

共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いる顕微吸光度分析

宮崎大学 工学部教育研究支援技術センター
松本 朋子

はじめに

新規機能性材料の開発と関連して、マイクロビーズ、微粉体、マイクロカプセルなどの数十から数百マイクロンの大きさの微小固体材料が注目されており、これらの微小材料の定量分析技術の開発が重要となっている。今までに、FT-IR および UV-vis 分光、反射分光¹⁾、および蛍光解析²⁾ などによるマイクロビーズの表面解析およびその破砕物の定性分析が報告されているが、定量分析についての報告が少ない。特に、顕微可視分光光度計が普及していないために、微小領域の可視吸光度分析の報告例が少ない。

我々は、共焦点レーザー走査型顕微鏡(Confocal Laser Scanning Microscope: CLSM)において、付属する透過照明装置を利用して吸光度分析が行えるのではないかと考え、CLSM を用いる微小領域での吸光度分析法の開発を目指している^{3,4)}。CLSM によって光透過性の微小材料の吸光度および光路長を正確に測定できれば、溶液における吸光度分析と同様の原理で微小材料中の特定の発色団の濃度を決定することができると考えられる。

そこで、本論文では、ミクロンオーダーの球状シリカゲル(SiO₂)にアンチモンポルフィリン錯体を吸着させてマイクロビーズを調製し、これを試料として用いて CLSM による顕微吸光度分析の精度および適応範囲等について検討を行ったので報告する⁵⁾。

キーワード：共焦点レーザー走査型顕微鏡 吸光度分析 顕微分光 シリカゲルマイクロビーズ アンチモンポルフィリン錯体

1 実験

1.1 試薬

マイクロビーズの調製に必要なジヒドロオキソ(テトラフェニルポルフィリナト)アンチモン臭化物錯体(**1**; C₄₄H₃₀N₄O₂SbBr, 分子量 M= 848.4)は、既報にしたがって合成した⁶⁾。**1**の紫外可視吸収スペクトルをアセトニトリル中で測定し、Soret 帯および Q 帯の極大吸収波長である 417 nm および 547 nm におけるモル吸収係数(ε₄₁₇およびε₅₄₇)をそれぞれ 5.62×10⁵ dm³ mol⁻¹ cm⁻¹ および 2.14×10⁴ dm³ mol⁻¹ cm⁻¹ と決定した。

マイクロビーズの調製には、平均粒径 (b_{av}) 50 μm (SiO₂-a と略) および 150 μm (SiO₂-b) の二種類の球状 SiO₂ (富士シリシア化学, CARiACT Q-10) を用いた(図 1)。濃度計算に必要な SiO₂ の粒子比重(ρ)は、石英の比重(2.2)および細孔容積(P)を用いて式(1)によって算出した(表 1)。

$$\rho = 1 / (2.2^{-1} + P) \quad (\text{式 } 1)$$

1.2 マイクロビーズ(2)の調製

メスフラスコ (250 cm³) に **1** (12.7mg または 12.5 mg) を入れ、メタノール (50 cm³) を加え、トルエンでメスアップして溶液 I を調製した。また別にトルエン-メタノール (4:1) 混合溶媒 (溶媒 II) を用意した。

次に、ナスフラスコに重量 W₀ (100 mg) の SiO₂ を入れ、溶媒 II を V₂ cm³ および溶液 I を V₁ cm³ 加えた。加

えた溶液 I 中に含まれる **1** の重量 (W₁/mg) を式 2 で求めた。各濃度のマイクロビーズの調製に必要な V₁ と V₂ の量を表 2 に示す。

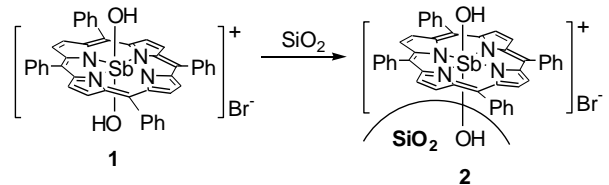


図 1. SiO₂ に **1** を吸着させたマイクロビーズ(**2**)

