

Detection of Deoxynivalenol in Water Solution by Using Three-Dimensional Excitation-Emission Matrix

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2019-12-20 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 藤田, かおり, 蔦, 瑞樹, 杉山, 純一 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24514/00002823

報 文

励起蛍光マトリクス計測に基づくデオキシニバレノール検知法の開発

藤田 かおり, 葛 瑞樹, 杉山 純一[§]

農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所

Detection of Deoxynivalenol in Water Solution by Using Three-Dimensional Excitation-Emission Matrix

Kaori Fujita, Mizuki Tsuta, Junichi Sugiyama[§]National Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization, 2-1-12,
Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642, Japan

Abstract

By using excitation - emission matrix (EEM) fluorescence spectroscopy, detection of deoxynivalenol (DON), which is one of mycotoxins, and the most frequent contaminant occurring in toxicologically relevant concentrations in wheat and other cereal grains, was studied. Seven concentration gradients of DON aqueous solution samples were made as follows: 0, 4, 8, 125, 250, 500 and 1000 ppm. We found that DON was characterized by several fluorescence peaks in EEM, especially those existed in specific excitation (Ex) and emission (Em) wavelength ranges as follows: Ex 200 ~ 230 nm / Em 300 nm and Ex 200 ~ 230 nm / Em 550 ~ 600 nm. Principal component analysis of EEM revealed that the score plot of the first and second principal components were useful for discrimination between DON and water, and judgment of DON concentration. Analysis of principal component loadings found that there were six areas with positive and negative correlation with DON concentration, respectively, as follows : Ex 200 ~ 230 nm / Em 250 ~ 320 nm, Ex 200 ~ 230 nm / Em 550 ~ 600 nm and Ex 320 ~ 340 nm / Em 400 ~ 500 nm, Ex 200 ~ 260 nm / Em 200 ~ 250 nm, Ex 200 ~ 250 nm / Em 320 ~ 540 nm and Ex 200 ~ 250 nm / Em 600 ~ 900 nm without disturbance wavelength ranges.

デオキシニバレノール (Deoxynivalenol, DON) はムギ・トウモロコシ類などの禾穀類が一般的な土壌感染性の菌である *Fusarium* に汚染された時に産生されるカビ毒の1種である^{1) 2)}。DONの汚染は、穀類の収量・品質低下を招くばかりでなく、汚染穀物を摂取したヒトや動物に嘔吐、下痢、頭痛などの重大な有害作用を示すため^{3) 4)}、世界中で重大な問題となっている^{5)~7)}。わが国でも、近年になって倒伏したコメか

らDON汚染が報告されるなど、DON汚染拡大が益々深刻さを増しており⁸⁾、2002年5月に厚生労働省は、ムギ類を代表としてDONに関しての暫定基準値を1.1ppmとして定めた⁹⁾。

しかしながら、DONの検出に関する研究は少なく、これまでのDON検出には、複雑な前処理が必要なUV検出器付き高速液体クロマトグラフィー (HPLC-UV) や電子捕獲検出器付きガスクロマトグ

2007年10月29日受付, 2007年12月6日受理

TEL 029-838-8047 FAX 029-839-1552

§ (連絡先) Corresponding author

フィー (GC-ECD) または酵素免疫測定吸着法 (ELISA) などが採用されており^{10)~12)}, 測定結果を出すまでに時間を要すること, 高価な分析機材や試薬を必要とすることなどが問題となっている。

そこで本研究では, 比較的操作性のよい蛍光分光光度計¹³⁾に着目し, DON の励起蛍光マトリクス (Excitation-Emission Matrix, EEM) の計測を行うこととした。EEM とは任意の励起波長ごとに計測された蛍光スペクトルの変化を励起波長, 蛍光波長, 蛍光強度の3つの直行軸からなる空間座標に示したものである^{14)~17)}。このとき蛍光強度の等しい点を結ぶことにより, 空間座標に等高線が描かれる。この等高線は成分固有の蛍光特性を特徴的なパターンとして示すため, あらかじめ目標成分の EEM を計測することで物質の同定が可能となる。このため様々な物質の混在系における特定物質の同定や食品中の異物の検出などに応用されている^{14) 15)}。また, 数百次元に及ぶ膨大な情報をもつ EEM のデータ解析により, 数波長のデータしか得られない蛍光計測で見落とされる情報の収集も可能となる^{16) 17)}。これらの知見から, EEM による識別は, 様々な物質が混在する穀粒や植物体でのカビ毒検出に適していると考えられた。また EEM 計測によって, これまで無色で蛍光も微弱とされる DON を光計測学的手法により簡便に検出することも可能になると予測された。本研究では, 蛍光分光光度計を用いて DON の EEM を計測・解析することで, DON の新規検出方法の検討を試み, カビ毒の簡便な非破壊計測法開発に資する基礎的な知見を得ることを目的とした。

