

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：83906

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K15404

研究課題名（和文）グラフェンサンドイッチ構造を用いた科学反応の直視解析法の開発

研究課題名（英文）Development of the direct observation method with graphene sandwich for scientific inquiry

研究代表者

佐々木 祐生（Sasaki, Yuki）

一般財団法人ファインセラミックスセンター・その他部局等・上級研究員

研究者番号：80808668

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではグラフェンサンドイッチ技術を異なる試料の接触挙動の初期過程観察へと発展させることを目的とした。グラフェンサンドイッチとは原子層物質であるグラフェン層間に試料を挟むことで従来電子線による観察が困難な湿潤試料などの電子顕微鏡観察を可能とする手法である。グラフェンサンドイッチ構造を作る上で必要な要素技術として、グラフェンと六方晶窒化ホウ素およびその複合膜（BCN）の化学気相成長法（CVD法）による新規合成法の開発、グラフェン等を積層させるためのポリマーフリーな新規転写法の開発、透過型電子顕微鏡によるグラフェンサンドイッチの観察、BCN膜の電子線照射による開孔に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発したグラフェンCVD合成法では、従来銅基板の両面に生成されていたグラフェンを片面のみに選択的に合成し、比較的短時間で強固な界面構造を有する単層膜を合成可能である。このようなグラフェンは本研究目的のグラフェンサンドイッチへの用途以外にも、電子デバイス応用や強固な保護膜として応用が期待できる。また、同様の手法によってBCN膜の合成とポリマーフリーな転写に成功しており、今後原子層物質の異種界面構造やその性質を理解するための基盤技術として期待できる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to develop the graphene-sandwich technique to the initial process observation of the contact behavior of different samples. Graphene-sandwich is a technique that enables electron microscopic observation of wet specimens, which are difficult to observe with conventional electron beams, by sandwiching the specimen between graphene layers, which are atomic layer materials. As the elemental technologies necessary to create graphene sandwich structures, we are developing new synthesis methods for graphene, hexagonal boron nitride, and their composite films (BCN) by chemical vapor deposition (CVD), and for laminating graphene, etc. We developed a new transfer method, observed graphene sandwiches with a transmission electron microscope, and successfully opened pores in BCN films by electron beam irradiation.

研究分野：ナノ界面構造

キーワード：グラフェン CVD 転写 グラフェンサンドイッチ 電子顕微鏡観察

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は水や溶液を利用した液相反応を多く利用しており、それをリアルタイムかつ原子分解能で観察する技術がもたらすインパクトは極めて大きい。液相反応を利用する科学分野の一例としては、有機合成技術による創薬、生命化学、触媒化学、電池などが挙げられ、今後の人類の発展に欠かせない重要な課題と液相反応には深い関わりがある。液相反応を可視化し、どのようにして薬分子がターゲットに作用していくのかを理解することで、効率よく作用する薬を合成することができ、また触媒反応の直接的な解析によって、これまでに無い構造や作用をもつ触媒を生成することも可能になる。本研究では、液中または固液界面で行われる化学反応を「原子レベルの空間分解能」で「リアルタイムに」観察する技術を独自に着想した。

2. 研究の目的

液中の化学反応を可視化するためには、観察対象が溶液に溶けたままの状態でもリアルタイムかつ高分解能で観察する技術が必要である。現在、水溶液中の微粒子などを観察する手法として環境型透過電子顕微鏡 (Environmental TEM) が使用されているが、既存の方法では水溶液をパックして真空中に持ち込むための隔膜や水溶液が厚く (一般には数百～数千 nm) 観察したい試料本体の情報 (数～数十 nm) がそれらに埋もれてしまう。二つの異なる水溶液を意図したタイミングで混合することが出来ない。などの問題点が存在する。そこで本研究では、これらの問題点を解決し、『直接反応を可視化できる新たな観察手法を開発すること』を目的とした。本研究によってこれまでの TEM 観察法では不可能だった多くの液中現象の可視化が可能となれば、広範な応用をもつインパクトの高い新技術となり得る。

3. 研究の方法

上述の問題を解決するため、申請者は、原子層物質で機械的・化学的安定性に優れたグラフェンの隔膜としての応用に着目してきた。グラフェンを 2 枚重ねてその間に水溶液などを挟み TEM 観察を行う“グラフェンサンドイッチ観察”は、申請者がタンパク質の液中観察のために開発を行ってきた独自の技術である。これまでに、従来法で観察が困難とされる微小なタンパク質の液中・高分解能観察に成功しており、問題点を解決すると共に、グラフェンサンドイッチの有用性を実証してきた。しかし、問題点については、視野内で二種類の水溶液を混合し、反応を任意に開始できる手法はなく、全く新しい観察法の開発が必要であった。

