

蛍光を用いた紙の分析法

Fluorescence analyses applied to paper

東京大学大学院農学生命科学研究科

生物材料科学専攻製紙科学研究室

江前敏晴

Toshiharu Enomae

Paper Science Laboratory, Department of Biomaterial Sciences

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

Abstract

Recently, analytical methods and applications using fluorescence for paper have been developed and reported. Definition of fluorescence, kinds of fluorescence analyses and apparatus of measuring fluorescence are first overviewed. In applications to paper, fluorescent properties of lignin including paper yellowing and the concept of the fiber kappa number are introduced. Then, techniques using Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) that has been functionalized remarkably are mentioned in detail. It is demonstrated that this apparatus is useful to three-dimensional and components distribution imaging such as paper additives distribution, visualization of fiber network, coating structure, three-dimensional morphology of ink-jet ink dots and microbiological examination.

1 蛍光分析について

1.1 蛍光とは

蛍光とは、ある物質が電磁波などのエネルギーにより励起され、そのエネルギーを特定波長の光として放出する発光現象及びその放出された光のことを指す。最も身近な例は蛍光灯であろう。低圧で管内に閉じこめた水銀の蒸気から放電によって出された紫外線が、管の内壁にぬった蛍光物質を励起して可視光を出す。励起するためのエネルギーは電磁波だけに限らず、熱や摩擦による場合もあり、全ての種類のエネルギーによる発光現象は一般にルミネッセンスと呼ばれる。ジュール熱による発光は白熱電球として利用され、電子線照射による蛍光はカソードルミネッセンスと呼ばれる。電子線により励起される蛍光 X 線は、走査型電子顕微鏡で元素分析の手段としてよく用いられ、蛍光の 1 種ではあるが、放出されるのは可視領域の光ではない。

蛍光放射は光化学反応の一つであるが、光のような電磁波ではない生成物を生むこともある。植物の光合成のような光化学的な反応は熱エネルギーを使わない効率的でクリーンな反応として注目を浴びている分野である。

1.2 蛍光分析の種類と応用例

蛍光を利用した分析は分光分析に分類される。通常の分光分析では紫外光や可視光などを照射し、測定対象とする物質の分子構造などに起因して吸収される特有の波長域の光の量を調べる吸収スペクトル分析が一般的である。これに対し、振動する固体や分子が、入射した光を散乱することにより生じた発光現象を測定することもできる。そのような散乱光の大部分は、入射光と同じ波長の光が散乱されるレイリー散乱である。入射光の波長と異なる波長の光が散乱する現象はラマン散乱と呼ばれ、物質の分子振動や格子振動などにより波長が変化する。入射光と散乱光の波数の差が散乱した分子に特有の値をとることを利用して分子構造を調べる手法がラマン分光法である。

蛍光も、入射光と波長の異なる散乱光を発光する現象であるが、光化学的には、入射光の吸収により分子内の電子は励起されて励起一重項状態となるが、基底状態に戻るときに余分なエネルギーを光として放出することによって起こる発光、と説明される。蛍光は、通常ラマン散乱光より強度が大きいいため、極希薄な又は極微量の試料に対しても感度の高い測定が可能である。

物質の蛍光測定にあたっては、分光蛍光光度計を用いて蛍光スペクトルを測定する。蛍光スペクトルには、励起スペクトルと発光スペクトルの 2 種類がある。前者は、ある波長範囲の入射光に励起されて一定波長で発光する蛍光強度のスペクトルであり、後者は、一定波長の入射光に励起されて発光する、ある波長範囲の蛍光強度のスペクトルである。一定波長間隔で励起光と蛍光を独立して走査したときの蛍光強度を測定すれば、横軸に蛍光波長、縦軸に励起波長を取り、3 次元的に蛍光スペクトルを表示することも可能である。

2 蛍光測定装置

2.1 分光蛍光光度計

分光蛍光光度計は、キセノンランプ光源から放射される光を励起側分光器により単色の光に変え、試料室に入れた試料に照射される。試料から放射された蛍光は、蛍光側分光器でスペクトルに分解し、光電子増倍管の検出器及び検出信号処理装置で各色の強度が測定される。試料が液体や溶液の場合は、無蛍光の石英セルに入れて測定する。セルに対しては正面からの入射で、 90° 方向に放射される蛍光を測定することになる。希薄な溶液試料では、その濃度に比例した強度の蛍光を放射するが、pH や温度、共存塩の有無と種類に影響されることに注意する必要がある。

固体や紙のようなシート状試料の場合は、試料ホルダーに挟んで照射される面が一定の位置に来るように調整する。紙のようなシート状試料では入射角、反射角とも 45° だが、仰角が 10° 程度あるので正反射光が検出器に入らないようになっている。固体試料の場合は蛍光物質が均一に試料内に分布し、十分な試料厚さがある場合を除いては濃度と蛍光強度の相関関係を得るのが難しい。

2.2 蛍光観察

生体細胞などでは自ら蛍光発光する物質も多く、また蛍光特性がなくても蛍光試薬で染色すれば蛍光観察が可能である。そのような蛍光放射のある物質の励起波長と蛍光波長がわかれば、水銀ランプの光（紫外から可視まで広い波長域の光を含む）を目的の物質に照射し、放射された蛍光領域だけの波長を選択的に通すと観察ができる。蛍光の波長域以外の光は目に入らないため蛍光放射のある成分だけが浮かび上がって見える。照明は光軸に沿って試料の真上から落とすように照射する落射蛍光観察が普通であるが、最近では臨界反射角よりも大きい角度（試料の真横に近い低い角度）から照明することにより透過光をなくし、カバーガラス表面から 100nm 程度のみ蛍光を発光させて（エバネッセント光という）観察する手法が広まりつつある。全反射照明蛍光観察法と呼ばれており、カバーガラスに接した近傍の境界面でのみ起こる現象を捉え、背景光の少ない高感度な画像が得られる。

蛍光観察の応用測定例は生理学や分子細胞生物学分野で多く見られる。試料を乾燥させる必要がないため生物体の細胞や組織、染色体などの観察に有利であり、多くの知見が得られている。蛍光観察は生物分野に限られた手法であるような錯覚を起こすほどであるが、材料学的にも有用な手法である。

2.3 共焦点レーザー走査顕微鏡のしくみと機能

通常の光学顕微鏡による蛍光観察では二次元的な（xy 平面の）画像しかえられない。三次元的な形状の測定には共焦点レーザー走査顕微鏡（Confocal Laser Scanning Microscope = CLSM）を用いる。図 1 に示すような共焦点機構による厚さ方向の光学的切片の作製が可能であるため、三次元（立体）像を得ることができるのが特長である。さらに共焦点によって起こる光量の低下を補うためのレーザー光による強力な照明がこれを可能にしている。

“共焦点”という用語は、“ピンホールを使って焦点の合っていない部位からの反射光を除くことにより非常に薄い単一層にだけ焦点を合わせてその層だけからの光を集める”ことを意味する。レーザー光は試料の真正面を照射し、散乱反射したものの一部が検出器に入り蛍光像を作る。三次元像は一連の単一層共焦点像をデジタル的に積算することにより構築される。また深さ方向の分析を迅速に行うため、高さ方向をピエゾ素子で移動させるステージを備えたものもあり、XZ 面を積層して三次元像を構成する。