表 1. SiO₂ の特性

	b _{av} ^{a)} (μm)	P ^{b)} (cm ³ g ⁻¹)	ρ ^{c)} (g cm ⁻³)	表面積 ^{d)} (m ² g ⁻¹)
SiO ₂ -a	54	1.17	0.616	300
SiO ₂ -b	150	1.19	0.608	285

a) 平均粒径 (b_{av}). b) 細孔容積 (P). c) 式 1 により算出された粒子比重 (ρ). d) 表面積.

次に、エバポレーターでナスフラスコからメタノールを留去し、次に冷却管を付けて 18 時間還流した。還流後、室温まで冷却し、マイクロビーズをろ別し、アセトン (5 cm³) で洗浄して、ろ液と洗浄液を回収した。回収したろ液および洗浄液をエバポレーターで濃縮してメスフラスコ (10 cm³) に移し、メタノールでメスアップして溶液 III とした。溶液 III の吸光度(A)を 417 nm

で測定し、SiO₂に吸着されなかった**1**の重量(W₂/mg)をε₄₁₇およびMを用いて式3から求めた。

SiO₂に吸着した**1**の重量(W₃/mg)を(4)式によって算出し、マイクロビーズ中の**1**の重量百分率(C₁^w/wt%)およびモル濃度(C₁^m/M)をそれぞれ式5および式6によって求めた。調製したマイクロビーズはデシケーターに入れて真空乾燥させて、CLSM分析に用いた。表2に調製したマイクロビーズのC₁^wおよびC₁^mを示す。ここで、マイクロビーズは、用いたSiO₂-a (b_{av}=54 μm) およびSiO₂-b (b_{av}=150 μm) によって、それぞれ**2a** および **2b** と表し、括弧内の数値はW₁の値を示している。

$$W_1 = 12.5 V_1 / 250 \quad (\text{式 } 2)$$

$$W_2 = MA / (100 \epsilon_{417}) \quad (\text{式 } 3)$$

$$W_3 = W_1 - W_2 \quad (\text{式 } 4)$$

$$C_1^w = 100 W_3 / W_0 \quad (\text{式 } 5)$$

$$C_1^m = 1000 C_1^w \rho / (100M) \quad (\text{式 } 6)$$

2. 結果および考察

2.1 CLSMの測定範囲

CLSMは、一般的にレーザー光をガルバノミラーおよび対物レンズによって試料上を走査し、試料の表面および内部の焦点面から発した蛍光を対物レンズおよび共焦点に位置するピンホールを経て検出し、空間分布をコンピュータ処理によって画像に変換する顕微鏡である。特に、深さ方向の分解能がきわめて高く、高画質な画像解析を行うことができる。本研究に用いた

CLSMは、本体(Olympus FV-300)に分光器(STFL 250, Seki Technotron)をガラスファイバーでつなぎ、画像解析だけでなく蛍光および吸収スペクトルの測定を行うことができる。吸光度分析では顕微鏡の透過照明装置のハロゲンランプを光源として用い、試料を透過した透過光は、対物レンズで集光され、ピンホールおよびファイバーを通り、分光器および検出器(PMT)で検出される(図2)。吸光度分析における試料の測定領域は、対物レンズの倍率(x)およびピンホールの直径(h)またはファイバーコアの直径(f)によって決められる円形内となる。fを100 μm, hを300 μmに設定して測定を行った場合、dは2.14 μmと計算された。dは**2**の粒径(b)に比べて狭い範囲になっているので、光路長は測定領域内ではほぼ一定と見なされ、また、ビーズ外の領域からの漏光は完全に排除されている。