問題の解決を図るため、本研究ではグラフェンサンドイッチの利点をそのままに、二種類の水溶液を任意のタイミングで混合し反応を開始できる液中反応観察法を提案する。本手法のポイントは、六方晶窒化ホウ素 (h-BN) を用いることである。h-BN はグラフェンとほとんど同じ構造をもつ窒素とホウ素からなる原子層物質であり、グラフェンと同様に高い化学的、熱的安定性と機械的強度を持つ物質である。一方で、グラフェンとは異なる性質として、単層 h-BN が電子線照射によって容易に破壊され穴を生じる。この性質を利用すれば、h-BN を隔壁として反応させたい溶液を 2 つに分けておくことで、反応を開始したい時に h-BN に電子線を集束して穴を開けることで、任意のタイミングで溶液を混合し反応を開始することが可能になると考えた。

本研究では Atomic Layer Diaphragm Reactor (ALDR) 「原子層隔膜反応器」と名付けた、グラフェンと h-BN が交互に積層した構造の作成手法の確立と、電子線照射による隔膜の開孔とそれによる化学反応の観察を行う。

4. 研究成果

4-1. グラフェンの CVD 合成条件検討

まず ALDR の作成手法の確立のため、大面積かつ高結晶性グラフェンの安定的な化学気相成長法 (CVD 法) による合成条件の検討を行った。グラフェン CVD 合成では銅箔を触媒とすることで高品質な単層グラフェンの合成が可能であり、この時のグラフェンの結晶方位は銅箔表面の結晶面に強く依存することが知られている。これまでの自身の研究で水素雰囲気による反応前加熱が単結晶的な銅箔表面を構築できることが分かっていたが、グラフェン粒子同士の強固な界面形成には比較的長い反応時間を要していた。反応時間が長くなるにつれて、余剰な核形成や核成長が起きることで核周辺に局所的な多層化が見られ、また反応チャンバーである石英管からのコンタミが深刻な問題になっていた。そこで今回、九州大学吾郷教授らによって報告された二

ッケルと銅を重ねる手法を取り入れ、銅箔の上にニッケル箔を乗せることで、ニッケルによる余剰炭素の吸収を狙った。その結果、高い結晶性を保ちながらも均一な単層グラフェンの合成に成功した。また銅箔の表面にはグラフェンが生成せず、裏面に生成することになるため、石英管からのコンタミが減少した。

図1に本手法によって合成したグラフェンのSEM像と、200度大気下で表面を酸化させたグラフェン被覆銅箔の写真を示した。水素雰囲気加熱の条件は、アルゴン/水素(3%)100 sccmと純水素400 sccm下で1055度、60分間行い、アルゴン/水素(3%)200 sccmとアルゴン/水素(3%)/メタン(0.01%)300 sccm下で1055度、100分間反応させた。SEM像ではグラフェンが黒いコントラスト、銅箔は白いコントラストで観察される。均一にグラフェンで被覆されている領域では明瞭な像が得られないため、下流側の被覆率が低い範囲からSEM像を取得した。グラフェン粒子はどれも同じ方位を向いた六角形状に成長していることから、視野内の銅箔表面がすべて単一の結晶方位を有しており、グラフェン粒子もそれを反映して同一の結晶方位に成長したことが示唆された。図1の写真ではグラフェンが被覆していない銅箔表面露出部分だけが酸化してオレンジ~赤色を呈しており、グラフェンが被覆している領域では銅の酸化が進行せずピンク色を呈している。ニッケル箔が乗っていた銅箔表面が酸化しており、裏面は酸化していないことが確認できる。

