

令和元年6月19日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H03883

研究課題名(和文) ファインバブル解析のための電子線励起発光顕微鏡の開発とその応用展開

研究課題名(英文) Electron beam excitation assisted microscopy for fine bubble observation

研究代表者

川田 善正 (Kawata, Yoshimasa)

静岡大学・電子工学研究所・教授

研究者番号：70221900

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、液中におけるマイクロ-ナノスケールのファインバブルを高分解能かつ高速に観察可能な電子線励起発光顕微鏡を開発するとともに、コロイド粒子や生体試料など液中のソフトマテリアルを解析する手法を確立することを目的として研究を実施した。マイクロ-ナノスケールのバブルは、その体積に比して表面積が大きく表面電位が高いため、界面での反応活性が高く、液中に長期間存在するとして、新しい応用展開が期待されている。本研究では、集束電子線を液中のバブルに直接照射しプラズマ発光させ、光学顕微鏡の限界を超えた超解像を実現した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、液中におけるマイクロ-ナノスケールのファインバブルを高分解能かつ高感度に観察する電子線励起発光顕微鏡を開発し、さまざまな応用分野へ展開することを目的として、基礎解析およびシステム開発を行ってきた。開発した電子線励起超解像顕微鏡を用いて、水中に浮遊するファインバブルおよび内部にアルゴンガスを含むファインバブルの観察を行った。電子線の照射により、バブルの表面電荷を制御し、その反応活性を制御することについて検討した。本研究の成果は、これまでは観察が困難であった液中のソフトマテリアルを高分解能で観察する手法として多くの分野への応用展開が期待できる。

研究成果の概要(英文)：We have developed electron beam excitation assisted microscope for observation of fine bubbles. Fine bubbles are expected to open new applications such as analyses of colloidal solution, bio-materials, soft materials, because they have larger surface area and larger charge on the surfaces. We excited plasma emission by irradiating focused electron beam directly to bubbles, and imaged the bubbles with high resolution. The higher resolution than the optical microscope was demonstrated.

研究分野：応用物理学、応用光学

キーワード：ファインバブル 光学顕微鏡 電子顕微鏡 超解像 流体解析

# 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

マイクロナノスケールのバブルは、その体積に比して表面積が大きく表面電位が高いため、界面での反応活性が高く、洗浄効果や潤滑効果、物性制御、帯電分離、長期間安定性などさまざまな特性を有し、食品、飲料水、化粧品、医療、薬品、造影剤、燃料電池、化学反応、農業、除染、水処理など多方面への応用展開が期待されている。

とくにナノスケールのファインバブルでは、その形状を維持するために極端に内部圧力が高いことが必要であり、また表面の電荷密度も非常に大きくなることが予想される。そのため、内部に気体が存在する構造として液中にバブルが存在するかどうかも含めて疑問視されており、未解明の部分が多い。ファインバブルの挙動はより大きいサイズの通常のバブルの状態とは大きく異なることが予想され、構造および形成メカニズムが明確になっているわけではない。

また、溶液中での微結晶の成長過程の解明、溶液からの不純物粒子除去のためフィルタリング機構の解明、基板の洗浄過程のメカニズム解析、生体細胞の機能解明など、液中でのコロイド粒子や生体試料などソフトマテリアルのナノスケールの微細構造を高分解能で観察したいとの要求も高まっている。液体中でのソフトマテリアルの微細構造の動態を直接観察することが可能になれば、これまで未解明であった液中でのナノ粒子同士の相互作用およびナノ領域における固液界面での相互作用などを明らかにすることが可能となり、多くの新分野への展開が期待できる。

液体中での微細構造を高分解能で観察する手法としては、光学顕微鏡が広く用いられている。光学顕微鏡は液中のソフトマテリアルの微細構造を非侵襲・非接触で液中の試料を観察することができ、電子顕微鏡(SEM)や原子間力顕微鏡(AFM)などに比べて液中物体の観察において大きな優位性を有する。その一方で、光学顕微鏡は光の回折限界による分解能の制限をもつため、サブミクロン程度の構造までしか観察できない。つまり、ファインバブルの挙動や液中のナノ粒子の挙動を直接観察することはできない。

## 2. 研究の目的

本研究では、液中のマイクロナノスケールのファインバブルを超高分解能で観察する超解像顕微鏡を開発し、液中のナノ粒子や生体試料の挙動解析に応用するとともに、液中のソフトマテリアル解析における新しい計測手法およびその解析理論を構築することを目的とする。液中のナノスケールの微細構造の結像特性を明らかにし、さまざまな応用研究に展開するための基礎を確立する。