3 紙パルプ分野での蛍光測定

3.1 リグニン分析

3.1.1 光による紙の黄変の測定

リグニンに蛍光特性があることが従来から知られており、この現象を利用して紙の光劣化、色戻り、黄変などを調べることができる¹⁾。図 2 は、高収率パルプ（スプルースの加圧碎木パルプ）85%とパインのクラフトパルプ 15%を混合した原料から抄いた紙について 350 nm の励起光による発光スペクトルを測定した結果である。紙に紫外線を 20 時間照射して強制的に黄変させた試料の表面が sample 1 であり、グラインダー（砥石を回転させるタイプ）

で表層を削り、表面から 11.1 μm の深さまで削って露出した表面が sample 2 で、以下、11.4、14.2、16.7、23.1 μm の深さの露出表面をそれぞれ sample 3、4、5、6 とする。また紫外線未照射の試料表面が sample 0 である。この紙は 350 nm の励起光で 446 nm にピークをもつ蛍光を放射することがわかる（図中の curve 5）。紫外線の照射により黄変し、ピーク波長が 30 nm シフトして 476 nm となる（curve 1）が、表面から深くなるに連れて（curve 2→3→4）ピーク波長は小さくなることわかる。したがってピーク波長で黄変の程度がわかり、この条件では深さ 20 μm における黄変は表面で起こる黄変の約半量の変化が起こっていることがわかる。

リグニンの蛍光特性の変化から、漂白と光黄変との関係や、黄変とは逆の光漂白を検討した研究もある²⁾。過酸化水素による CTMP（Chemi-thermo mechanical pulp）漂白では、白色度を測定する色領域である 420～450 nm 波長域の蛍光を増加させた。また水素化ホウ素ナトリウムなどの還元剤があると紫外線の照射により紙を漂白する効果があったが、リグニンのキノン構造を還元して蛍光特性のあるフェノールを生成するためと考えられている。

ECF、TCF 漂白、再生紙の普及とともに紙の黄変の問題が再度クローズアップされている中で、蛍光分光法を使ってパルプの黄変反応を検討した研究もある³⁾。5-ヒドロキシメチル-2-フルアルデヒドは、多糖類、ヘキセンウロン酸、その他から簡単に生成するが、その発色能を漂白か未漂白かに関連づけて可視/紫外及び蛍光の分光法を使って調べた。このフルアルデヒドを塗布したセルロースを熱と光に暴露したところ、発色の促進された波長域は、塗布しないセルロースが黄変したときの波長域と全く同じであった。この結果は、このフルアルデヒドがパルプの黄変の過程で中間体物質である可能性が高いことを示唆するものであった。

3.1.2 単繊維のリグニン量測定

リグニンの自家蛍光を利用してパルプのカッパー価を測定しようとする試み⁴⁾があった後、より精度を高くするために蛍光染料であるアクリジンオレンジがパルプ繊維に含まれるリグニンを染色することを利用してリグニン量を推定する研究が進展した⁵⁾。この研究では単繊維カッパー価という概念を提唱している。図 3 に示すように、リグニン量の違いによりアクリジンオレンジの蛍光が赤（長波長）側にシフトすることがわかった。蛍光強度のピーク高さとパルプのカッパー価には相関があることから、単繊維カッパー価を測定することができた。単繊維カッパー価の繊維間のばらつきはパルプ化が不均一であるほど大きかった。この原理は、FKA（Fiber Kappa Analyzer, 繊維カッパー価アナライザ）として製品化された⁶⁾。染色したパルプ懸濁液をセルに通し、緑と赤の CCD センサで同時に色を測定し、両色の比率からカッパー価を求めるものである。

同様の原理で、単繊維の表面にあるリグニン量が平均的なバルクのリグニン量と比較して多いのかどうかを共焦点レーザー走査顕微鏡で三次元的に測定して比較した研究もある⁷⁾。繊維表面の方がバルクより 2～3 倍多く存在していたことがわかり、この結果は X 線光電子分光法（XPS）による結果⁸⁾と一致していた。

新聞用紙の製造工程においてオンラインで蛍光をモニターすることにより紙の品質を制御することも可能である。紫外/可視波長域の光を照射し、リグニンが放射する蛍光を測定すればリグニンの偏在の程度がわかる。リグニンの偏在を生じさせるような紙の品質に係するパラメータとして結束繊維の数やワイヤーマークなどがあり、乾燥工程での収縮も時系列で計算できる⁹⁾。

3.2 紙の構成成分の分布の解析への応用

3.2.1 紙力増強剤の分布

ポリアミドエピクロロヒドリン (PAE) などの湿潤紙力増強剤がどのように紙力を発現するかメカニズムについてはまだ未解明の部分があり、紙中の PAE の分布を調べることは解明の一助となる。PAE を蛍光染料であるスルホローダミン 101 酸塩化物で選択的に染色し、シート中の樹脂の分布を観察した報告がある^{10) 11)}。繊維はアクリジンオレンジで染色する二重染色により、繊維ネットワーク上のどこに PAE が存在するのかがわかり、PAE 添加量を増加させたり、繊維の叩解を進めたりすると、PAE が繊維の交点に集中して存在するようになることを明らかにした。

3.3 紙の構造の解析への応用

3.3.1 紙層構造の分析

CLSM が紙に適用された初期の頃は、成分によって染色し分ける組織学的な分析よりも、紙が均質な構造体であると考えたときの形状を測定する幾何学的な分析が主な目的であった。共焦点機能を利用して表面プロファイルの測定を行った例として、マットコート紙の三次元的な表面形状の測定を行い、人が光沢をどのように認識するかという知覚を表面の形状と関連付けた研究がある¹²⁾が蛍光法とは関係がない使い方である。CLSM らしい使い方として光学的切片法による薄層への分解及び動的閾値 2 値化による繊維部分抽出の画像処理法を用いて紙層構造を決定した報告がある¹³⁾。繊維のネットワーク構造を紙の物性に結びつけた研究もあり、カレンダーリングによる繊維ネットワーク構造の変形を可視化し、その変形が塗工層の巨視的に見た弾性-粘塑性的圧縮挙動と相関があることが見出された¹⁴⁾。著者らは、リサイクルによる繊維の角質化が繊維間結合を阻害する様子をアクリジンオレンジで染色したパルプ繊維の蛍光観察から推測した¹⁵⁾。図 4 に示すように、Wet post-R0 は広葉樹クラフトパルプを叩解後、湿紙を形成した湿潤状態であり、スライドガラス上での乾燥中に強固な繊維間結合を形成する様子 (Dry post-R4) が光学切片の断面像として得られた。4 回目のリサイクルを経ると湿潤状態 (Wet post-R4) にある繊維間距離とあまり変わらない形態を乾燥後 (Dry post-R4) も呈していることがわかる。繊維の角質化と膨潤性の低下及び繊維間結合能の低下が連動していると考えられた。