$$d = h / (3.5x) \quad (\text{式 } 7)$$

$$d = 3f / (3.5x) \quad (\text{式 } 8)$$

また、dを2.14 μmとした場合、**2**の粒径bが4.9 μm以上であれば、測定範囲での光路長の誤差は10%以内に抑制でき、光路長は測定領域内ではほぼ一定と見なすことができる。対物レンズの倍率を40倍に設定した場合、CLSMの画像で測定できるbの最大値は350 μmとなっている。したがって、本法で測定できる**2**のbの範囲は4.9~350 μmとなる。測定の波長範囲は、光源の波長領域および検出器のフィルターで決められ、本装置では488 nm以下はフィルターでカットされ、検出器の長波長側の限界は775 nmであるので、488~775 nmの領域が可視光吸光度分析の波長範囲となる。

表2. マイクロビーズの調製 (2).

2	SiO ₂ ^{a)}	V ₁ ^{b)} (cm ³)	V ₂ ^{c)} (cm ³)	W ₁ ^{d)} (mg)	W ₂ ^{e)} (mg)	2中の1の量		
						W ₃ (mg)	C ₁ ^{w(f)} (wt%)	C ₁ ^{m(g)} (mM)
2a (0.1)	SiO ₂ -a	2	13	0.102	0.002	0.100	0.100	0.73
2a (0.2)	SiO ₂ -a	4	11	0.203	0.005	0.198	0.198	1.44
2a (0.3)	SiO ₂ -a	6	9	0.305	0.007	0.298	0.298	2.16
2a (0.4)	SiO ₂ -a	8	7	0.406	0.014	0.392	0.392	2.85
2a (0.5)	SiO ₂ -a	10	5	0.508	0.014	0.494	0.494	3.59
2b (0.1)	SiO ₂ -b	2	13	0.100	0.002	0.098	0.098	0.70
2b (0.2)	SiO ₂ -b	4	11	0.200	0.003	0.197	0.197	1.41
2b (0.3)	SiO ₂ -b	6	9	0.300	0.005	0.295	0.295	2.11
2b (0.4)	SiO ₂ -b	8	7	0.399	0.006	0.393	0.393	2.82
2b (0.5)	SiO ₂ -b	10	5	0.499	0.009	0.490	0.490	3.52

a) SiO₂ 100 mgの重量(W₂). b) 溶液Iの体積 (cm³). c) 溶液IIの体積 (cm³). d) 式2から算出された**1**の量(mg). e) 式3から算出された溶液に関する**1**の量(mg). f) 式5から算出された重量%. g) 式6から算出された**1**のモル濃度.

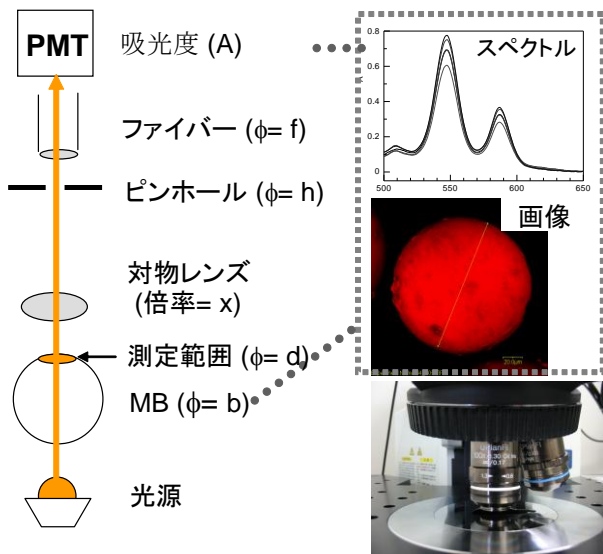


図2. CLSMによる吸光度分析

$$A = b\epsilon_{547}C_2 \quad (\text{式 9})$$

$$C_2 = A/(b\epsilon_{547}) \quad (\text{式 10})$$

2.2 CLSMによる顕微吸光度分析の方法

2の吸光度(A)は、溶液の吸光度分析の場合と同様に Lambert-Beer 則によって、光路長、 ϵ_{547} 、および**1**のモル濃度(C_2/M)の積で表すことができる。**1**をシリカゲルに担持させても、極大吸収波長がメタノール中のものとほとんど変わらないことから、シリカゲルの影響は小さいものと思われ、マイクロビーズでの**1**の ϵ_{547} はメタノール中の値を用いた。また、 A を**2**の中心線で測定した場合、光路長は**2**の粒径(b cm)と同じになることから、 A は式9で表され、さらに式9は C_2 を表す式10に変換できる。