材料および方法

1. 試薬および調整

DON 標準試薬にはマイコトキシン試験用試薬 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japan) を用い, 純水には Milli-Q システム (MILLIPORE Biocel A10, 日本ミリポア株式会社) を用いた。

DON 標準試薬は純水で 0, 4, 8, 125, 250, 500 及び 1000 ppm の7段階に希釈し, 攪拌後 1.5 mL の遠沈チューブに分注し, 超音波洗浄機 US-4 (株式会社エスエヌデイ, Japan) で 15 分脱気を行い, サンプルとした。

2. 蛍光分光光度計および解析ソフト

2.1 蛍光分光光度計

EEM の計測には, 蛍光分光光度計に LS45 (PerkinElmer Ltd., USA) を用い, 付属ソフトの FL WinLab (PerkinElmer Ltd., USA) を用いてデータ取得を行った。光源にはパルスキセノンランプ (20 kW, 半値幅 10 μ s), セルには 0.35ml のマイクロセル (FM20-SQ-1, GL Sciences Inc., Japan) を用いた。

2.2 解析ソフト

取得データの等高線図作製には計測に用いた FL WinLab を用いた。データの预处理には表計算ソフト Excel 2003 (Microsoft Co., Ltd., Japan) を用い, データの解析には, 統計解析ソフト JMP 5.1 (SAS Institute Inc., USA) および Excel 2003 を用いた。また主成分負荷量の散布図の作製には画像処理ソフト AV 似非 (Free software) を用いた。

3. 実験方法

3.1 予備実験

DON の EEM 計測を行うのは本研究が初めてとなるため, 純水および DON 溶液の EEM を計測し, 最適な励起蛍光波長の計測範囲の検討を行った。LS45 では蛍光側計測波長間隔 (0.5nm), 励起側スリット幅 (10 nm), 蛍光側スリット幅 (10 nm) は固定である。本実験では, 励起波長間隔および蛍光波長範囲は, LS45 で測定できる最大限範囲である励起波長範囲: 200 ~ 800 nm, 蛍光波長範囲: 200 ~ 894.5 nm に設定した。また, 励起波長間隔: 10 nm, 波長走査速度は S/N 比を高めるために 500 nm/min とした。この際の各試料は 300 μ L であり, 得られた各 DON 溶液の EEM の等高線図から純水と DON の蛍光が見られる波長範囲の特定を行った。

3.2 EEM 計測

前述の予備実験により, 計測範囲およびスキャンスピードなどを決定し, 各サンプルの EEM を計測した。励起蛍光計測は 1 サンプルあたり 300 μ L, 各濃度 3 反復で行い, 各励起蛍光波長の組み合わせ条件時の蛍光強度を EEM データとした。

