

共焦点レーザースキャン顕微鏡(LSM)による セロハンの構造研究

古田拓* 伊藤研策** 伊勢典夫*

Cellophane Structure as Studied
by Confocal Laser Scanning Microscope

Taku FURUTA*, Kensaku ITO**, Norio ISE*

The structure of cellophane was studied by using confocal laser scanning microscopy. By using LSM, cellophane sample could be observed continuously from top to bottom surfaces as optical cross-sectional images. The three-dimensional image was reconstructed from a series of optical cross-sections. In spite of the transparency of the material, the surface depression and elevation of cellophane could be easily and clearly visualized.

The three-dimensional structural information such as shape, diameter, depth, and height of surface depression and elevation were determined. The distance between top and bottom surfaces estimated from the positions of the focal plane corresponded to local sample thickness. The LSM was demonstrated to be useful in the determination of local fluctuation of sample thickness.

Keywords : Cellophane, Structure, Laser scanning microscope

共焦点レーザースキャン顕微鏡(LSM)を用いてセロハンの構造について検討した。LSMを用いることによってセロハン試料は光学的切片イメージとして表から裏面に至るまで連続的に、しかも容易に観察できた。一連の光学的切片イメージを合成することによって得た三次元再構築イメージからは試料の透明性にもかかわらず表面の凹凸構造が明瞭となった。凹凸構造の形状、径、深さ、高さを測定した。試料の表面と裏面との焦点面の位置の差から試料の厚さを決定し、微小領域での厚さ変動の評価を試みた。

キーワード：セロハン、構造、レーザースキャン顕微鏡

* レンゴー (株) 中央研究所 (〒553 大阪市福島区大開4-1-186) : CENTRAL LABORATORY, RENGO Co. Ltd., 4-1-186, Ohhiraki, Fukushima-ku, Osaka, 553 ** 富山大学工学部化学生物工学科 (〒930 富山県富山市五福3190) : Toyama University, Department of Chemical and Biochemical Engineering, 3190, Gohuku, Toyama-shi, Toyama, 930

1. 緒言

材料の構造、例えば表面の凹凸や微細孔を評価する際の最も代表的な技術の一つは顕微鏡法である。この技術は制限された視野内の情報しか評価できないため必ずしも全体を代表しているとは限らないが、実際に形状や大きさを直接目で見ることができるという点で極めて優れている。一般には光学顕微鏡、走査型電子顕微鏡 (SEM)、透過型電子顕微鏡 (TEM) が用いられている。通常の光学顕微鏡は操作は簡便であるものの観察倍率や解像度に限界がある。また、基本的にセロハンのような透明性の高い試料の観察には適さない。一方、SEMやTEMなどの電子顕微鏡では非常に高倍率での観察が可能で、しかも試料の透明性は問題とならない。しかし、試料調製が煩雑で、特にTEMでは顕著である。また、材料によっては電子線による試料の損傷が問題となる。

われわれはセロハンの構造研究に共焦点レーザー走査顕微鏡 (LSM)^{1)~3)}を用いた。LSMはこれまで主に医学・生物学分野においてレーザー光を蛍光励起光源として生物試料を観察するために利用されてきた。しかし、近年、LSMの特徴の一つである共焦点系を最大限に活用することにより、工業製品を含むさまざまな材料の構造研究に利用されつつある^{4)~7)}。LSMの光学系をFig. 1に示す。通常の光学顕微鏡では広い範囲が照明されるのに対し、LSMは微小サイズのレーザースポットが試料のある一平面上を走査する。従って、周囲からの散乱または反射光が制限され高コントラスト像が得られるため透明性の高い試料であっても凹凸や孔のような構造があ

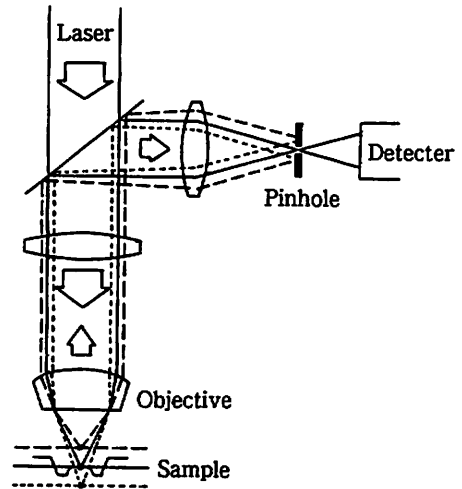


Fig. 1 Principle of the confocal laser scanning microscope

れば反射光強度の差として検出することが可能となる。また、試料上の焦点面からの反射光だけが検出器手前に配置されたピンホールを通過できるため非常に焦点深度の浅い像、すなわち光学的切片が得られる。これらの像と焦点面の位置とから構造の高さや深さのような三次元情報が得られる。また、一連の光学的切片を合成することにより極めて焦点深度の深い像を再構築することもできる。