顕微吸光度分析は次のように行った。CLSMのステ

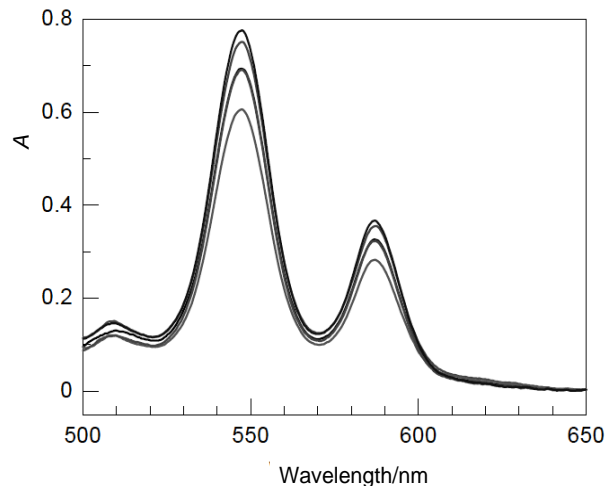


図3. **2b(0.2)**の吸収スペクトル。

ージに置いたスライドガラス上に数十個の**2**を置き、その上にカバーガラスを乗せて固定した。同時に、スライドガラス上に**1**を固定化していない同じ粒径の SiO_2 数個を置き、吸光度分析のブランクとして用いた。無作為に5個の**2**を選んで、ステージを移動させて顕微鏡の視野の中心に**2**の中心線が来るようにした。吸収スペクトルを500~650 nmの範囲で測定し、**2**の極大吸収波長の547 nmにおける A を測定した。例として**2b(0.2)**の吸収スペクトルを図3に示す。

2.3 顕微吸光度分析の分析範囲と精度

分析範囲を検討するために、**2a-b**の顕微吸光度分析によって求めた A の値を C_1^m に対してプロットを行った(図4)。 b に分布があるために各 C_1^m における A の値にはバラツキが見られるが、**2a**の場合、 A は全体的に C_1^m に対して良好な直線関係を示している。一方、**2b**では C_1^m が3.5 mMの点において A が頭打ちになっている。これらのことから、顕微吸光度分析は、

表3. マイクロビーズ(**2**)のCLSM-分析

2	C_1^m ^{a)} (mM)	A ^{b)}	b ^{c)} (μm)	A/b (cm^{-1})	C_2 ^{d)} (mM)	C_2^{av} ^{e)} (mM)	(STD) ^{f)}
2b(0.2)	1.41	0.380	149.8	25.4	1.19	1.34	(0.11)
		0.428	163.1	26.2	1.23		
		0.484	167.7	28.9	1.35		
		0.507	159.4	31.8	1.49		
		0.509	167.1	30.5	1.42		

a) 調製した**2**中の**1**の濃度(C_1^m) 吸光度(A)はCLSMにおいて551 nmで分析した b) CLSMで分析したビーズの直径(b) c) 式10にしたがってCLSMによって求めた**1**の濃度(C_2). d) 平均の C_2 値(C_2^{av}). e) 標準偏差 (STD)= $[(n\sum C_2^2 - (\sum C_2)^2)/n(n-1)]^{1/2}$; $n=5$.