3.3 EEM データの预处理および主成分分析

取得データに以下3つの预处理を適用し分析に供した (図1)。

1) 本実験での解析対象は励起光よりも長波長側の EEM データである。取得 EEM データには励起光よりも短波長側のデータも含まれるため, 取得データから

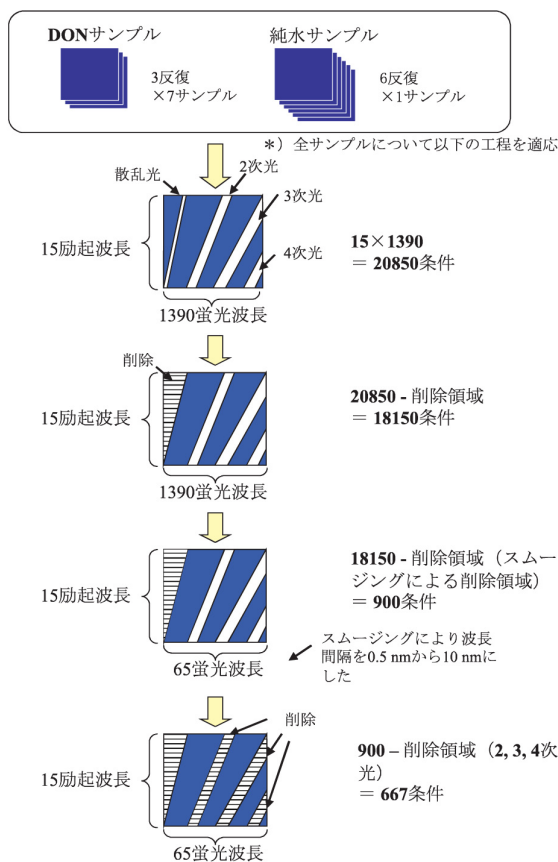


図 1 EEM の前処理工程

励起光（各照射励起光 ± 20 nm）よりも短波長範囲のデータを除外した。

2) また取得データは、励起波長間隔（10 nm）と蛍光波長間隔（0.5 nm）が異なっている。蛍光波長間隔を励起波長間隔と等しくするために、蛍光波長データに平滑化処理を適用した上で、10 nm 毎にデータを抽出した。平滑化には2次・3次多項式適合による平滑

化重み係数を用いた21点のSavitzky-Golay法¹⁸⁾を適用した。

3) さらに、平滑化処理を行ったデータには励起光の2次光、3次光、4次光などのデータ処理上の外乱となる各波長条件が含まれる。そのため、平滑化処理を行ったデータからそれら範囲のデータ（2次光：励起光 $\times 2 \pm 35$ nm；3次光：励起光 $\times 3 \pm 35$ nm；4次光：励起光 $\times 4 \pm 45$ nm）の除去を行った。

3.4 主成分分析

波長毎にデータの標準化を行い、主成分分析によって主成分得点を算出した。算出した全主成分得点は、JMP5.1にてヒストグラムおよび箱ひげ図を用いて異常値を削除した²⁰⁾。異常値削除後に再度主成分分析を行い、励起・蛍光波長軸よりなる空間上に主成分負荷量をプロットし、DONの判別・定量に有効な波長の特定を試みた。

4. 結果および考察

4.1 予備実験

DON溶液に特異的な励起蛍光波長を検出するための最適な計測範囲の検討を予備実験として行った。1000 ppm DON溶液と対照区である純水のEEMを等高線図として図2に示した。図2中において、励起波長200 nm時の蛍光波長200, 400, 600及び800 nmを基点として長波長側に斜めに走る強度の強い発光は励起光の散乱光および散乱光の2次光、3次光、4次光であり、それ以外で短波長から長波長側に斜めに走る発光はラマン散乱光である¹³⁾。

図2において、サンプル由来の蛍光が見られた範囲は励起波長200～340 nm付近の範囲であった。また等高線図上で視覚的にDON溶液と純水の蛍光ピークを識別できた箇所は主に2箇所であり（図2a, b）

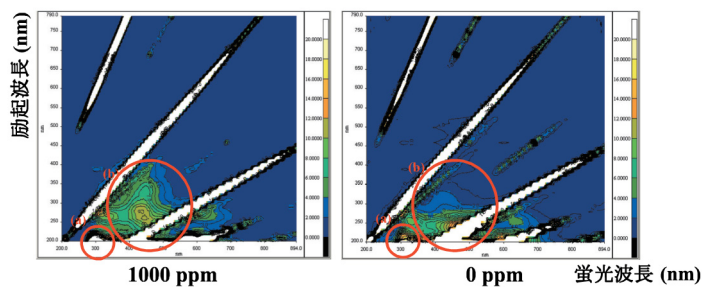


図 2 1000 ppm DON 溶液と 0 ppm 溶液における全波長領域の励起蛍光マトリクス

図中の蛍光波長領域にそれぞれ(a)(b)の円周を示した。

ともに励起波長 200 ~ 340 nm の範囲内であった。これらから、DON と純水の識別には励起波長 200 ~ 340nm の領域だけで良いことが示唆された。