ビスコース法再生セルロースフィルムであるセロハンの歴史は古い。また、近年、生分解性という観点からセルロース製品が注目を集めているにもかかわらず、セロハンの構造に関する研究例は少なく、われわれの知る限り光学顕微鏡によるものはない。この理由はセロハンの高い透明性にあると考えられる。本報告ではLSMでセロハンの構造を評価するとともに透明性の高いフィルム試料の構造研究におけるLSMの有効性について検討した。なお、LSMによるセロハン構造の予備的研究結果はすでに報告した⁸⁾。

2. 実験

2.1 共焦点レーザースキャン顕微鏡 (LSM)

倒立型共焦点レーザースキャン顕微鏡 LSM410 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) を用い、反射光共焦点モードで検鏡した。Ar-Kr レーザー (488、568、647nm) を光源とし、LD Epiplan 50x/0.50 または Epiplan-NEOFLUAR 100x/0.90 を対物レンズとした。

2.2 試料

A社製の試料A1、A2、B社製の試料B、C社製の試料Cの計4種類の普通セロハンPT300を試料とした。構造観察には試料A1、B、Cを用い、約5mm×10mmの穴をあけたプラスチック板にこれらのセロハン試料を固定し、カバーガラスを介さず穴の部分を観察した。厚さ変動を評価する際は約6mm四方のセロハン試料A2の薄片を2枚のカバーガラスの間に挟み、マニキュアで周囲を固定して観察した。この厚さはダイヤルゲージで測定したところ323 μm であった。カバーガラス2枚の厚さは304 μm であったのでセロハン薄片の厚さは19 μm と計算できた。ちなみにカバーガラスに挟む前に直接ダイヤルゲージで測定したこの薄片の厚さも19 μm であった。

3. 結果および考察

3.1 構造の三次元評価

セロハンの代表的な LSM イメージとして試料A1の光学的切片イメージをFig. 2に示した。(a)は視野内で最も高い部分(画面上

部)に焦点面を合わせたときのイメージである。この位置を基準(=0)とし、0.5 μm ずつフィルム内部方向へ焦点面の位置を移動させながら6.5 μm まで計14枚の光学的切片イメージを調製した。(b)はこのうち焦点面の位置が3 μm のイメージであり、視野のほぼ中央部に焦点がっている。(c)は焦点面の位置が6.5 μm のイメージで視野内で最も低い位置(画面右下)に焦点がっている。以上の(a)-(c)のイメージはすべてある一方の表面を捉えたものであるが、さらに焦点面を移動していくと反対の表面からのイメージも捉えることができる。(d)は(a)の焦点面の位置を基準(=0)としたときの16.5 μm における光学的切片イメージであり、視野のほぼ中央部に焦点がっている。視野内の同一部位に焦点のあっている(b)と(d)の焦点面の位置の差からこの部分における試料の厚さが計算できる。ここでは16.5 μm - 3 μm = 13.5 μm であった。この値はこの試料を5枚重ねてダイヤルゲージで測定することによって得た1枚あたりの厚さ20.0 μm よりかなり小さく、非常に小さな領域での厚さ変動が大きいと結論される。

Fig. 3はFig. 2に示した一連の光学的切片イメージを合成して調製した再構築イメージである。(a)は焦点面の位置0~6.5 μm で得た14枚の光学的切片イメージから再構築したセロハン表面のイメージである。(b)は同じ光学的切片イメージから調製した三次元再構築イメージである。このようにZ方向の情報を色分けして視覚化することによって構造の三次元的評価が可能である。(c)は(a)の反対側の表面、すなわち焦点面の位置13~19.5 μm で得た14枚の光学的切片イメージか

らの再構築イメージである。(a)に認められる構造やフィルム内部の構造のために反射光が検出できずに黒く抜けている部分もあるが、試料を裏返して厳密な位置決めを行ったりすることなく完全に表裏の情報を比較できることが判明した。

