

令和3年度仙台市既存放射光施設活用事例創出事業（トライアルユース） 事例報告書

1 課題名

コヒーレント X線タイコグラフィーを利用した食品における油脂分布評価法の開発

2 測定にあたっての体制（社外委託先を含め記載）

・放射光利用申請先、及び測定サポート体制

放射光施設 SPring-8 BL24XU において兵庫県立大学の高山様、ひょうご科学技術協会の漆原様に御協力頂き測定を行った。東北大学の高田様から兵庫県立大学の高山様への御紹介があり、本事業を遂行するための技術的なサポートを受けられる体制を構築できた。

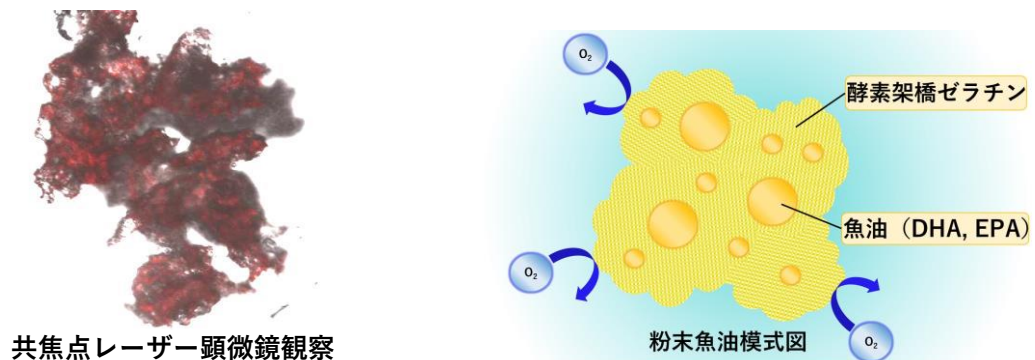
・測定手法

詳しい内容については第4項に記載しているが、測定手法は、サンプルの性質から位相コントラストを利用したコヒーレント X線タイコグラフィーを選択し、サンプル内部の構造が複雑である可能性も考慮し、三次元イメージング可能な結像型 X線 CT 測定も視野に入れていた。測定手法の決定は、主に兵庫県立大学の高山様とディスカッションし、求めている課題を解決できる可能性のある測定手法を選択し、業務を遂行した。

3 背景と測定目的

弊社は東北大学との共同研究により、約 $1\mu\text{m}$ に乳化した油脂（魚油）を酵素架橋したゼラチンに包摂し、粉末化することで酸化安定性、及び徐放性をもつ多核型マイクロカプセル化技術を開発した（下右図）¹⁾。酵素架橋ゼラチンは、酸化に強いバリア機能と水には容易に溶けない性質を併せ持つが、包摂した油脂の大きさや分布によっては、酸化安定性等に影響を与える可能性があるとして示唆されている。しかし、包摂した油脂がどのような状態であるのか、その微細さやコントラストの低さにより明確に評価できていなかった。実際、この課題に関する過去の検討を行った例として、油脂を蛍光染色し、粉末魚油を共焦点レーザー顕微鏡で観察した（下左図）。その結果、油脂の分散は確認できるが、油脂の大きさは明確に評価できなかった。

このようにこれまでの検討では、粉末魚油は乳化直後の大きさのまま維持されているのか、均一に分散されているのかについて明確に評価することができなかった。そこで、コヒーレント X線タイコグラフィーを利用し、位相コントラスト投影像から魚油粉末の油脂分布を数十 μm から数十 nm のサイズスケールに亘って評価することを目的とした。



4 測定方法（測定手法、測定セットアップ、使用ビームラインなど）

包摂油脂の大きさは 100 nm から数十 μm に亘る可能性があり、その分散状態を正しく把握するために、タイコグラフィーによるサブ 100 nm 分解能広視野二次元イメージングと屈折コントラスト結像 X 線 CT によるサブミクロン分解能三次元イメージングを行った。

・試料に関して

マイクロトームで 10 μm 厚程度に薄片化した試料を窒化シリコン薄膜に乗せて測定を行った。結像型 X 線 CT 測定では、試料調製はせずにそのまま測定に供した。

・ビームライン

SPring-8 BL24XU で測定を実施した。

・タイコグラフィー

光子エネルギー 8 keV (波長 0.155 nm)、直径 4 μm のコヒーレント X 線で、試料を二次元走査し、タイコグラフィーイメージングを実施した。視野範囲は 100 μm 角程度とし、100 nm 前後～数十 μm サイズの包摂油脂のサイズ分布、及び分散状態を位相コントラスト像から二次元的に評価した。1 試料条件あたり、複数視野をイメージングして包摂油脂分散状態の均一性を評価した。

・結像型 X 線 CT

光子エネルギー 10 keV (波長 0.124 nm)、画素サイズ 87 nm で屈折コントラスト CT を実施した。また、回転角 180 度範囲の角度制限・局所 CT とし、デフォーカス量は 1～4 mm とした。