加えて、測定時間が長引くことによるサンプルの蛍光強度の減少が懸念された²¹⁾。測定時間はスキャンスピードと励起および蛍光波長範囲の幅に依存する。本実験では全波長領域の計測時間に約 120 分を要したが、波長範囲を狭めて計測時間を短縮することで、サンプルの蛍光の減少を防ぐだけでなく作業効率を向上させられると考えられた。また図 2a において、1000ppm 溶液では蛍光のピークが蛍光波長 300 nm であるのに対し純水では 320 nm とわずかに長波長にずれていた。加えて、図 2b においては、純水では明確なピークが見られなかったのに対し DON 溶液では励起波長 250 ~ 300 nm の領域に蛍光ピークが観察された。このことから、識別可能な蛍光ピークを中心に EEM 計測を行うこととした。

表 1 測定条件

Scan speed	500 nm /min
Excitation Slit	10 nm
Emission Slit	10 nm
Excitation Range	200 ~ 340.0 nm
Emission Range	200 ~ 894.5 nm

4.2 DON 溶液の励起蛍光マトリクス計測

サンプル間で最も顕著な差が観察された励起波長 200 ~ 340 nm, 蛍光波長 200 ~ 900 nm の範囲で計測を行った (表 1)。各サンプルの EEM は等高線図として図 3 にまとめた。等高線図では主に 6 箇所視覚的に識別可能な蛍光ピークが観察され、これら 6 箇所に便宜的な印をつけた (図 3a ~ f)。

これまでの EEM 計測による定性的な研究では、その蛍光ピーク位置や形状で識別がなされている^{14) 15)}。これらから、図 3 における蛍光ピークが DON 識別に重要な情報を持つと考えられた。また、図 3a, b は、その波長条件から図 2 上の a, b と同一の蛍光ピークであると推察された。このことから、より狭い領域を詳細に観察することにより、新たに 4 箇所の蛍光ピークの識別が可能になることが示された。

図 3b, c, d では、明らかな等高線ピークが見られた。これらは DON 濃度と反比例的に蛍光強度が高まる傾向があったことから、図 3b, c, d は純水由来の蛍光ピークであると考えられた。しかし図 3b においては、DON の濃度が高まるにつれて蛍光が観察される励起波長範囲が広がる傾向が見られた。このため、DON 濃度の識別は蛍光ピークの強度だけではなく、蛍光の観察される励起波長範囲のデータも有効であると考えられた。