構造の三次元評価の一例として試料A1に認めた代表的な構造をFig. 4に示した。(a)は0.2 μm ごとに調製した一連の光学的切片イメージであり、(b)(c)はその再構築イメージである。(c)の三次元再構築イメージでは赤で示された部分が最も高く、青の部分が最も低い。これらのイメージからの三次元評価結果は、右上の構造が凹構造で、最大径約6 μm 、深さ約0.6 μm 、左下の構造が凸構造で最大径約7 μm 、高さ約1.0 μm となった。試料B、試料Cに認められた代表的な構造の三次元再構築イメージをFig. 5に示した。(a)(b)に示した試料Bの構造はほぼ同様のものがこの試料の表裏両面に多数認められ、すべて凸構造であった。ここに示した構造では直径4.3 μm 、高さ約1.0 μm であった。(c)(d)に示した試料Cの構造はこの試料のある一方の表面にのみ存在し、すべて凹構造であった。大きさは一様ではないがほぼ最大径で0.5 μm 、深さ0.3 μm であった。

3.2 微小部での厚さ変動評価

Fig. 2の考察に示したようなLSMによる表裏の焦点面の位置から決定したセロハン試料の厚さはダイヤルゲージで測定した厚さに比べて小さかった。このことから顕微鏡レベルの非常に小さな領域での厚さ変動が推定されたので試料A2を用いてさらに検討した。LSMを用い、試料A2のマシン方向(M.D.)と

クロス方向(C.D.)に沿ってそれぞれ5000 μm を100 μm ごとに移動させながら表裏両面の焦点面の位置を決定した。Fig. 6にクロス方向に沿っての厚さ変動を示した。2本の破線はLSMで決定した表裏両表面の焦点面の位置を示す。したがって、破線で挟まれた部分の形状が断面形状に相当し、破線間の垂直方向の間隔が厚さに相当する。LSMで決定した厚さは約11~15 μm で変動しており、ダイヤルゲージで測定した厚さ19 μm よりかなり小さかった。断面形状に相当する2本の破線間を挟み込む最小間隔の平行線を実線で示した。これはダイヤルゲージの測定部を想定したもので、その間隔は19.6 μm となり、ダイヤルゲージによる測定値とほぼ一致した。マシン方向についても同様の評価を行ったところ、LSMで決定した厚さは10~15 μm で変動しており、平行線の間隔は16.9 μm となった。以上の結果からセロハンの厚さは実際には10~15 μm であり、ダイヤルゲージで測定した厚さには顕微鏡レベルの非常に小さな領域での厚さ変動や特にクロス方向ではうねりが影響を及ぼしていると考えられた。

4. 結 論

LSMによってセロハンの三次元的な構造評価が可能であった。また、微小領域での厚さ変動を測定することができ、ダイヤルゲージで測定した厚さ19 μm に対して、実際の厚さは10~15 μm 程度と推定された。セロハンのような透明性の高い試料の構造研究のための新しい手法としてLSMが有効であることを確認した。

