンプルのうち1サンプルが非照射サンプルと誤判別されたのみで、正答率は96.2%であった。また、誤判別したサンプルの位置も境界領域に直

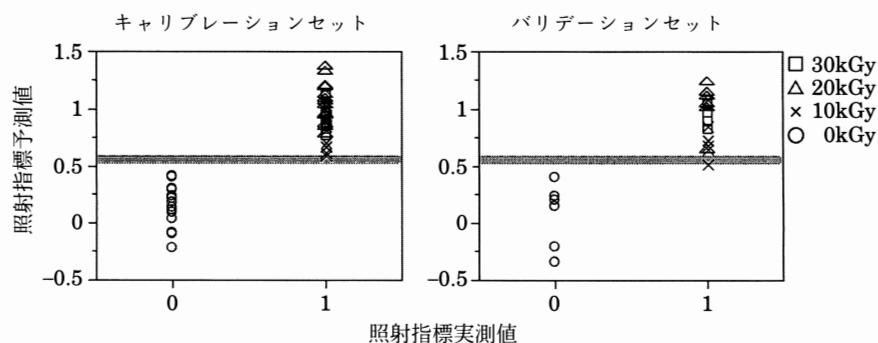


図 7 単一波長による非照射・照射判別用検量線の適用結果

下であること、SEPとSECの差が小さいことから、過剰適合がなく、検量線C及びDに比べて精度の高い安定した検量線が得られたと考えられた。

要 約

デンプンに対する γ 線照射の影響を評価するため、コントロール及び γ 線照射線量10, 20, 30 kGyの4群のデンプン試料に対して、1100~2500 nmの範囲で近赤外分光スペクトルを計測した。予備的に重回帰分析を行い、照射線量予測に有効な波長として1702 nm及び2100 nmを選定した。また、試料全体を2/3のキャリブレーションセットと1/3のバリデーションセットに分割し、キャリブレーションセットに重回帰分析を適用して、選定された2つの波長を第1波長とする検量線A及びBを作成した。これらの検量線を用いてバリデーションセットの照射線量を予測したところ、予測精度は低かったものの、適切な境界線を設定することにより、未知試料の非照射・照射を判別することが可能であることが示唆された。そこで、非照射=0、照射=1とする照射指標を新たに設定し、4群の場合と同様にして、キャリブレーションセットを用いて検量線C及びDを作成した。それぞれの検量線における非照射群、照射群の照射指標の平均及び標準偏差を求め、両者の95%信頼限界及び境界領域を設定し、バリデーションセットの非照射・照射を予測した。その結果、誤って判別される、あるいは判別不能なサンプルがあり、特に検量線Cについては予測精度が76.2%にとどまった。これは、説明変数が多く採用しそぎ、過剰適合が生じたためと考えられたので、1702 nmの1波長のみを用いて検量線Eを作成し、同様に判別条件の設定とバリデーションセットの非照射・照射を予測した。その結果、誤判別は1件にとどまり、判別

精度も96.2%に向上したので、過剰適合がなく、精度の高い安定した検量線が得られたと考えられた。

本研究の一部は、日本学術振興会の助成により遂行されました。ここに謝意を表します。

文 献

- 等々力節子、食品照射技術の世界的動向、日本食品保藏学会誌、**26** (6), 339-347 (2000).
- Hayashi, T., Todoriki, S. and Kohyama, K., Applicability of Viscosity Measuring Method to the Detection of Irradiated Spices, 日食工誌, **40** (6), 456-460 (1993).
- Hayashi, T., Todoriki, S. and Kohyama, K., Irradiation Effects on Pepper starch Viscosity, *J. Food Sci.*, **59** (1), 118-120 (1994).
- Hayashi, T., Todoriki, S., Okadome, H. and Kohyama, K., Conditions of Viscosity Measurement for Detecting Irradiated Peppers, *Radiat. Phys. Chem.*, **45** (4), 665-669 (1995).
- International Atomic Agency, Training manual on food irradiation technology and techniques, 2nd ed. Technical report series No. 114. (International Atomic Agency, Vienna.) (1982).
- 岩本睦夫, 河野澄夫, 魚住 純, 「近赤外分光法入門」, (幸書房, 東京), pp. 40-95 (1994).
- 廣野元久, 林 俊克, 「JMPによる多変量データ活用術」, (海文堂, 東京), (2004).
- Chen, J.Y., Iyo, C., Terada, F. and Kawano, S., Effect of multiplicative scatter correction on wavelength selection for near infrared calibration to determine fat content in raw milk, *J. Near Infrared Spectrosc.*, **10**, 301-307 (2002).
- 尾崎幸洋, 河田 聰, 「近赤外分光法」, (学会出版センター, 東京, p. 211, (1996).

(平成16年11月12日受付, 平成17年1月18日受理)