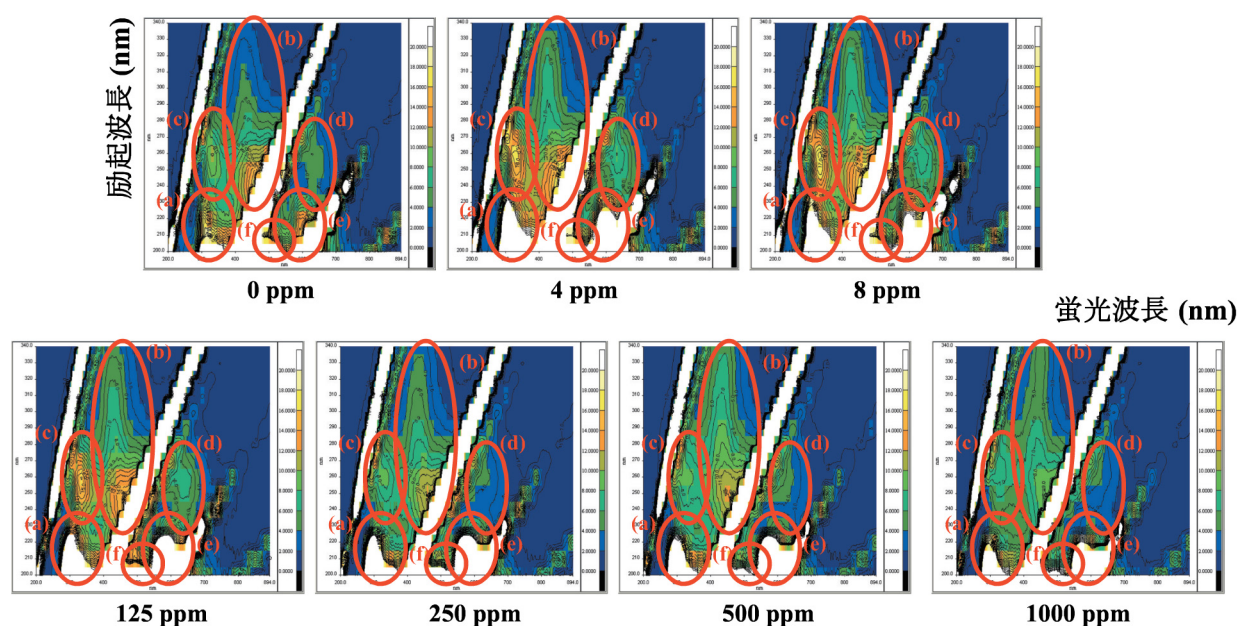


図 3 DON の濃度別にみた励起蛍光マトリクスの俯瞰図

図中の(a)~(f)の円周には、観察された蛍光波長領域を示した。(b, c, d) は蛍光ピークであり、(a, e, f) には蛍光ピークの裾野が見られた。

表 2 主成分分析結果

	第 1 主成分	第 2 主成分	第 3 主成分	第 4 主成分	第 5 主成分
固有値	307.5	249.3	34.1	32.2	11.9
寄与率 (%)	46.10	37.38	5.11	4.83	1.78
累積寄与率 (%)	46.10	83.48	88.59	93.42	95.20

一方図 3a, e, f で示された等高線では、蛍光ピークの裾野は観察されたものの、そのピークは測定範囲外にあり、その形状およびピーク位置を確認することができず、DON および純水との関係を見出すことができなかった。また図 3c では、その範囲が 2 次光と重なるためにピークの識別もできなかった。

このように、等高線図では多くの蛍光ピークを視察することができたが、明確なピークの識別までは不可能であり、DON の判別および濃度と明確に相関のある箇所の検出は困難であると考えられた。そこで、等高線図の観察では識別不可能であった相違点を明らかにするために、主成分分析を用いてデータの解析をおこなった。

4.3 励起蛍光マトリクスデータの主成分分析

4.3.1 主成分分析

前処理後の各サンプルの EEM は、667 の励起・蛍光波長条件下で得られた蛍光強度のデータより成っている。そこで、各サンプルの EEM を 667 次元の蛍光強度データとみなし、主成分分析に供した。その結果、第 1 主成分の寄与率は 46.1 %、第 2 主成分の寄与率は 37.4 % であった。また累積寄与率が 95 % 以上となる第 5 主成分までの主成分得点を算出した (表 2)。

図 4 は縦軸を第 1 主成分、横軸を第 2 主成分とした

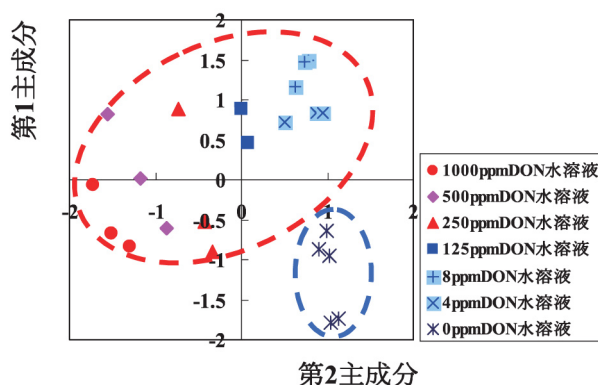


図 4 DON および純水の主成分得点
破線による円周はそれぞれ DON と純水のグループを示した。

主成分得点の散布図であり、純水と DON 溶液の間およびサンプル間でもその分布位置に明らかな差異が見られた。特に純水は第 1 主成分がマイナス、第 2 主成分がプラスとなる第 4 象限に分布したのに対し、DON 溶液では同じ象限に入るサンプルは見られなかった。これらのことから、第 1 主成分と第 2 主成分の 2 つの主成分で DON の識別が可能であると考えられた。

また濃度に関しては、DON 濃度が高くなるにつれサンプルのプロット点が第 2 主成分軸のマイナス方向に移動する傾向が観察され、特に高濃度のサンプルではその傾向は顕著であった。これらから、第 2 主成分は濃度に関与しており、特に高濃度の DON については第 2 主成分により判別が可能になることが示唆された。

そこで、第 1, 2 主成分について主成分負荷量を算出することで、DON 識別および濃度に関与する波長領域の特定を試みた。なお、今回の主成分分析では、第 1, 2 主成分以外による散布図において DON 濃度の違いによる顕著な特徴を確認することができなかった。