A が C_1^m に対して比例関係にある約0.8以下で行うことが求められる。**2a-b**の顕微吸光度分析から求めたモル

濃度(C_2)、5つの C_2 を平均した平均モル濃度(C_2^{av})、および標準偏差(STD)を表3に示す。次に、 C_2^{av} と C_1^m の

同等性を検証するために、 C_2^{av} を C_1^m に対してプロットを行った(図5)。**2a**の場合、相関係数(r^2)0.991で良好な直線関係が得られ、その傾きが0.979であった。**2b**の場合は、直線からずれた**2b(0.5)**の点を除いた4点の直線の傾きは0.936($r^2=0.990$)であった。これらのことから C_2^{av} は C_1^m にほぼ等しいことを示しており、標準偏差0.11-0.73の精度で**2**中の**1**の定量分析ができることを示している。

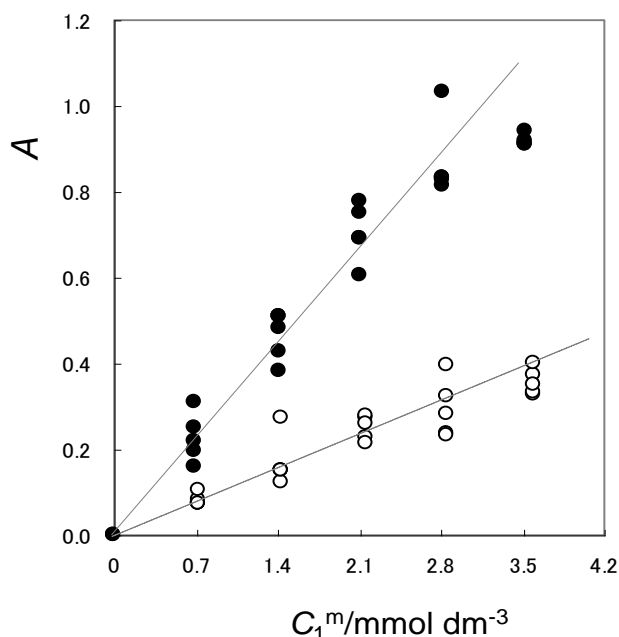


図4. Aの C_1^m に対する依存性：**2a**(○) and **2b**(●)。

表4に示す顕微吸光度分析の分析条件および適応範囲から、CLSMを用いた顕微吸光度分析は数十から数百ミクロン程度までの光透過性の微小材料中の成分濃度を定量するために有効な方法であることを示している。マイクロビーズは有機合成における触媒、吸着剤、固相合成のための担体、バイオセンサーなどに活用されており⁷⁾、本法は、この分野の研究への貢献が期待される。

3. 結言

共焦点レーザー走査型顕微鏡(CLSM)を用いた顕微吸光度分析の精度および適応範囲などを検証するために、粒径が50および150 μm の二種類の球状シリカゲルにジヒドロオキソ(テトラフェニルポルフィリナト)アンチモン臭化物錯体(**1**)を0.70- 3.59 mMのモル濃度(C_1^m)で吸着させてマイクロビーズ(**2**)を調製した。CLSMでの試料の測定領域は、対物レンズの倍率およびピンホールの直径またはファイバーコアの直径によって決められる直径が2.14 μm の円形内であることがわかった。さらに分析範囲、測定範囲などの分析条件