著者らは、厚さ 5 μm ごとに光学的切片を作製し各 xy 平面ごとに繊維の配向性を計算し、それが z 方向にどう変化して行くかを調べることに応用した。紙はあらかじめアクリジンオレンジで染色しておいた。市販中質紙は厚さ方向のどの位置でも繊維が強く配向してお

り、配向度は 1.30 であった。コピー用紙の繊維配向強度はこの方法で計算すると 1.15 程度であり、弱い繊維配向を示した。熱ロールを通過する際の収縮によるシワの発生を防止するために製造上繊維配向を抑えるという紙の三次元構造的な特徴を捉えることができた^{16, 17)}。

3.3.2 塗工層構造の分析

塗工紙の塗工層の構造を電子顕微鏡レベルより広い範囲で非破壊で明らかにしようとする研究もある。原紙と区別して塗工層だけを光学的に抽出する方法として、蛍光試薬であるローダミン B で塗工層を染色し、塗工層の沈み込み深さを測定した^{18, 19)}。図 5 の発光スペクトルに示すとおり、塗工層中の成分のうち、実際に染色されたのはカルボキシ変性 SB-ラテックスであり、カオリンクレーや炭酸カルシウムの顔料、デンプン、ポリビニルアルコール及びセルロース繊維はほとんど染色されなかった。図 6 は、ダブル塗工紙の光学切片による xz 断面である。蛍光のコントラストの差により 2 つの層が識別されている。両層ともローダミン B で染色されているが、ラテックスの量だけではなく化学的な組成の違いにより染色し分けることができることがわかった。

塗工層の原紙層への沈み込みを走査型電子顕微鏡 (SEM) による観察結果に一致することを検証した研究もある²⁰⁾。SEM に比べると、非破壊で測定が行える点で CLSM は優れている。また塗料中に蛍光染料を添加して塗工することにより、水系成分の原紙への浸透が分析可能であることが明らかにされた。

3.4 インクの浸透及びドットの 3 次元形状測定

3.4.1 インクジェット印刷への応用²¹⁻²³⁾

インクジェットのインクの色材には染料タイプと顔料タイプがある。染料インクは、分子オーダーでパルプ繊維や塗工顔料と結合あるいは吸着しているが、カチオン性ポリマーを介することによってその相互作用は強固となり、湿潤時にもその結合は簡単に切れることはない。染料およびカチオン性ポリマーは両方とも水溶性であり、乾燥後も一定の形状は持たない。したがって、顔料インクとは異なり、固体に対する形態学的手法で染料インク分布を測定することは困難であり、分光学的な手法を応用するのがよい。インク色材である染料は、入射した光を特異的に吸収することによって固有の色を出しているのが染料そのものが蛍光特性も併せ持つと考えられるが、インクによっては色材とは別にセキュリティ印刷のために蛍光染料を加える場合もあるようである。

シリカ塗工のある写真画質、高光沢、汎用の各タイプのインクジェット専用紙を試料とし、ドット面積率が 10~20% の均一な単色パターンをシアン、マゼンタ、イエロー及びブラックの各色インクで印刷した。プリンタは、キヤノン製 Pixus 950i 及びエプソン製 PM-970C であった。印刷部分を採取し、スライドガラスに載せ、流動パラフィンを含浸させた。流動パラフィンの屈折率 1.47 がシリカの 1.45 に非常に近く、光の屈折が少なく透明に見える

のでより深い紙の内部まで観察が可能となる。カールツァイス製 LSM 510 及び対物レンズ Plan-Neofluar 40X/0.75 を用いた。この倍率では XY 平面の画像は $230.3 \times 230.3 \mu\text{m}^2$ の大きさに相当する。z 方向の走査では共焦点面の厚みを $0.60 \mu\text{m}$ に設定した。レーザー光源の選択は、蛍光試薬データベースから FITC/Rhod/Cy5 のモードを選択した。マゼンタインクは一般的な蛍光試薬 Rhod と同様の蛍光特性を、ブラックインクは同じく Cy5 と同様の蛍光特性を示すことがわかったためである。この 2 つの蛍光特性を表 1 に示す。なお、エプソンとキヤノンのインクの両方についてこの特性は共通していた。

図 7 の A、B は、写真画質インクジェット紙 A 及び B にそれぞれ印字したマゼンタインクドットの正射影図である。XY 平面を示す正面図の中に示される直交する 2 本の線のうち、横線に沿って仮想的に断面(光学的切片)を作ったときの XZ 平面が、上方の細長い図で、縦線に沿った断面が右方の YZ 平面に相当する。平面的なドットの形状に加えて個々のドットの厚さが評価できる。その厚さは、紙 A、B の場合とも約 $4 \mu\text{m}$ である。図の C、D は、同様に高光沢タイプインクジェット紙 C 及び D の正射影図である。どちらの試料でもドットの周囲に輝度の高い断片的な曲線が多数存在する。これらは、インク染料の一部が塗工層表面にあるクラックの壁面に沿って濡れ広がり、そこに集中したものと考えられる。キャスト塗工により製造されたと考えられるが、乾燥時の水溶性バインダの収縮のために塗工表面にこのようなクラックを残す。断面像からは、その浸透インクの足の長さは正常なインク浸透距離の 2~3 倍にも及んでいることがわかる。

一般的なインクジェット印刷物の蛍光観察では、基本 4 色のいずれもが蛍光発光すれば全てのドットの形状を測定できる。既にわかっているマゼンタとブラックに加え、イエローとシアンについても蛍光特性の有無を検討した。図 8 は、ろ紙にインクジェットの顔料インク(EPSON PX インク)の基本 4 色をそれぞれ滴下し、分光蛍光光度計(日立 F-2500)で測定した 3 次元表示の蛍光スペクトルである。明るい部分が蛍光を示している。縦軸の励起波長が照射できるレーザー光の波長(488、543、及び 633 nm)となるような水平線を 3 本引き、明るい部分を通過するところの蛍光波長に検出フィルタを設定すれば蛍光の観察ができることになるが、実際には CLSM の仕様上任意の検出フィルタを設定できるわけではないので、励起波長と検出フィルタの組み合わせは限定される。この蛍光スペクトルを参考にして CLSM で蛍光観察を行ったところ、イエローインクは、488 nm のレーザー光照射及び BP505-530(BP はバンドパスを意味し、この間の波長[nm]の光を通す)の検出フィルタの条件でははっきりと観察することができた。また、ある写真用インクジェット紙にシアンとイエローの 2 色で印刷した試料では図 9 に示すとおり、この 2 色を同一の条件(488 nm の照射及び BP505-530 の検出フィルタ)で蛍光観察でき、4 色を同時に観察することも可能であった。しかし、ある普通紙(非塗工紙)では、同じ光学条件でシアンのドットを観察できなかった。写真用インクジェット紙に多く含有する蛍光増白剤の影響でクロストーク(ある物質の蛍光が別の物質を励起し、二次的に蛍光が見られる現象)が発生している可能性があるが、はっきりした理由はわかっていない。

インクジェットのインクには染料タイプと顔料タイプがあるが、この 2 種のインクを市販のオフセット印刷用の塗工紙に印刷し、インクの浸透の程度を CLSM で観察し、光学的切片である断面像を比較した研究がある²⁴⁾。図 10 の(B)に示すように、顔料インクは塗工層にわずかしこ浸透しなかったと