4.3.2 主成分負荷量

各主成分負荷量は縦軸を励起波長、横軸を蛍光波長とした座標空間上に表記した (図 5, 6)。また各図には図 3 に付記した a ~ f と同じ箇所に同記号を記入した。

第 1 主成分では、主成分負荷量の値はプラスに偏っており、その値も大きかった。またマイナスの値を示す領域はほとんど無く、絶対値も小さかった (図 5)。特に励起波長 260nm 以上の波長領域に強い相関が観察されており、DON 識別には励起波長 260nm 以上の波長領域に着目することが有効であることが示唆された。さらに図 3 で蛍光ピークを観察された a ~ d の箇所においては、第 1 主成分の主成分負荷量の値も大きいことが明らかとなり、特に b では両者に強い相関が示された。一方、励起波長 270 ~ 340nm/ 蛍光波長 600 ~ 894.5nm など、図 3 では識別できなかった領域が DON 識別に強く関与することも示唆された。

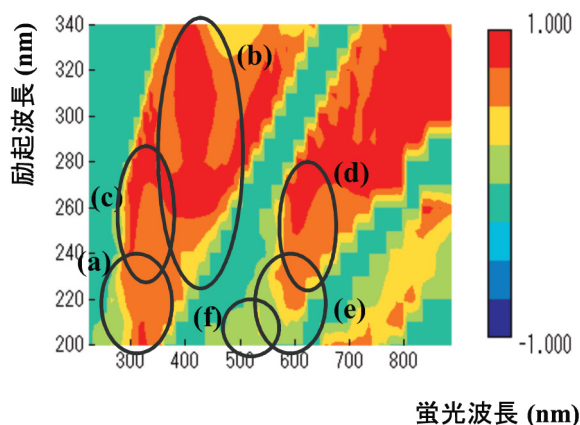


図5 第1主成分における主成分負荷量分布
第1主成分に関わる各波長の負荷量を示した。図中の(a)~(f)は図3に対応している。

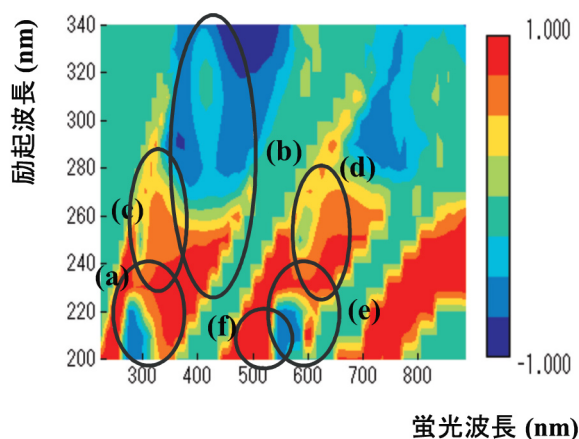


図6 第2主成分における主成分負荷量分布
第2主成分に関わる各波長の負荷量を示した。図中の(a)~(f)は図3に対応している。

第2主成分では、正負ともに高い値の主成分負荷量が示された(図6)。特に励起波長200~250 nmの領域では、全体的にプラスに高い値が示され、励起波長200~230 nm / 蛍光波長250~320 nm および励起波長200~230 nm / 蛍光波長550~600 nm では高いマイナスの値が示された。また、励起波長320~340 nm / 蛍光波長450~550 nm の範囲では最も高いマイナスの値が示された。このように第2主成分の主成分負荷量は様々な波長領域で正負に高い値を示しており、DON濃度の判別に関与する領域が広範囲に点在することが示唆された。加えて、第2主成分で主成分負荷量の値の高かった箇所は、図3でのa, f, eで特徴的な蛍光が観察された範囲と一致しており(図6)、

これらの箇所を観察されたピークがDON濃度の判別に深く関わっていると推察された。

4.4 結言

本研究では数波長のみの情報しか得られない従来の蛍光分析とは異なり、数百次元に及ぶ膨大な量の情報をもつEEMから得られるデータを解析することで、1励起蛍光波長では得られないデータ領域やDONの判別が可能となった。特にDON溶液と純水ではEEMの等高線図に十分な差異がみられ、DONが特有のEEMを持つことが明らかとなった。このことは光計測によるDON検知の可能性を示唆する重要な情報であると考えられた。