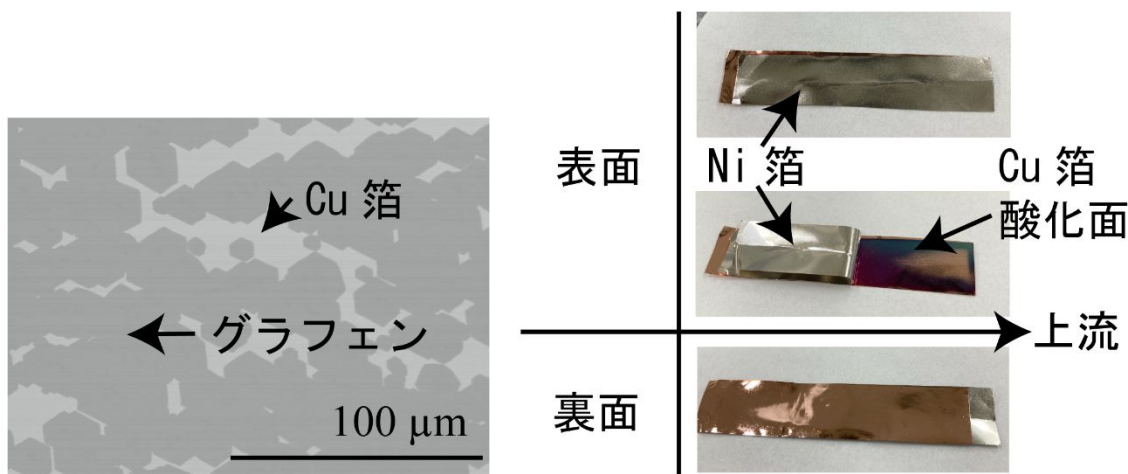


図1：CVD グラフェンのSEM像と表面酸化した写真

4-2. ポリマーなどの保護膜を用いないグラフェン等の転写法の検討

ALDRの原子層膜サンドイッチ構造を作成するためには、銅箔上にCVD法によって合成されたグラフェンなどを銅箔上から別基板に転写する必要がある。今回のような銅基板の場合は硝酸鉄水溶液などを用いて酸化溶解によって除去する。この際、グラフェンなどの層状物質の転写には保護膜としてポリマーによるコーティングを行う。保護膜は層状物質のドメインが銅基板を失った際にバラバラに分散してしまうのを防ぎつつ、その後の取り回しや視認性を改善する意味合いで用いられる。保護膜でコーティングした銅箔をエッチング溶液上に浮かべて数時間整地することで保護膜付きの原子層物質が銅箔から離れて水溶液上に浮遊する。これを別基板で掬い上げ乾燥させ、有機溶媒などに浸漬して保護膜を除去することで転写が完了する。しかしながら、この転写方法はサンドイッチ構造によってさまざまな試料を包摂することを目的とする本研究の転写には不向きである。そのため、本研究では上記4-1で作成したような高結晶性かつドメイン同士が良く接着したグラフェンを合成することでポリマーなどを用いない転写を行った。銅基板を失った後にグラフェン膜がバラバラに分散するのは、グラフェン粒子同士の接着が不十分な場合であることが予想され、実際に上記手法で作成したグラフェンは銅箔を除去した後もその形状を保ち、分散しないことが確認できた。

また、これまでのCVD合成ではグラフェンは銅箔の両面に生成するため、転写前に銅箔裏面のグラフェンを除去する処理を行っていた。除去しない場合、裏面に生成したグラフェンがエッチング溶液と銅箔の接触を妨げるほか、裏面のグラフェンが表面のグラフェンに付着することがあったため、グラフェンが大面積かつ粒子界面構造が強固になるほど顕著に見られた。これに対して、4-1で開発した手法では片面のみにグラフェンが生成するため、その除去操作も不要となった。これは操作が一つ減っただけではなく、除去しきれずにグラフェンが残る、エッチング液や銅箔片が残ったグラフェンに挟まれるといった問題が起きにくくなることで、積層構造の作成などに使用可能なグラフェン収率が向上した。図2に転写したグラフェンのRaman分光測定結果を示す。不規則構造や欠損由来ピークを示す 1400 cm^{-1} 付近のDバンドがわずかに認められるが、広範囲において均一な単層グラフェンがシリコン基板上に転写出来ていることが分かる。