考えられ、顔料は紙表面にとどまっていることがわかる。それに対し、染料インク(A)は塗工層に浸透し原紙層内にまで及んでいた。染料インキを使った印刷では、染料定着剤を含有していないオフセット用塗工紙に対しては良好な印刷品質は得られず、塗工層表面に定着させることはできなかった。浸透深さは約 20 μm であると測定された。

3.4.2 オフセット印刷の評価

カラー化の進展に伴い高い印刷品質を要求される新聞用紙上のインク分布と表面形状の関係を明らかにするための検討を行った報告がある²⁵⁾。強い蛍光性を持つ顔料を含むイエローのオフセットインキでベタ印刷し、共焦点レーザー走査顕微鏡で表面形状とインキの分布を測定し画像化した。紙表面平均高さとのインク付着表面平均高さの差は、印刷品質評価との間に相関があり新聞用紙の印刷品質の良否を判別するのに有効であった。オフセット用顔料インキの蛍光特性を印刷品質の評価に利用した例である。

3.4.3 テキスタイルへのインクジェット捺染の評価

布や不織布に図柄のプリントを行う場合は凹版のローラー捺染で行うことが多いが、最近はインクジェット方式の印刷を使って行うことも増えてきた。繊維加工に使われる油剤の特性によってはインクジェットのインクの浸透性に差があり、にじみが多い場合もある。図 11 は捺染のインクが布の中の特定の繊維を染色しやすいかどうかを厚さ方向に CLSM を使って光学的切片を作りながら観察したうちの 1 枚の画像である。インクの浸透深さを正確に測定できるほか、どの繊維に問題があるかを推測することができる。

3.5 パッケージ分野での応用

3.5.1 酸素量測定

容器内の液体や気体の中に含まれる酸素濃度が測定できる光学式酸素センサが最近開発された。これは、ある蛍光性物質から放射された蛍光が酸素により消光する現象を応用したもので、蛍光の強度や減衰の位相差を計測することにより、1~3 ppb の精度で酸素濃度を測定できる。センサそのものはフィルム状であり、これを粘着ラベルとしてパッケージに貼り付けて使用することが検討されている²⁶⁾。しかし、センサにロット間のばらつきがあるなど安定した定量的測定にはまだ課題がある。種々のパッケージで酸素透過速度を測定するなどの検討が行われている²⁷⁾。食品産業ではパッケージを傷つけることなくオンラインで酸素量のモニターを行う技術は重要であり²⁸⁾、この手法の開発に対する努力は続けられていくであろう。

3.5.2 微生物発生量測定

最近 ISO でも、食品包装容器の安全性に関連して、腐敗による微生物発生量を測定する方法が試験規格となっている²⁹⁾。微生物が生産する物質を蛍光染色して存在や分布を観察することができる。食品包装用板紙をアクリジンオレンジで蛍光染色して腐敗によるバクテリアの発生状況を観察した結果、ポリエチレン層とセルロース繊維層の界面に集中していることを見出した報告³⁰⁾がある。紙の製造工程中に用いられるデンプンなどのポリマーは微生物

物による腐敗を受けやすい。蛍光試薬で染色し蛍光を測定することにより不透明な光散乱する微生物体を検出できる専用の蛍光光度計も製紙工場で試用されている³¹⁾。

4 おわりに

蛍光分析は他の分光分析と比較して、蛍光物質の量が微量である場合や低濃度である場合でも検出の感度が高い特徴がある。水に懸濁した状態のパルプ繊維は乾燥により大きく形態や性質が変わるが、水の中にある状態でも選択的な蛍光試薬で染色すれば正確にその形状を測定でき、乾燥後と比較することも可能である。複数の蛍光試薬による多重染色では各々の染め分けられた成分の分布を知ることができる。また共焦点機構を利用した CLSM では三次元的な形状や分布の情報も得ることができ、生体の細胞に限らずパルプ繊維の構造や紙の構造、インクの分布を非破壊で解析する目的に対して非常に有用な技術となっている。特に偶然得られた箇所の切片ではなく、走査した範囲でなら任意の切片を光学的に得られる点が優れている。蛍光を利用したパルプ繊維や紙の分析はまだ始まったばかりであり、今後色々な材料学的応用技術が進展するものと期待できる。

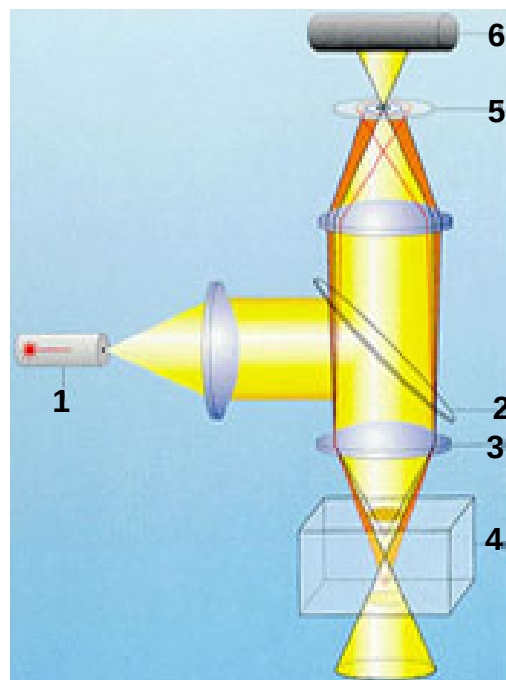


図1 共焦点レーザー走査顕微鏡の構造 **1**- 光源（レーザー）、**2**- ダイクロイックミラー、**3**- 対物レンズ、**4**- 試料、**5**- ピンホール、**6**- 検出器
(カールツァイスホームページより引用)