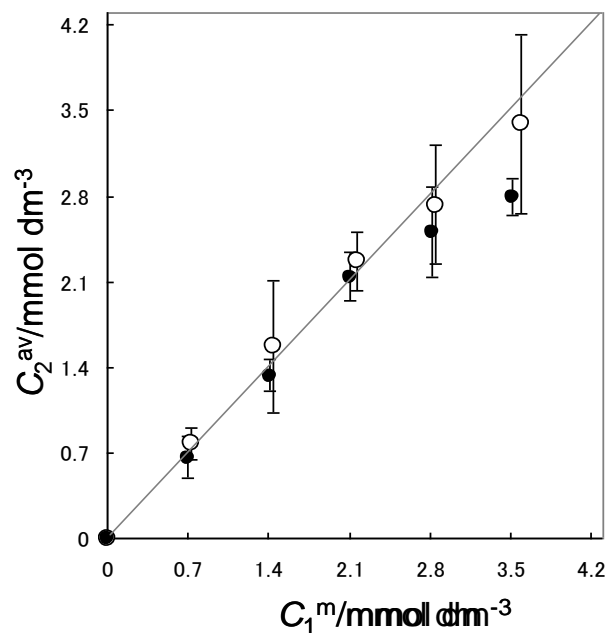


図5. C_2^{av} の C_1^m に対する相関関係：**2a**(○)と**2b**(●)：**2a**での傾き=0.979($r^2=0.991$)、**2b**での傾き=0.936($r^2=0.990$)。次の直線関係が得られた： $C_2^{av} = C_1^m$ 。

表4. 微小領域のCLSM吸光度分析^{a)}

測定波長範囲	488~775 nm
ビーズ直径の測定範囲 (b)	4.9 ~352 μm
測定範囲(d)	2.14 μm
最大吸光度 (A)	0.8
精度 ^{b)}	0.11-0.73

a) 測定条件：対物レンズ倍率(x): 40, ガラスファイバーコアの直径 (f): 100 μm , ピンホールの直径 (h): 300 μm , 光源: ハロゲンランプ。

b) 図5から算出.した標準偏差(STD)

を検討した結果、4.9~350 μm の球状試料について測定波長が488~775 nmで分析可能であることが分かった。そこで、CLSMに付属する透過照明装置を利用して可視光吸光度分析を行い分析精度について検討を行った。その結果、吸光度(A)から求めた**2**中の**1**のモル濃度(C_2^{av})は C_1^m と標準偏差0.11-0.73で良い一致を示した。しかし、Aが0.8以上のサンプルでは、直線からのずれが確認され、Aの測定範囲は0.8以下であることが分かった。以上の様に、CLSMを用いる顕微吸光度分析は、ミクロンオーダーの光透過性の微小材料中の成分濃度を定量するために有効な方法であることが分かった。

4. 今後の展開

今回色素として用いたポルフィリン誘導体は、生体親和性色素として多用され、光線力学療法(PDT)薬剤へ

の応用の観点から、高い生体親和性のある水溶性ポルフィリンの開発に関心が集められている⁸⁾。生体親和性の評価のためには、細胞内の水溶性ポルフィリン色素量を正確に求めることが重要であるが、生きた菌体内の色素の分析方法についての報告が少ない。そこで、現在、開発した CLSM 吸光度分析法を応用して、生体親和性色素の菌体への吸着量の定量的検討を開始している。

参考文献

- 1) E. Pere, H. Cardy, O. Cairon, M. Simon, S. Lacombe: *Vibrational Spectroscopy*, **25**, 163–175 (2001).
- 2) H. Yamasaki, S. Hirayama, M. Okamoto: *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **51** 237–244 (1990).
- 3) J. Matsumoto, T. Fuchikawa, Y. Komiya, Y. Fueda, T. Matsumoto, T. Shiragami, M. Yasuda: *Chem. Lett.*, **34**, 1484-1485 (2005).
- 4) J. Matsumoto, T. Matsumoto, Y. Senda, T. Shiragami, M. Yasuda: *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **197**, 101-109 (2008).
- 5) 松本朋子, 白木隆一, 松本 仁, 白上 努, 保田昌秀, *分析化学*, **57**, 819-824 (2008)
- 6) Y. Andou, T. Shiragami, K. Shima, M. Yasuda: *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **147**, 191-197 (2002).
- 7) F. Z. Dorwald: “Organic Synthesis on Solid Phase: Supports, Linkers, Reactions”, second ed., (Wiley-VCH), Weinheim, New York, 2002.
- 8) 松本朋子, 中原卓郎, 松本仁, 白上努, 保田昌秀, *分析化学*, **58**, 357-361 (2009)