5 結果及び考察（代表的なグラフや図を用いて分かりやすく説明すること）

画像表示は imageJ を用いた。このソフトを利用し、コントラストの調整等は弊社で実施した。

・タイコグラフィー

1 μm に乳化した粉末魚油は、1 μm 程度かそれ以上の大きさをもつ空隙が散見された。これは、マイクロトームで切削したと同時に油が削れて取れてしまった痕であると推測された。

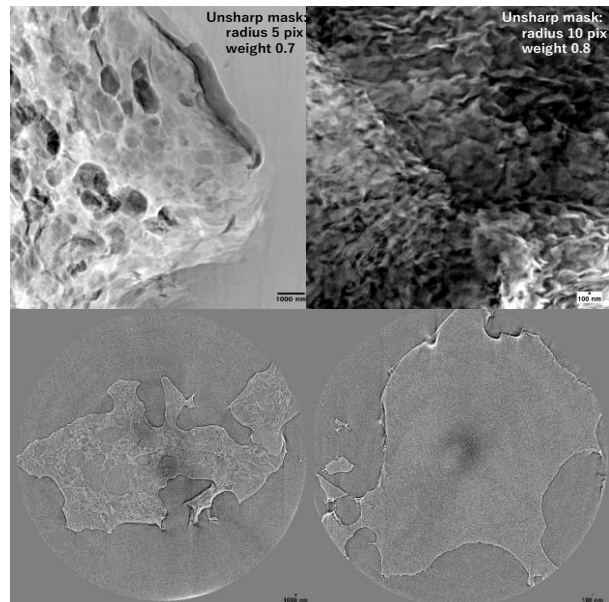
0.1 μm に乳化した粉末魚油は、マイクロトームによる切削痕の影響により波模様像が得られた。1 μm に乳化した粉末魚油と違って油滴と推測される楕円状の像が見られなかった。おそらく検出下限程度に分散されているためと推測された。

・結像型 X 線 CT

1 μm に乳化した粉末魚油は、1 μm 以上に肥大化している油滴や 1 μm に維持されている油滴が分散している様子が確認された。

一方、0.1 μm に乳化した粉末魚油は、均一に分散されているためか、検出下限程度の微細さで油滴が分布していると推測された。

以上の測定結果から 1 μm に乳化した油滴は、粉末化までの過程で油滴が合一化してしまうことが明らかとなった。一方で、油滴サイズをサブミクロンレベルまで微細化することで、油滴同士の合一化を防ぐことができ、かつ偏りなく均一に分散した状態で油脂包摂が可能になると推測された。



1 μm に乳化した粉末魚油 0.1 μm に乳化した粉末魚油

上図：タイコグラフィーの位相コントラスト像

下図：結像型 X 線 CT の屈折コントラスト像

6 今後の課題

本事業では、タイコグラフィー、結像型 X 線 CT 像で油滴の大きさ、並びに分散状態を推測できたが、更に高空間分解能で微細構造をみるための方法として、タイコグラフィーCT の活用が挙げられる。しかし、取りうる視野範囲によっては1~2 サンプルで12 時間もかかってしまうため、時間的制約から選択肢から外す形となった。粉末魚油に限らず、食品の内部構造は極めて複雑なケースが多く、そのような微細構造を正確に測定するためには、タイコグラフィーCT のような時間を要してでもより詳細に測定できる手法を選択した方がよいのかもしれない。ただ、このような条件で放射光利用を検討すると莫大なコストと時間を費やしてしまう。大学の研究機関の立場であれば解決できそうだが、一中小企業の立場で考えるとそう簡単にはいかないと痛感させられた。こちらである程度検証したことを踏まえて、まとめて測定する形をとる必要がある。測定に関しても今回の事例でも言えるように、どの測定手法でどんな条件で測定をするのかで得られる結果もその結果の解釈も変わってしまう。そのため、社外委託等による測定サポートがあったとしても事前にある程度こちらで推測できる範囲内で目星をつけ、予備測定の実施等を行い、専門家の方々とディスカッションして、初めて本測定に移れる事を念頭に考えておかなければならない。その分、結果を出すまでにはそれなりの時間を要してしまうが、現段階では現実的な方法とも言えるだろう。令和 5 年稼働予定の東北放射光施設に大いに期待し、より迅速かつ低コストで測定ができるよう強く願っている。

粉末魚油の内部構造評価に関しては、良い意味で想定通りの結果を得られることができた。タイコグラフィーの結果に関しては、マイクローム切削による傷の影響が大きく工夫の余地が必要であった。切削痕の確認は、マイクロスコープで逐一確認しながら行っており、20~30 サンプル程度用意していたが、想定以上に測定結果に大きな影響を及ぼしていた。この点は、もっと丁寧に行うべきだったと反省している。一方、結像型 X 線 CT の結果からは、比較的良好な結果が得られた。この結果は、弊社のマイクロカプセル化技術向上に大きく貢献できるのではないかと考えている。放射光施設利用により、油滴の凝集が発生しない条件が凡そ明らかとなったため、今後の研究課題としてこの結果をベースに魚油に限らず他の機能性のある油滴成分を微細化し、包摂させたマイクロカプセル化の技術開発を進めると共に、放射光施設を活用し、新たな知見を見出しながらマイクロカプセル化製品の拡大に貢献していきたい。

7 参考文献

1)特許第 6217986 号公報