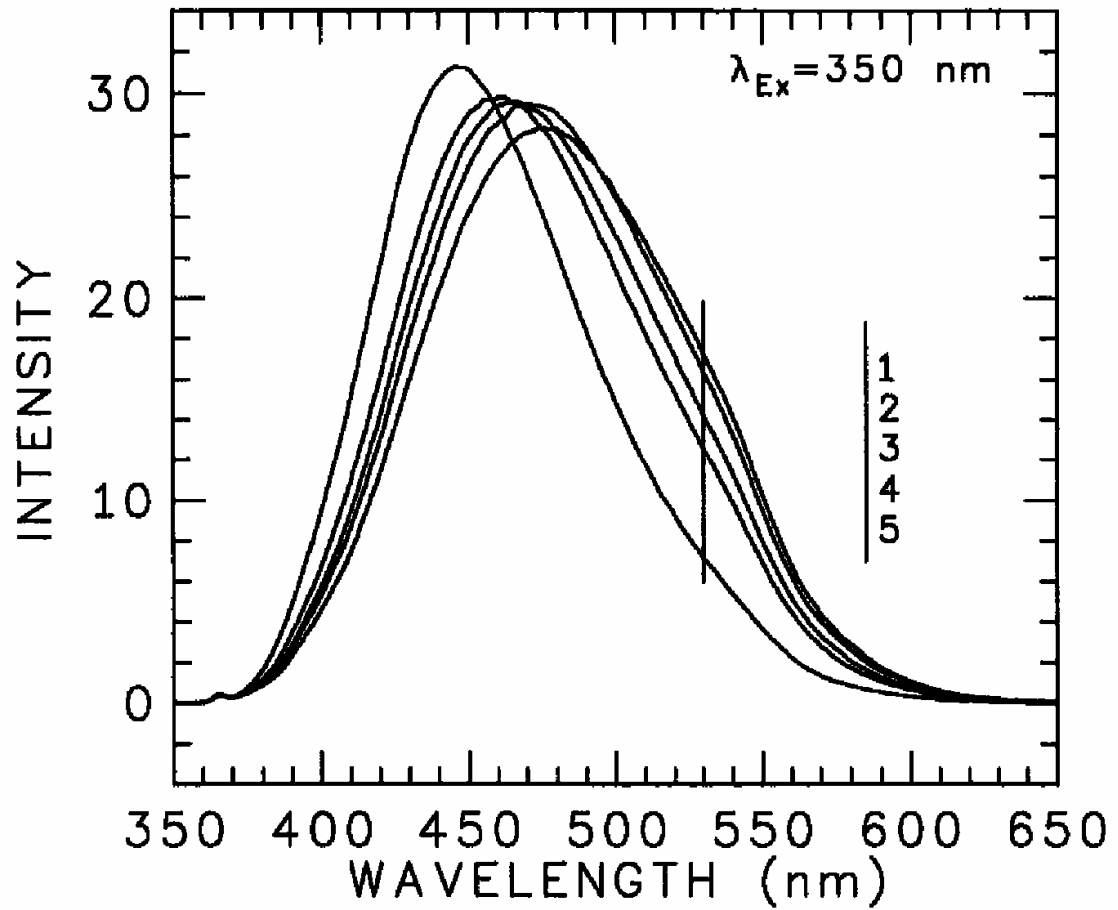


図2 光黄変した紙の表層を削り取った表面の蛍光スペクトル。curve 1 = sample 1; curve 2 = sample 3, curve 3 = sample 5; curve 4 = sample 6; curve 5 = sample 0. (文献1から引用)



図3 単繊維カッパー価がそれぞれ14、32及び82と計算された繊維で、色はそれぞれ緑、黄橙、赤橙色を呈している。(この白黒画像ではこの色の順で繊維が明るい色から暗い色になっている。文献5から引用)

表 1 インクジェットインクの分布測定に適用した光学的条件

蛍光染料タイプ	Rhod	Cy5
最大励起波長, nm	550 (緑)	650 (赤黄)
最大蛍光波長, nm (色)	580 (緑黄)	667 (赤)
入射光波長, nm (出力)	543 (100 %)	633 (80 %)
検出フィルタ波長, nm	560-615	>650
蛍光発光するインキ色	マゼンタ	ブラック
画像上での擬似カラー	赤	青

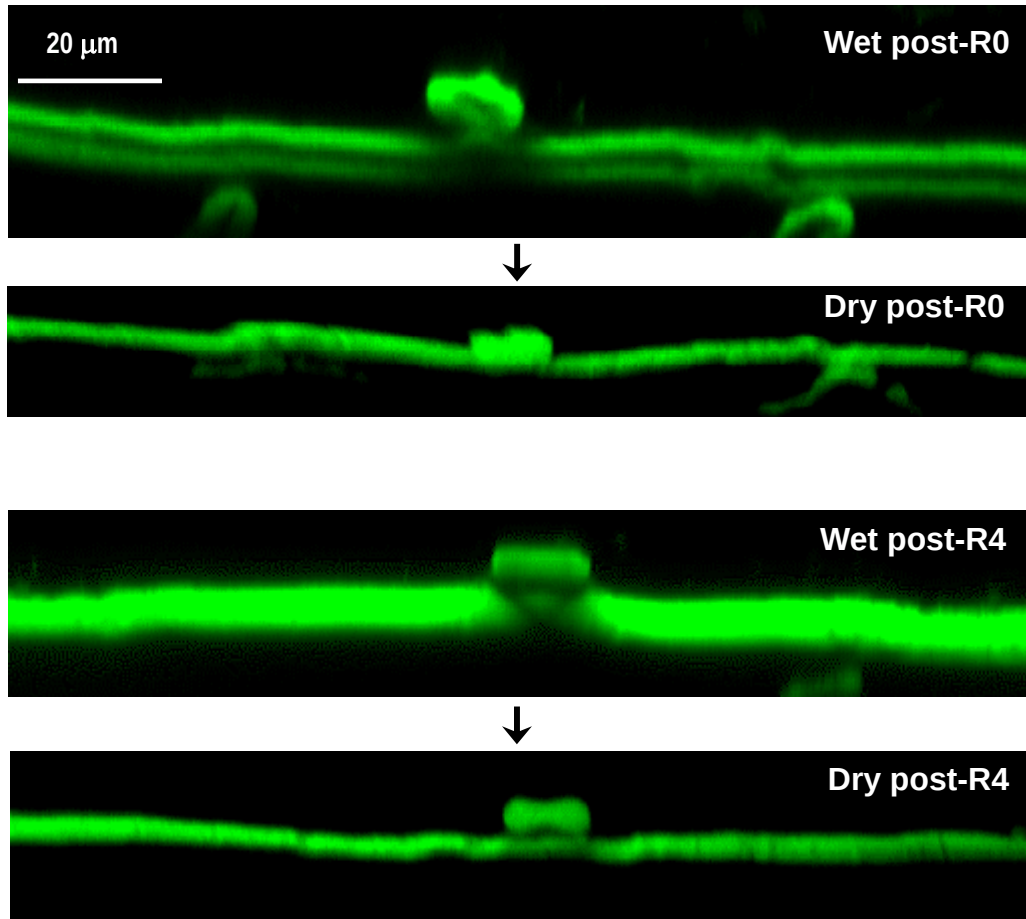


図 4 広葉樹漂白クラフトパルプ繊維の繊維交点における断面形状. post-R0 スラリーの膨潤した繊維の方が post-R4 スラリーの扁平化した繊維よりも柔軟で、乾燥状態での繊維間接触を促進する.(文献 15 より引用)