開発する電子線励起発光顕微鏡では、真空と大気圧を分離可能な薄膜に集束した電子線を照射し、薄膜を通過させて液体中のファインバブルに直接電子線を照射し、試料からの発光を励起する。試料からの蛍光やプラズマ発光を光学顕微鏡で検出して、強度を測定する。試料の観察像を取得するために電子線を走査し、二次元観察像を得る。

本顕微鏡では、電子線を集束させて液中の試料に直接照射するため、ナノスケールの分解能を実現することが可能である。電子線は、光などに比べて集束性がよくナノスケールの領域に集束できるからである。液中に照射された電子線は拡散により広がるものの、加速電圧を制御すれば基板表面から1ミクロン程度の深さまで数10 nm以下の集束スポットを形成可能である。

本研究では、ファインバブルに電子線を直接照射し、バブルからのプラズマ発光を励起する。したがって、検出光を分光することにより、バブル内に気体が存在するか、どのような物質で構成されているか、内部圧力の大きさなど、バブルの大きさだけでなく内部構造や内部状態を解析でき、その特性を明らかにすることができるものと考えられる。さらにファインバブルへの電子線の照射量を変化させて表面電荷を制御し、その反応性を制御することを目指す。医療分野では、バブルを用いたがん治療などの研究が報告されている。がん細胞の周囲にバブルを局在させ、外部からの刺激で消滅させることにより、がん細胞に損傷を与え治療を行なう。これらの応用研究に向けて、電子線によるファインバブルの破壊についても検討する。電子線によるバブルの破壊、それによる細胞ダメージについても検討し、その電子線の加速電圧、照射量、集束スポットの大きさに対する特性を明らかにする。

## 3. 研究の方法

本研究では以下の研究項目を実施した。

- (1) 結像特性評価のための数値解析手法の開発
- (2) 電子線励起発光顕微鏡の基礎システムの開発
- (3) システムの改良と基板表面のファインバブルの計測
- (4) 液中に浮遊したファインバブルの計測

## 4. 研究成果

- (1) 結像特性評価のための数値解析手法の開発

本研究で開発する超解像顕微鏡の分解能を評価するための数値解析手法を開発した。電子線散乱をモンテカルロ・シミュレーション、励起された発光の伝搬を有限差分時間領域法（FDTD法）で解析し、気液遷移領域近傍での熱・物質輸送を解析可能な数値解析手法に組み込んだ新しい解析法を開発した。真空と大気圧の分離膜および液中の試料内部における電子線の散乱および透過特性を評価し、顕微鏡システムの分解能、結像特性を明らかにする。

これらの解析結果から、真空と大気圧の分離膜の材料、膜厚、加速電圧などによる電子線の散乱特性を解析し、集束スポットの拡がりなどを理論的に明らかにし、最適な照射条件を求め、実効的な分解能を評価する。また、電子線照射による発光強度の大きさおよび検出光強度を求め、高い信号対雑音比を実現するための光検出器の感度、対物レンズの開口数などを最適化した。

## (2) 電子線励起発光顕微鏡の基礎システムの開発

液中のファインバブルを観察可能な電子線励起超解像顕微鏡を開発した。これには、現有の走査型電子顕微鏡(SEM)を改良することにより実現した。加速電圧 10 kV で 3 nm の集束スポットを持ち、100 frame/s で電子線を走査可能な基礎システムを開発した。さまざまな液中試料の観察に対応するために、倒立型（電子線が下方から上方に向かって照射される形態）の構成とし、開放空間へ電子を照射可能なシステムとした。

研究項目 (1) で求めた数値解析の結果から電子線照射による蛍光の発光やプラズマ発光強度を検出する光学顕微鏡システムを設計し、試作した。まず、蛍光性微粒子などの標準試料や蛍光マーカー、トレーサーを用いて試作システムの空間分解能、時間分解能、結像特性などを評価した。真空と大気圧分離する膜を通して、液中の蛍光性ナノ粒子に電子線を照射し、その発光強度を検出した。電子線を走査することによりナノ粒子の観察像を求め、開発した超解像顕微鏡の分解能を評価した。

さらにレーザー走査顕微鏡と組み合わせて、電子線励起超解像画像とレーザー励起画像を同時に取得可能な顕微鏡システムの設計・試作を行なった。レーザー顕微鏡と融合することにより、光励起による観察像と電子線励起による観察像を同時に取得することを可能とした。