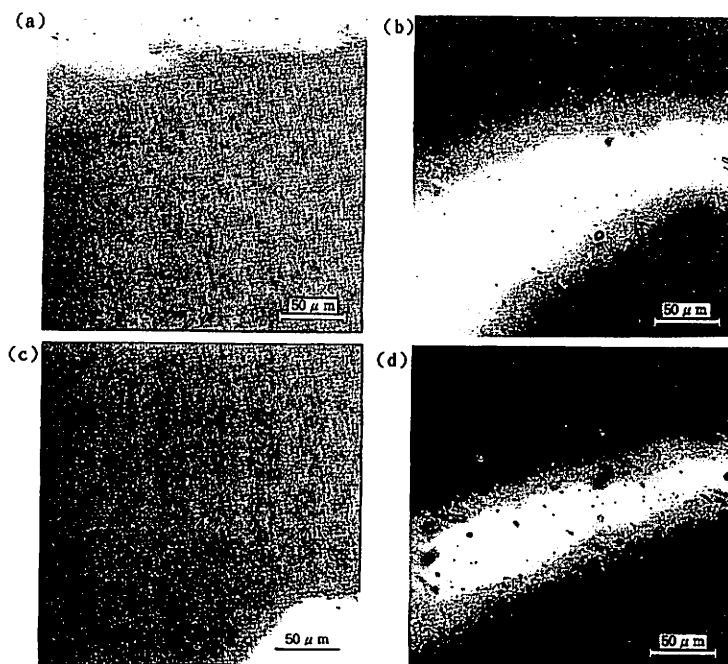


Fig. 2 Optical cross-sections of cellophane (sample A1) obtained by laser scanning microscope. (a) The highest area in the field of vision was focalized.(depth = 0). (b) depth = 3 μm . The focal plane was moved 3 μm into the sample. The center in the field of vision was focalized. (c) depth = 6.5 μm . (d) depth = 16.5 μm . The focal plane was roughly on the underside surface of the sample. The focus was on the center of the field of vision.

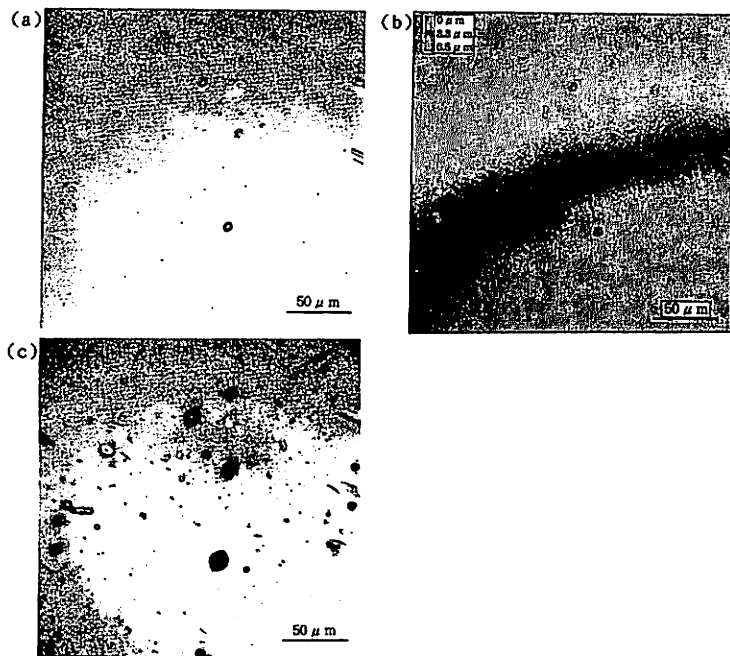


Fig. 3 3-Dimensional images of cellophane (sample A1) reconstructed from the optical cross-sections. (a) Reconstructed image using 14 cross-sections.(depth = 0 - 6.5 μm). (b) Colored 3-dimensional image. The plane shown in red is 6.5 μm above the plane in blue. (c) Reconstructed image of the underside surface using 14 cross-sections.(depth = 13 μm - 19.5 μm).

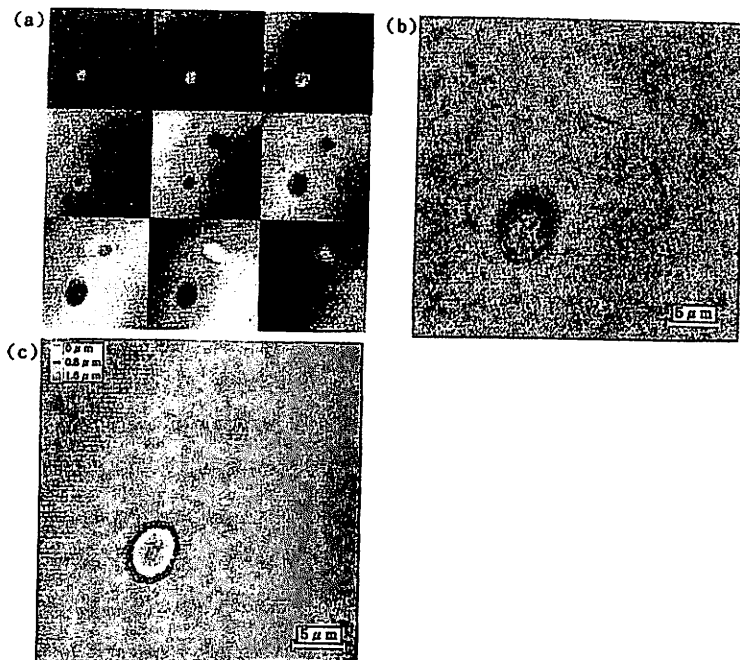


Fig. 4 Optical cross-sectional views and 3-dimensional images showing an elevation and a depression on cellophane (sample A1) surface. (a) 9 cross-sectional views.(depth = 0 - 1.6 μm), (b) Reconstructed image using the cross-sections. (c) Colored 3-dimensional image. The plane shown in red is 1.6 μm above the plane in blue.