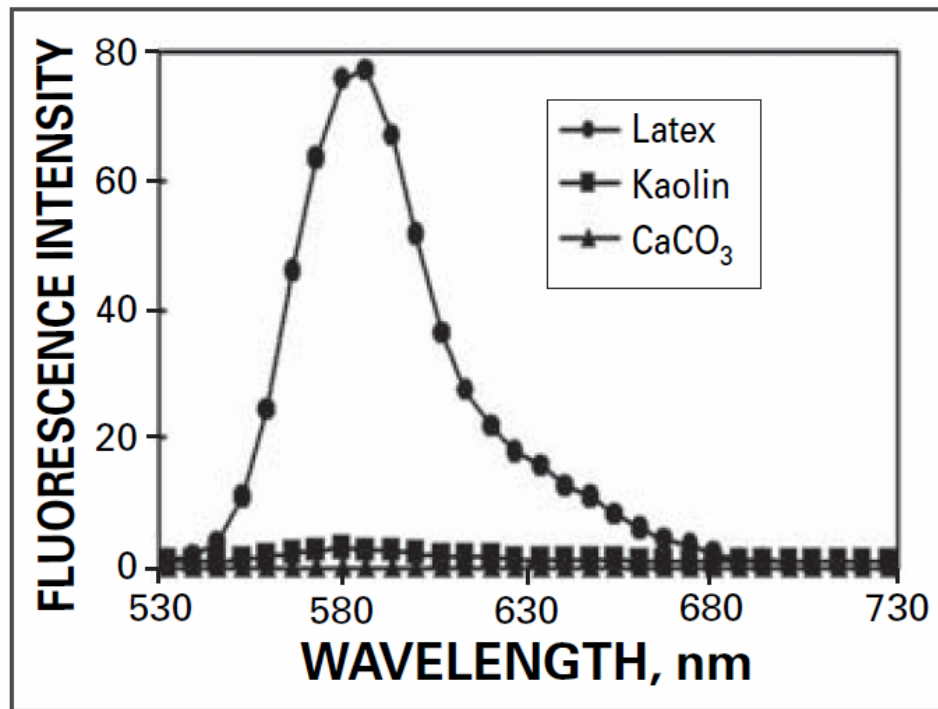


図5 ラテックス、カオリン、炭酸カルシウムをローダミンB(最大励起波長 514 nm)で染色したときの蛍光スペクトル (文献 18 より引用)

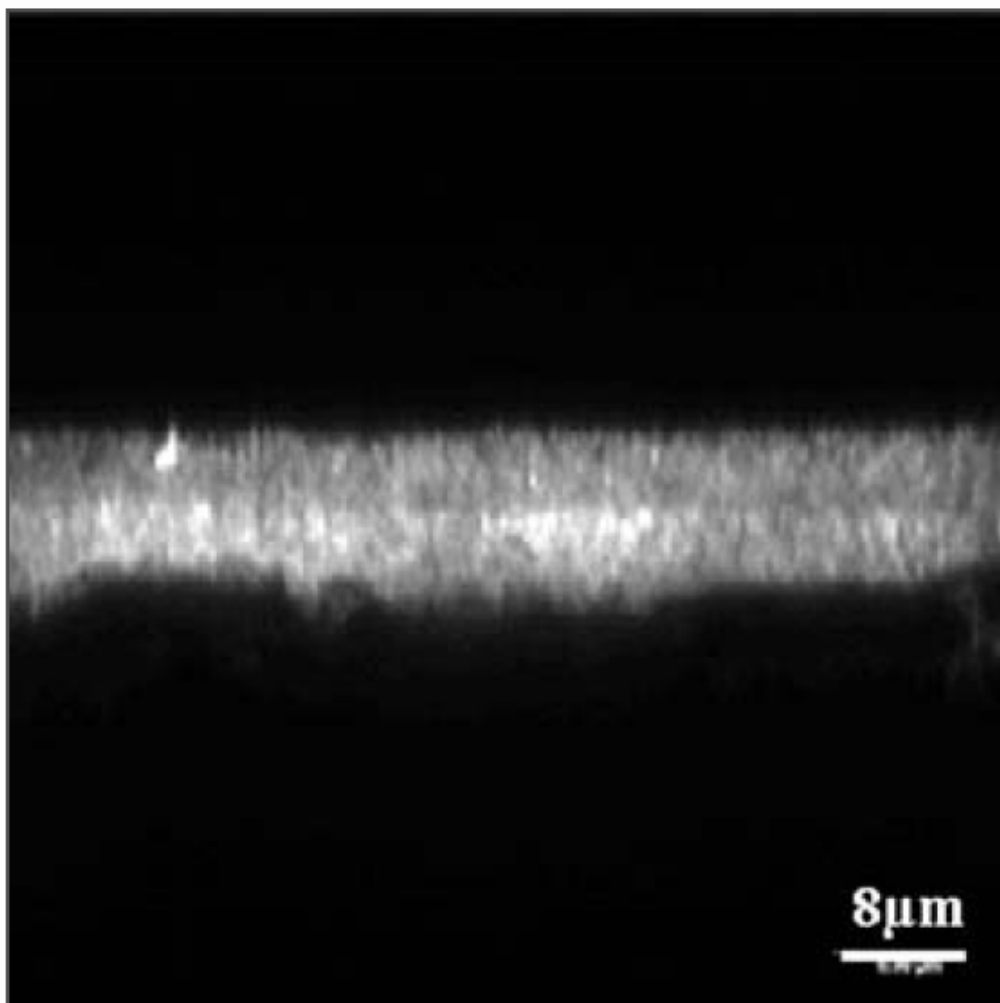


図 6 XZY 法によって得られたダブル塗工紙の断面画像(文献 21 より引用)

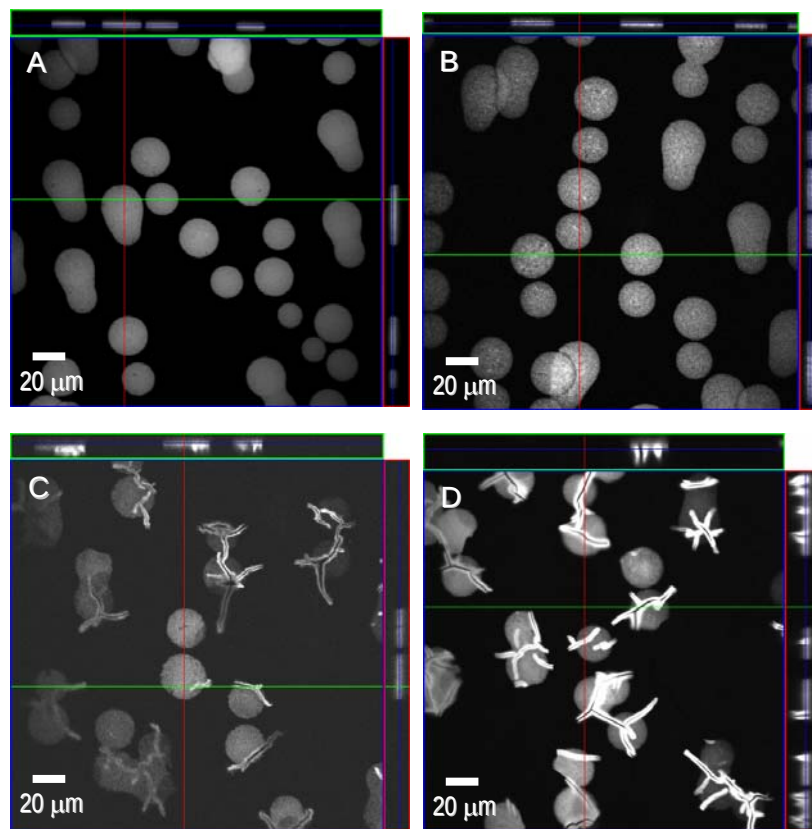


図 7 写真画質インクジェット紙 A, B 及び高光沢タイプインクジェット紙 C, D 上のマゼンタインクのドット (文献 24, 25 より引用)