## (3) システムの改良と基板表面のファインバブルの計測

開発した電子線励起超解像顕微鏡を用いて、基板表面に付着した液中のマイクロナノスケールのファインバブルを直接観察し、その挙動および基礎特性を観察した。まず基板表面に付着したファインバブルの観察を行ない、その分解能を評価するとともに、バブルを観察した場合の結像特性を明らかにした。

また、バブルの観察結果から観察システムの問題点を明らかにし、バブル観察に適したシステムを実現するための改良を行なった。電子線照射によるバブルの挙動変化、表面電位の変化、バブル間の相互作用などを観察し、電子線の加速電圧、照射電流量、集束位置などの実験条件を最適化するとともに、システム設計にフィードバックし、システムを改良した。

## (4) 液中に浮遊したファインバブルの計測

液中に浮遊して存在するファインバブルの挙動観察を行なった。浮遊したファインバブルの観察結果と基板表面のファインバブルの観察結果を詳細に比較・検討し、基板表面上のバブルとの相違点を明らかにした。また、内部にアルゴンガスを含むファインバブルの観察を行った。アルゴンガスのプラズマ発光波長を検出することにより、内部にアルゴンガスが存在することが確認できた。電子線の照射により、バブルの表面電荷を制御し、その反応活性を制御することについて検討した。本研究の成果は、これまでは観察が困難であった液中のソフトマテリアルを高分解能で観察する手法として多くの分野への応用展開が期待できる。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 10 件）

Mykyta Kolchiba, Wataru Inami, Yoshimasa Kawata, Highly Luminescent YAlO<sub>3</sub>:Gd<sup>3+</sup> Thin Films as a Nanoscale Optical Source for Super-Resolution Bioimaging, Optical Materials Express, 査読有, 9 巻, 2019, 1803-1814, DOI:<https://doi.org/10.1364/OME.9.001803>

Seo Min-Woong, Shirakawa Yuya, Kawata Yoshimasa, Kagawa Keiichiro, Yasutomi Keita, Kawahito Shoji, A Time-Resolved Four-Tap Lock-In Pixel CMOS Image Sensor for Real-Time Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy, IEEE Journal of Solid-State Circuits, 査読有, 53 巻, 2018, 2319-2330, DOI:10.1109/JSSC.2018.2827918

Ibrahim Khaleelullah Mohamed Mathar Sahib, Tanaka Asahi, Dheivasigamani Thangaraju, Sugimoto Kyohai, Shimura Yosuke, Inami Wataru, Kawata Yoshimasa, Hayakawa Yasuhiro, Photothermally Active Upconversion Core-Shell NaGdF<sub>4</sub>:Yb:Tm@Cu Nanostructures: Synthesis

and Theranostic Properties, Particle & Particle Systems Characterization, 査読有, 35 巻, 2018, 1800227-1800227, DOI:https://doi.org/10.1002/ppsc.201800227

Hanulia Taras, Inami Wataru, Ono Atsushi, Kawata Yoshimasa, Fluorescence lifetime measurement excited with ultraviolet surface plasmon resonance, Optics Communications, 査読有, 427 巻, 2018, 266-270, DOI:10.1016/j.optcom.2018.06.069

他 6 件

〔学会発表〕（計 23 件）

Wataru Inami, Kiyohisa Nii, Satoru Shibano, Yoshimasa Kawata, Electron Beam Addressable Potentiometric Sensor for Ion Distribution Imaging with High Resolution, The 4th Biomedical Imaging and Sensing (Bisc2018), 2018

Wataru Inami, Kiyohisa Nii, Satoru Shibano, Hikaru Tomita, Yoshimasa Kawata, Yuji Miyahara, High Spatial Resolution Ion Imaging with Potentiometric Sensor Using an Electron Beam, The 4th International Conference on Nano Electronics Research Education 2018, 2018

他 21 件

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://optsci.eng.shizuoka.ac.jp/>

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：居波 涉

ローマ字氏名：(INAMI, wataru)

所属研究機関名：静岡大学

部局名：電子工学研究所

職名：教授

研究者番号（8 桁）：30542815

研究分担者氏名：真田 俊之

ローマ字氏名：(SANADA, toshiyuki)

所属研究機関名：静岡大学

部局名：電子工学研究所

職名：准教授

研究者番号（8 桁）：50403978

### (2)研究協力者 なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。