

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 30 日現在

機関番号：10101
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2010～2011
 課題番号：22760019
 研究課題名（和文） 生体試料用可視化剤への応用を目指したイオン性液体の物性制御
 研究課題名（英文） Study on the physical properties of the ionic liquids and their applications for bio samples
 研究代表者
 兵野 篤 (HYONO ATSUSHI)
 北海道大学・大学院工学研究院・助教
 研究者番号：20554299

研究成果の概要（和文）：通常および親水化処理したカーボンナノチューブを試料としてイオン液体塗布による電子顕微鏡観察を行い、表面の親水-親油性によってイオン液体の親和性と一致するほど均一に表面をコートしてチャージアップをおさえ、微細構造の観察が可能であることを明らかにした。

さらに、イオン液体を可視化剤として化学的な前処理を施さない赤血球の電子顕微鏡観察に成功した。親水性が高く生体細胞との親和性が高いイオン液体を原液のまま用いて細胞を処理することにより、赤血球の破壊を抑えることに成功した。

研究成果の概要（英文）：Normal hydrophobic carbon nanotubes and hydrophilic ones which were pretreated hydrophobic and hydrophilic ionic liquids were observed with SEM. The samples with the combinations of hydrophobic samples and hydrophobic liquids, and, hydrophilic samples and hydrophilic liquids were easily observed, while samples by other choices for bad affinity between samples and liquids were charged up by electron beam during SEM observations. These results mean that ionic liquids which have good affinities for the samples surfaces can spread on the surfaces. The observations of red blood cells with pretreatment with ionic liquids were also tried. It is succeeded that the cells were observed by SEM without destructions and deformations, only with simple pretreatment by ionic liquids.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,300,000	390,000	1,690,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：電子顕微鏡、イオン液体、表面・界面物性

1. 研究開始当初の背景

イオン液体は、常温で液体であるイオン性の物質で、水・油とは違う「第三の溶媒」として近年注目を集めている。カチオンとアニ

オン種の組み合わせにより多種多様なイオン液体が合成され、回収・再利用可能な合成用の新しい反応場としての用途に注目が集まっている。また同時に、イオン液体は蒸気

圧が非常に低く、「真空条件下での液体」という非常に興味深い状況を生み出すことが可能である。導電性を有するという特性から真空下でチャージアップせずに観察可能である。Arimotoらは、イオン液体が電子顕微鏡で観察可能であることを示したものの、生体試料向け電子顕微鏡用可視化剤としての開発は進められていない。その一因として、従来は合成用の反応場としての要求から油溶性のイオン液体に注目が集まっており、水溶性のイオン液体についてはまだ研究が進められていないことが挙げられる。

水溶性のイオン液体を電子顕微鏡用の可視化剤として用いることで、以下のような利点がある。

- (1) 観察後、水洗によりサンプルの繰り返し使用が可能である
- (2) 水溶液として低濃度から高濃度へ徐々に置換が可能で、生体試料への傷害を回避できる。

イオン液体はカチオンとアニオンの無数の組み合わせが可能であり、その構造に依存して性質が変化する。イオン液体で試料を被覆することにより、絶縁体試料の電子顕微鏡観察が可能となり、我々はすでに水溶性イオン液体を用いてヒト毛髪の電子顕微鏡観察を試み鮮明な像を得ることに成功している。しかしながら、表面のイオン液体の除去が不完全な状態では、表面構造が埋没してしまうという問題点を見出した。

イオン液体の物理化学的性質は、実験・理論ともに盛んにすすめられており、純粋イオン液体中での分子のふるまいに関しても分かってきている。しかしながら、実用上必要な界面化学的性状についてはいまだ研究例にとぼしい。溶媒としての扱いのみならず、表面処理材料としての応用や生体材料との組み合わせを視野に入れた物性研究が必要とされている。

2. 研究の目的

本申請課題では、水溶性イオン液体の物理化学的特性—構造相関を明らかにする。濡れ性・粘性・界面活性・水との混合液中での解離度・細胞膜透過性に焦点を当ててデータを蓄積し、生体サンプルに適用可能な電顕用可視化剤としてイオン液体を利用する。