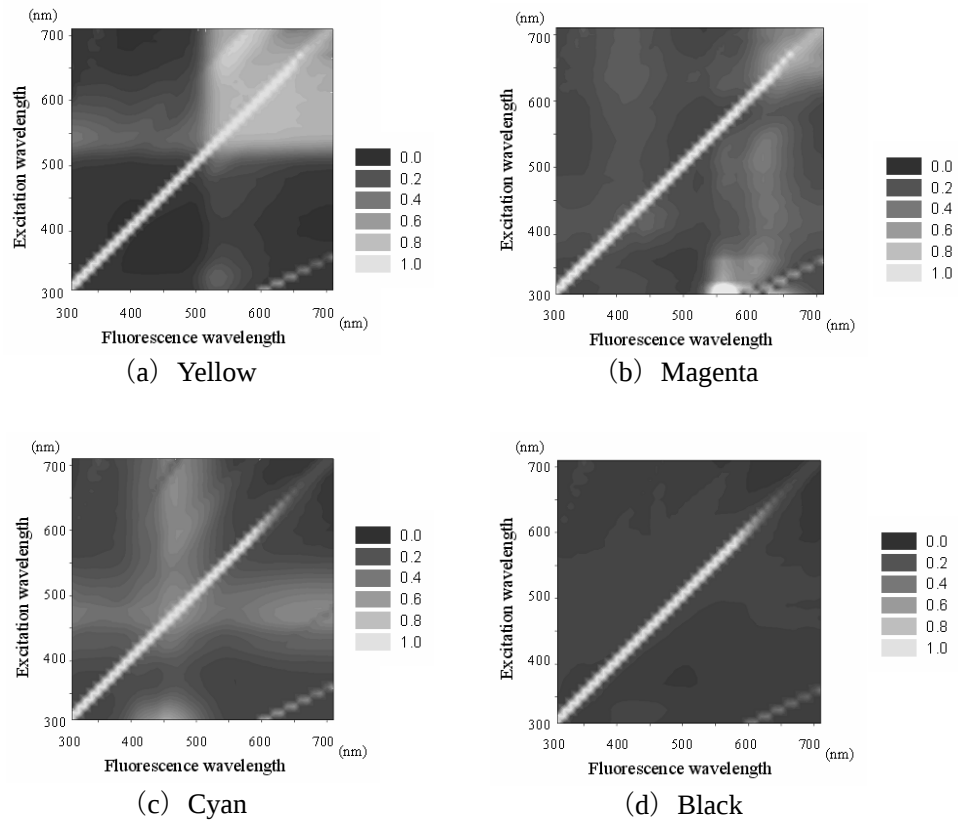
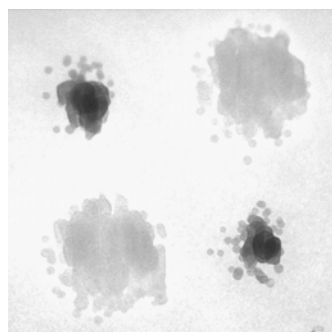
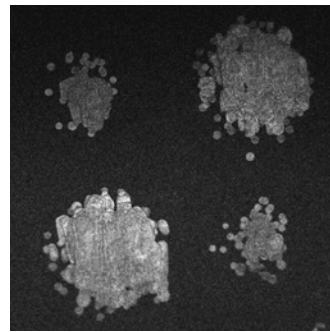


図8 インクジェットインクの基本4色をそれぞれろ紙に吸収させて測定した蛍光スペクトル(文献 23 より引用)



(a) 透過画像



(b) 蛍光画像

図 9 イエロー[画像内右上・左下]とシアン[左上・右下]のインクを組み合わせ
て印刷した写真画質インクジェット紙を白色透過光観察(a)及び蛍光観察(b)
した画像(文献 23 より引用)

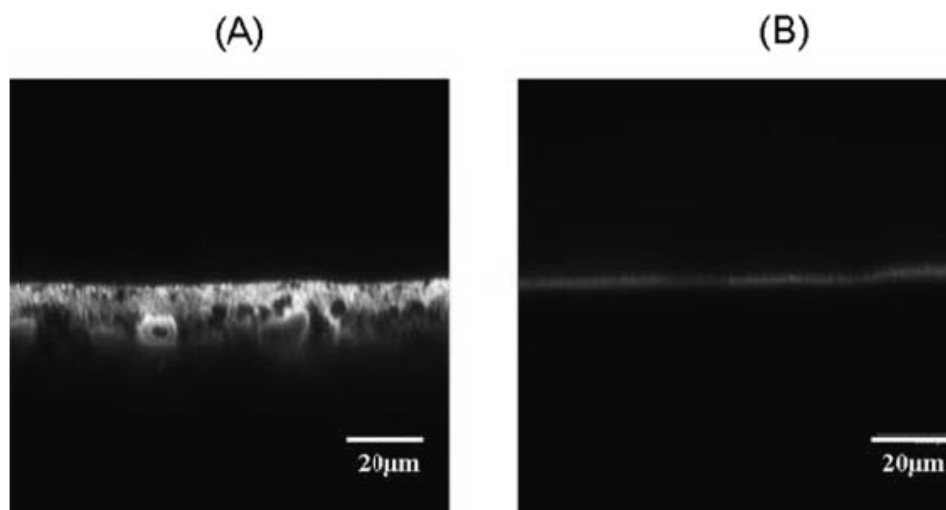


図 10 市販塗工紙に印刷した染料タイプ(A)及び顔料タイプ(B)の高い光学濃度位置でのインクのXZ断面像(文献 27 より引用)

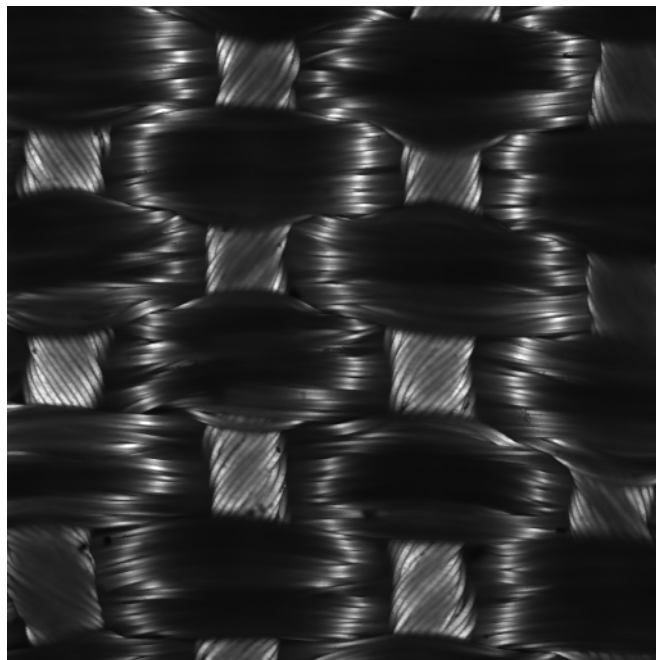


図 11 インクジェット方式で捺染した布の染色の程度を CLSM の光学的切片を作製して評価した画像のうちの 1 枚。インクの浸透深さと繊維の染まり方の良否を評価できる。