以上の結果より、水素雰囲気加熱とニッケル箔を組み合わせることで、短時間で強固な粒子界面結合を有する大面積グラフェンの片面選択的な合成に成功した。

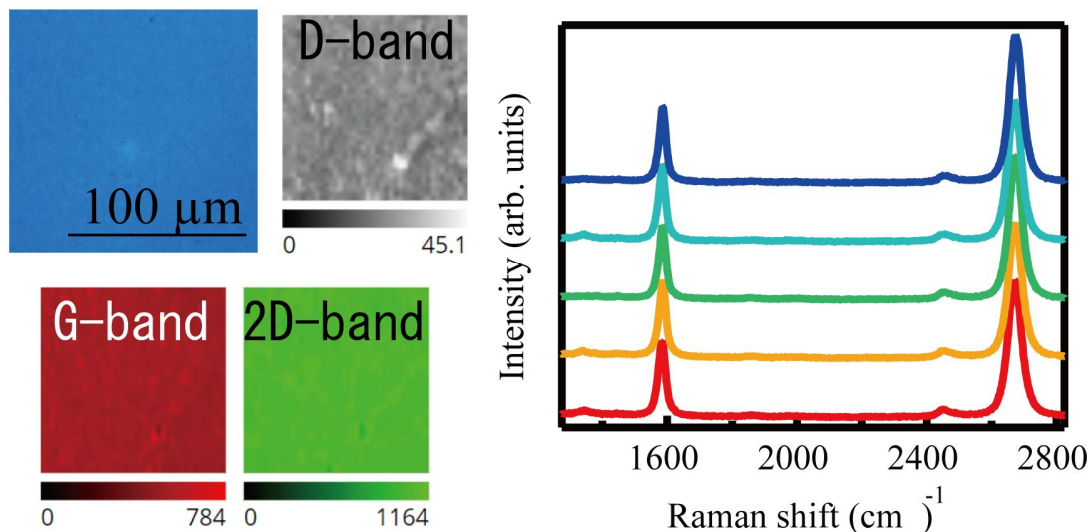


図 2 : 転写したグラフェンの Raman 分光測定

4-3. h-BN および BCN 膜の CVD 合成および電子線照射による開孔条件の検討

h-BN の合成にはアンモニアボラン粉末を用い、グラフェンと同様に銅箔上に成長させた。しかしながら、これまでの検討によって、h-BN のドメイン同士の接着が難しく、4-2 のポリマーなしの転写がうまく再現しないことが分かった。そこで、h-BN のドメインをグラフェンで接着した BCN 膜を合成し、これを h-BN の役目である電子線で開孔する隔膜の代用とした。まず、CVD 法によってニッケル箔を乗せた銅箔表面にアンモニアボラン粉末を原料として h-BN を合成し、アンモニアボランを電気炉から取り出した後アルゴン/水素/メタンガスを加えることでグラフェンを連続合成した。これによって銅箔上に生成した h-BN ドメインをパッチワークのようにグラフェンが補修した BCN 膜を得た (図 3 左)。基板である銅箔はニッケル箔から取り外した後、ニッケル箔の面を下にして硝酸鉄水溶液上に浮かべることで溶解し、その際 BCN 膜が溶液上に浮遊している様子が目視にて認められた。その後透過型電子顕微鏡 (TEM) 用グリッドに BCN を転写し、大気下 285 °C で加熱した電気炉に 30 分間 (急熱、急冷) 置いたものを TEM 観察した。

BCN の TEM 観察には H-9500 (日立ハイテク) を用い、加速電圧 300kV で観察および開孔操作を行った。本観察条件においてグラフェンはロックオンダメージが見られるため高分解能観察に用いられることはないが、低倍率の観察 (視野探し) には耐えること、ダメージの蓄積 = 開孔には有利であることから、本研究では開孔作業に限りこの条件で観察を行った。観察の結果、BCN 膜は広い範囲でほとんど損傷なく TEM グリッド上の支持膜を架橋している様子が確認された。また、転写による膜の破れがない BCN 膜に対して直径 10 nm 程度に収束した電子線照射を 30 秒間行ったところ、照射領域において開孔が認められた (図 3 右)。