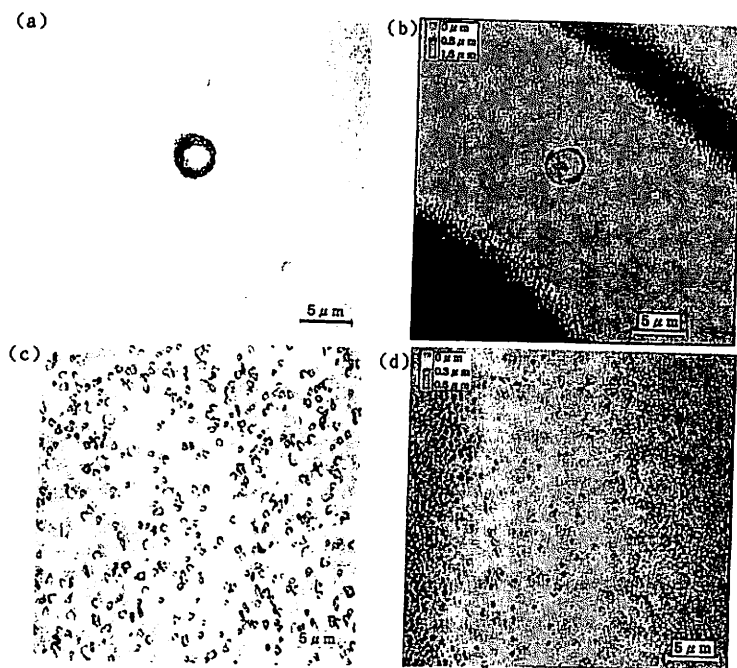


Fig. 5 3-Dimensional structural images. (a) and (b) are a reconstructed image showing an elevation structure on cellophane sample B and its colored 3-dimensional image, respectively. The plane shown in red is 1.6 μm above the plane in blue. (c) and (d) are a reconstructed image showing a number of depressions on cellophane sample C and its colored 3-dimensional image, respectively. The plane shown in red is 0.6 μm above the plane in blue.

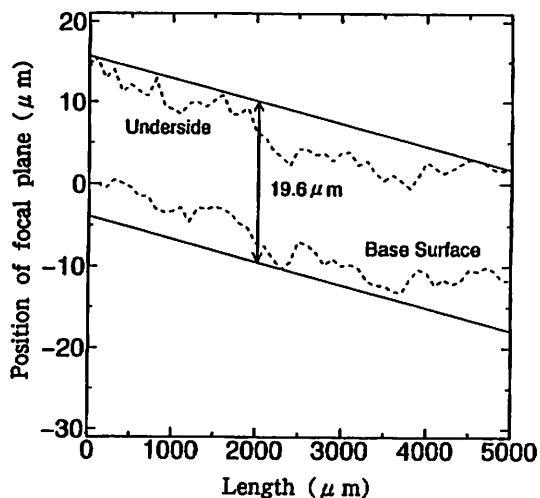


Fig. 6 Local fluctuation of the thickness of cellophane (sample A2) along cross-direction

<引用文献>

- 1) Young, J. Z. and Roberts, F., Nature 167, 231 (1951)
- 2) Wilke, V., Scanning 7, 88 (1985)
- 3) Wilson, T., Confocal Laser Scanning Microscope, Wilson, T. ed., Academic Press, London, p.1 (1990)
- 4) H. Yoshida, K. Ito, and N. Ise, Phys. Rev. B44, 453 (1991)
- 5) K. Ito, H. Yoshida, and N. Ise, Science 263, 66 (1994)
- 6) Jang, H. F., Robertson, A. G., and Seth, R. S., Tappi 74 (10), 217 (1991)
- 7) Verhoogh, H., van Dam, J., Posthuma de Boer, J., Draaijer, A., and Houpt, P. M., Polymer 34 (6), 1325 (1993)
- 8) T. Furuta, Y. Morikawa, K. Ito, and N. Ise, Tappi 77 (8), 128 (1994)

(原稿受付 1994年6月20日)

(審査受理 1995年2月14日)