引用文献

1. Davidson, R. S. and Dunn, L. A., "A study of the photobleaching and photoyellowing of paper containing lignin using fluorescence spectroscopy.", J. Photochem. Photobiol. A; Chem., 58, 349-359(1991).
2. Forsskahl, I. Olkkonen, C. Tylli, H., "Depth profiling a photochemically yellowed paper. Part I: UV-visible reflectance and fluorescence spectroscopy.", Applied Spectroscopy 49(1), 92-97(1995).
3. Forsskahl, I., Tylli, H., Olkkonen, C., "Participation of carbohydrate-derived chromophores in the yellowing of high-yield and TCF pulps", Journal of Pulp and Paper Science, 26(7), 245-249 (2000).
4. Oldham, P. B., Wang, J., Conners, T. E., Schultz, T. P., "Rapid secondary analysis of pulp lignin: a review of NIR and FTIR and preliminary investigation of multidimensional fluorescence spectroscopy", 1993 TAPPI Pulping Conference Proceedings, 649(1993).
5. Liu, Y., Gustafson, R. R., Callis, J. B. and Mc-Kean, W. T., "A novel method to measure fiber kappa number", TAPPI JOURNAL, 82(9), 107-111(1999).
6. Robinson, J. K., Gustafson, R. R., Callis, J. B. and Bruckner, C., "Measurement of kappa number variability on the fiber level", TAPPI JOURNAL, 1(12), 3-8(2002).
7. Li, K. and Reeve, D. W., "Imaging wood pulp fibre surface lignin by fluorescence confocal laser scanning microscopy", International Papermaking and Environment Conference Proceedings, Tianjin, P. R. China (May 12-14), Book B, 72-80 (2004).
8. Li, K. and Reeve, D. W., "The origins of kraft pulp fibre surface lignin", Journal of Pulp and Paper Science, 28(11), 369-373 (2002).
9. Carlsson, J., Nilsson, C.M., Malmqvist, L., Persson, W., "Application of optical fluorescence spectroscopy to paper production", 1999 International Paper Physics Conference Proceedings, 429-436 (1999).
10. 尾崎靖, "共焦点レーザー顕微鏡による紙中の湿潤紙力増強剤の観察", 繊維学会予稿集 2003, 58: 176(2003).
11. Ozaki, Y., Bousfield, D.W. and Shaler, S.M., "The characterization of polyamide epichlorohydrin resin in paper –relationship between beating degree of pulp and wet strength", Appita Journal, 59(4), 326-329 (2006)..
12. Beland, M. C., Lindberg, S. and Johansson, P. A., "Optical measurement and perception of gloss quality of printed matte-coated paper", J. Pulp Paper Sci., 26(3): 120-123(2000).
13. Xu, L., Parker, I. and Osborne, C., "Technique for determining the fibre distribution in the z-direction using confocal microscopy and image analysis" Appita J., 50(4): 325-328(1997).
14. Aggelidis, C. N., Pasquali, M. and Scriven, L. E., "Calendering: rheology, computations, and experiments" Proceedings of the International Congress on Rheology, 13th, Cambridge, United Kingdom, Vol.3, British Society of Rheology, Glasgow, UK: 425-427(2000).
15. Khantayanuwong, S., Enomae, T. and Onabe F., "Effect of fiber hornification in recycling on bonding potential at interfiber crossings: Confocal laser-scanning microscopy", Japan Tappi J., 56 (2): 79-85(2002).
16. 江前敏晴, "画像処理を用いた紙の物性解析手法", 紙パルプ技術タイムス 48(11), 7-17 (2005).
17. 江前敏晴, 韓允熙, 磯貝明, "共焦点レーザー顕微鏡による積層画像から求めた紙の繊維配向の Z 方向分布", 第 54 回日本木材学会大会 (札幌) 研究発表要旨集, 289(2004).
18. Ozaki, Y., Bousfield, D.W. and Shaler, S.M., "Three dimensional observation of coated paper by confocal laser scanning microscope", TAPPI JOURNAL, 5(2), 3-8 (2006).
19. 尾崎靖, Bousfield, D.W. and Shaler, S.M., "共焦点レーザー顕微鏡による塗工紙の三次元観察", 第 72 回紙パルプ研究発表会講演要旨集, 紙パルプ技術協会, 04-A(2005).
20. 平井健二, Bousfield, D.W., "共焦点レーザー顕微鏡を用いた塗料沈みこみの観察", 第 73 回紙パルプ研究発表会講演要旨集, 紙パルプ技術協会, 106-111(2006).
21. Enomae, T., Ivutin, D. and Isogai, A., "Three-dimensional distribution of ink-jet inks in paper

-
- acquired by confocal laser scanning microscope", Proceedings of 58th APPITA Annual Conference & Exhibition (Pan-Pacific Conference session), 577-588(2004).
22. 江前敏晴, イブーチン・ドミトリー, 磯貝明, "共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いたインクジェット印字の3次元ドット形態観察", 第71回紙パルプ研究発表会講演要旨集, 紙パルプ技術協会, 22-27(2004).
 23. 内藤美紀子, 江前敏晴, 磯貝明, 長島寿人, "共焦点レーザー走査型顕微鏡によるインクジェットインク分布の観察", 第117回秋期研究発表会講演予稿集, 日本印刷学会, 91-95(2006)
 24. Ozaki, Y., Bousfield, D.W. and Shaler, S.M., "Observation of the ink penetration into coated paper by confocal laser scanning microscope", TAGA JOURNAL, 3, 51-59(2002)
 25. Dickson, A., "Quantitative assessment of ink pigment position within the surface of a newsprint sheet", Proceedings of 58th APPITA Annual Conference & Exhibition (Pan-Pacific Conference session), 137-142(2004).
 26. Bacon, T. P., "Fluorescence - based sensor "labels" for non-invasive oxygen monitoring in packaging", 2002 TAPPI Place Conference Proceedings, 45(2002).
 27. Lundquist, L.R., Pelletier, C. and Wyser, Y., "Oxygen transmission rate measurement using oxygen sensitive fluorescent tracers", 2004 TAPPI Place Conference Proceedings, 9(2004)
 28. Daini, D., "Non-invasive oxygen measurement using the oxysense® fluorescence technology and its implications for active packaging", 2004 TAPPI Place Conference Proceedings, 74(2004)
 29. ISO 8784-1:2005 Pulp, paper and board -- Microbiological examination -- Part 1: Total count of bacteria, yeast and mould based on disintegration (パルプ, 紙及び板紙—微生物検査法—第1部: 離解によるバクテリア, イースト菌及び糸状菌類の全数カウント) .
 30. Suominen, I., Suihko, M.-L., and Salkinoja-Salonen, M., "Microscopic study of migration of microbes in food-packaging paper and board", J. Industrial Microbiology & Biotechnology, 19(2): 104-113(1997).
 31. Ramesh, S. and Banks, R., "Real time assessment of microbial activity in paper coatings and additives", 2002 TAPPI Technology Summit Proceedings, 142(2002).