またこれまでのEEMを用いた目的物質の定性に関する報告では、EEMの等高線図におけるその蛍光ピークを観察するに留まっている^{14) 15)}。そのため、その応用は主に目的物質の定性に留まり、絶対的な定量分析は困難であった。それに対し、今回の実験では主成分分析などの解析手法を用いることで、定性だけでなく定量分析の可能性を示唆できた。

しかしながら、本研究は可視領域の波長を用いたDON検知および定量に関する初めての試みであるために、試験的な要素を含んでいたことは否めない。そのため、計測時間やサンプル調整などの検討項目が課題として残った。計測時間に関しては、化学分析と比較して迅速に計測できたものの、1サンプルに対し40分と長く、再検討の余地が残った。さらにサンプル濃度に関しても、供試した中で最も濃度の低いDON溶液は4 ppmと日本におけるDONの暫定準値よりも高い濃度であった。計測時間に関わる計測条件などについても今現在検討中である。またサンプル濃度に関しても、今現在1 ppm以下の濃度のデータも取得し、併せて解析を行っている。これらの検討項目について研究を進めることで、紫外・可視領域の波長領域におけるEEMを用いたDONの定性・定量が可能になると考えられた。

謝 辞

本研究は、日本学術振興会による若手研究Bにより実施された。また本研究を遂行するに当たり、(独)農業環境技術研究所 生物生態機能領域 対馬誠也上席研究員、吉田重信主任研究員、生長陽子氏には、カビ毒およびDONに関するご指導・ご助言をいただいた。ここに記して厚く感謝の意を表する。

要 約

光計測によるカビ毒検知および定量に関する基礎的な検討を行った。本研究では1) デオキシニバレノール (DON) の励起蛍光マトリクス (EEM) 計測条件の設定, 2) DON の EEM 計測およびデータ取得, 3) データ解析, の3段階で実験を遂行し, 以下の知見を得た。1) これまで蛍光の検知が不可能とされていた DON において, 励起波長 200 ~ 340 nm / 蛍光波長 200 ~ 894.5 nm の範囲で DON 由来の蛍光が観察された。特に励起波長 200 ~ 230 nm / 蛍光波長 320 nm, 励起波長 200 ~ 230 nm / 蛍光波長 550 ~ 600 nm 付近に観察されたピークは DON 特有の蛍光ピークであると考えられた。2) 各波長条件における蛍光強度を主成分分析で解析した結果, 第1主成分の寄与率は46.1%, 第2主成分の寄与率は37.4%となり, DON 溶液における EEM の特徴は第5主成分まで (累積寄与率95.2%) で十分説明することができた。3) 第1主成分と第2主成分を軸とした主成分得点の散布図により, 純水と DON 溶液は異なるグループに分類され, 主成分分析によって DON の有無を定性が可能であることが示された。また散布図における各サンプルの分布状況から, 第1主成分が DON と純水の判別に関与し, 第2主成分が DON の濃度に関与することが示唆された。4) 各主成分への負荷量を算出することで各主成分に影響力の高い波長領域を明らかにした結果, 特に DON と水との識別には, 励起波長 260 ~ 340nm / 蛍光波長 360 ~ 440 nm, 励起波長 250 ~ 340 nm / 蛍光波長 360 ~ 900 nm の領域が有効であり, DON 濃度には, 励起波長 200 ~ 230 nm / 蛍光波長 250 ~ 320nm, 励起波長 200 ~ 230 nm / 蛍光波長 550 ~ 600 nm, 励起波長 320 ~ 340 nm / 蛍光波長 400 ~ 500 nm の領域が有効であることが示された。これらから, EEM 計測における複数の情報と主成分分析などの解析手法を組み合わせることで DON の定量も可能になると考えられた。