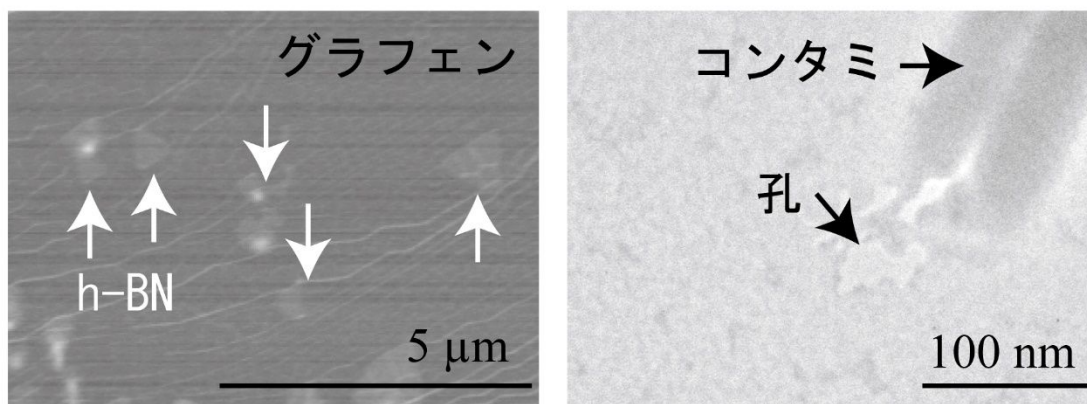


図 3 : BCN の SEM 像および電子線照射による開孔後の TEM 像

4-4. ALDR 作成と開孔による混合の確認

この BCN に 0.05 M 塩酸をスプレー噴霧し、グラフェン付きの TEM グリッドに対して転写して

1層目のサンドイッチ構造を作成した(試料A)。さらにもう一枚のグラフェンに0.05 M水酸化ナトリウム水溶液をスプレー噴霧し、試料Aに対して転写することで2層のサンドイッチ構造を有するALDR(試料B)を作成した。この時理想的には試料Bは2枚のグラフェン層間に塩酸と水酸化ナトリウムがBCN隔膜を隔てて接している構造を有する。先の条件で試料BのTEM観察と電子線照射による隔膜の開孔を行ったところ、層間に液だまりが形成され真空中で蒸発しない様子が確認でき、溶液の包摂に成功していることが分かった。また、液だまりやそれによる膜同士の「しわ」の重なりから異なる2つの層間にそれぞれ液だまりが形成されていることが分かった。続いて隔膜を開孔するため、電子線を収束した。その結果、照射領域に大量のコンタミネーションが認められ、サンドイッチ内部の情報が埋もれてしまったため、開孔の確認には至らなかった。真空加熱や大気加熱によるコンタミネーションの低減を試みたが、十分な効果が確認できなかった。

今回、電子顕微鏡による化学反応の開始の瞬間を捉えるには至らなかったものの、BCNの採用によるALDRの作成や電子線によるBCNの開孔は確認できた。今後さらなる検討によって電子顕微鏡による化学反応の開始の瞬間を捉えることも十分期待できる。また、ニッケル箔を採用したグラフェンやBCNのCVD合成法や転写法などは他の研究への応用も期待できる成果である。

4-5. グラフェンサンドイッチ技術を応用した湿潤試料観察

ここでは本研究で得られたグラフェン合成技術と転写技術を応用したグラフェンサンドイッチによる大腸菌の観察について報告する。これまでに開発してきたグラフェンサンドイッチ技術を、未固定の大腸菌の電子顕微鏡による観察技術へ応用した。今回、大腸菌内包のグラフェンサンドイッチ作製にあたり、大腸菌の挙動を観察するため過度なグラフェン同士の吸着を避ける必要があった。そこで昨年度までに開発してきた技術を応用しスパーサーとして穴あき薄膜をグラフェン層間に挿入する手法を採用した。今回使用したスパーサーはTEMグリッド上の支持膜として使用されるQuantifoilを採用し、その厚みは10 - 25 nmであった。また、電子顕微鏡によって生細胞を観察するにあたり、グラフェンサンドイッチ内の大腸菌に与える電子線照射ダメージは未知数である。特に液中試料の電子顕微鏡観察では様々なアーティファクトが観測されるため、一見すると正常な観察が行えている場合においてもその解釈には注意要する。今回は大腸菌液にあらかじめ生死判別染色(LIVE/DEAD@細菌生存率アッセイ)を行い、その内包操作をなるべく暗所で行うことで電子顕微鏡観察を受けた大腸菌の生死を調べた。

走査型電子顕微鏡による観察の結果、大腸菌は穴あき薄膜と共にグラフェンサンドイッチ内に閉じ込められている様子が確認できた。化学固定なし、かつ重金属染色なしでも十分なコントラストで大腸菌の表面構造が観察された。しかしながら、大腸菌が動き回る挙動は見られず、薄膜やグラフェンによって固定されているようであった。また、蛍光顕微鏡による観察の結果、電子線照射前は全体的に死細胞標識染色による赤色発光と生細胞染色の緑色発光が同等であった。これは一般には死細菌であることを示しているが、グラフェンサンドイッチ作製操作中の露光が避けがたく、緑色発光が電子線照射前にすでに消光し始めていることによる結果であった。走査型電子顕微鏡観察後の試料では電子線照射領域において赤色染色の消光が著しく、少なくとも本染色では生死判別が困難であることがわかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yuki Sasaki, Satoru Hirayama, Ryoma Nakao	4. 巻 -
2. 論文標題 Scanning electron microscopy of Escherichia coli encapsulated in a spacerized graphene sandwich	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microscopy	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jmicro/dfac010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------