本研究は文部科学省科学研究費 (No. 19780197) によった。

参考文献

- 1) D'Mello, J. P. F. and Macdonald, A. M. C., *Mycotoxins, Animal Feed Science and Technology*, **69**, 155-166 (1997).
- 2) Wyllie, T. D. & Morehouse, L. G., *MYCOTOXIC FUNGI, MYCOTOXINS, MYCOTOXICOSES An Encyclopedic Handbook, Volume 1 Mycotoxic Fungi and Chemistry of Mycotoxins*, pp. 365-420, Marcel Dekker, Inc., New York and Basel, (1977).
- 3) Cavret, S. and Lecoer, S., *Fusariotoxin transfer in animal, Food and Chemical Toxicology*, **44**, 444-453 (2005).
- 4) Placinta, C. M., D' Mello, J. P. F. and Macdonald, A. M. C., *A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with Fusarium mycotoxins, Animal Feed Science and Technology*, **78**, 21-37 (1999).
- 5) FAO, *Manual on the application of the HACCP system in mycotoxins prevention and control, FOOD AND NUTRITION PAPER*, **73**, (2001), (FAO/IAEA, Italy, Rome).
- 6) Larsen, J. C., Hunt, J., Perrin, I. and Ruckebauer, P., *Workshop on trichothecenes with a focus on DON: summary report, Toxicology Letters*, **153**, 1-22 (2004).
- 7) Tritscher, A., M. and Page, S., W., *The risk assessment paradigm and its application for trichothecenes, Toxicology Letters*, **153**, 155-163 (2004).
- 8) Tanaka, K., Kobayashi, H., Nagata, T. and Manabe, M., *Natural occurrence of trichothecenes on lodged and water-damaged domestic rice in Japan, J. Food Hyg. Soc. Japan*, **45** (2), 63-66 (2004).
- 9) 榎浩行, 1. 麦類の赤かび病防除及びマイコトキシン産生制御技術開発の展開方向, 1-1 マイコトキシン暫定基準値の設定と生産上の対応, 冬作物研究, 第2号, 1-5 (2002).
- 10) Josephs, R. D., Derbyshire, M., Stroka, J., Emons, H. and Anklam E., *Trichothecenes: reference materials and method validation, Toxicology Letters*, **153**, 123-132 (2004).
- 11) Stroka, J., Spanjer, M., Buechler, S., Barel, S., Kos, G. and Anklam, E., *Novel sampling methods for the analysis of mycotoxins and the combination with spectroscopic methods for the rapid evaluation of deoxynivalenol contamination, Toxicology Letter*,

1) D'Mello, J. P. F. and Macdonald, A. M. C.,

- 153, 99-107 (2004).
- 12) Klötzel, M., Schmidt, S., Lauber, U., Thielert, G. and Humpf, H. U., Comparison of different clean-up procedures for the analysis of deoxynivalenol in cereal-based food and validation of a reliable HPLC methods, *Chromatographia*, **62** (1/2), 41-48 (2005).
 - 13) 田村善蔵, 大幡利一, 保田和雄 編, 2. 装置および測定, 「けい光分析」, 第1版, 講談社, pp. 55-84 (1974).
 - 14) 下山進, 野田裕子, 三次元蛍光スペクトルにおける古代染織遺物に使用された染料の非破壊計測的計測, *分析科学*, **41**, 243-250 (1992).
 - 15) Booksh, K. S., Muroski, A. R. and Myrick, M. L., Single-measurement Excitation /Emission Matrix spectrofluorometer for determination of hydrocarbons in ocean water. 2. Calibration and Quantitation of Naphtalene and styrene, *Anal. Chem.*, **68**, 3539-3544 (1996).
 - 16) 宮下一成, 蔦瑞樹, 鈴木崇之, 都甲珠, 杉山純一, 中内茂樹, 清水浩, 3次元スペクトルイメージングによるダイズ種子の内部構造の可視化, *食科工*, **51** (12), 656-664 (2004).
 - 17) Park, B., Lawrence, K. C., Windham W. R. and Smith, D. P., Performance of hyperspectral imaging system for poultry surface fecal contaminant detection, *Journal of Food Engineering*, **75**, 340-348 (2006).
 - 18) 南茂夫 編著, 第5章 演算処理による雑音除去法, 科学者のための波形データ処理, CQ出版株式会社, pp. 84-110, (1986).
 - 19) 廣野元久, 林俊克, JMPによる多変量データ活用術, 海文堂出版株式会社, (2004).
 - 20) 蔦瑞樹, 丸林夏彦, 等々力節子, 杉山純一, 相良泰行近赤外分光法によるデンプン縋線照射の影響評価, *日本食品科学工学会誌*, **52** (4), 183-189 (2005).
 - 21) 西川泰治, 平木敬三, 2. 蛍光分析はどのように実施するか, 「蛍光・りん光分析法」, 日本分析化学会 編, 共立出版株式会社, pp. 49-97 (1987).