以下の2段階に分けて生体サンプルへの適用とそのために必要な物理化学的特性を測定し、必要な性質を有する水溶性イオン液体

の合成および試料処理法の開発を行う

- (1) 水溶性イオン液体の濡れ性・粘性—毛髪および硬組織の表面処理および観察

歯・骨や毛髪の走査電子顕微鏡による観察のためには、金属で表面をコーティングするなど導電性処理が必要になる。処理に時間がかかることに加え、一度施したコーティングは除去できず、特に病理サンプルなどの希少なサンプルに関しては可逆的な処理法が望まれる。イオン液体で表面導電処理を行うことで、水洗により可逆的な処理法を開発する。

- (2) 水溶性イオン液体の界面活性・浸透圧と生体細胞内部へのイオン液体による置換および観察

血液細胞や組織細胞では、真空中での変形を避けるため膜固定や脱水・乾燥処理が必要になる。煩雑な処理を必要とし、さらに乾燥処理は本来の細胞の形状を変化させてしまう。イオン液体で細胞内を充填することにより、乾燥過程を必要としない可視化処理を実現する。

3. 研究の方法

H22年度は、毛髪・歯・骨を用いて生体試料表面をイオン液体で被覆することを目指した。さらに、微細構造の観察と表面親和性との影響を詳しく調べるための試料として、表面を親水化したカーボンナノチューブと通常表面が疎水性のカーボンナノチューブを試料として、その微細構造観察を行った。イオン液体には、疎水性のものと親水性のものをを用いた。

H23年度は、細胞内をイオン液体で置換することを目標に赤血球を試料として用いた。未処理細胞膜を傷つけず、膜を透過してイオン液体を内部に浸透させ、形状を保持したまま電子顕微鏡観察を行った。そのために、水溶液中でのイオン液体の挙動に着目し、イオン性液体水溶液の界面活性・解離度および浸透圧を考慮し、より適すると思われる親水性のイオン液体を用いて処理し、電子顕微鏡観察を行った。

4. 研究成果

通常および親水化処理したカーボンナノチューブを試料としてイオン液体塗布による電子顕微鏡観察を行い、表面の親水-親油性によってイオン液体の親和性と一致するほど均一に表面をコートしてチャージアップをおさえ、微細構造の観察が可能であることを明らかにした。これは、イオン液体を可視化剤とす

る微細構造観察の可能性を示す意味で重要な成果であり、学会発表を行った。



図1. 親和性の悪いイオン液体でカーボンナノチューブを処理した電子顕微鏡像

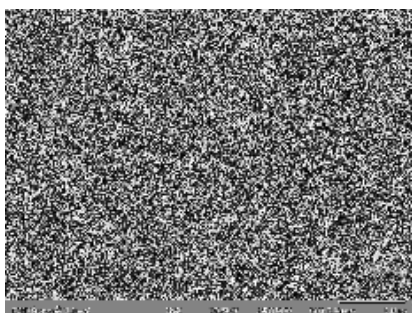


図2. 親和性の良いイオン液体でカーボンナノチューブを処理した電子顕微鏡像

さらに、イオン液体を可視化剤として化学的な前処理を施さない赤血球の電子顕微鏡観察に成功した。当初、赤血球のような変形しやすく壊れやすい細胞にイオン液体による処理法を適用することは困難と考えられていた。また、イオン液体を可視化剤とした走査電子顕微鏡観察像では、良好なコントラストが得られないことも問題点のひとつであった。

そこで、親水性が高く生体細胞との親和性が高いイオン液体を原液のまま用いて細胞を処理することにより、赤血球の破壊を抑えることに成功した。また、赤血球の変形も最小限におさえられていることから、細胞膜を介した浸透も起こっていると考えられ、細胞浸透性のよいイオン液体の探索を達成した。さらに、フィルターを用いた試料の前処理により、視野中の細胞数を増やし、それによって結果的に導電性を向上することにより良好なコントラストの走査電子顕微鏡観察像を得ることに成功し、赤血球のような遊離細胞にまで適用可能な汎用性の高い電子顕微鏡試料前処理法を確立した。

この結果は、赤血球のみならず生体細胞全般に適用可能であると考えられ、医療分野等での迅速な電子顕微鏡観察用細胞処理法と

しての応用にむけて大きな意味を持つものである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

1. Shigeaki Sbe, Kosuke Ishikawa, Atsushi Hyono, Hirohisa Kobayashi, Takayuki Kiba, Tsukawa Akasaka, Motohiro Uo, Yasutaka Yawaka, Shin-Ichiro Sato, Tetsu Yonezawa, Fumio Watari, Observation of a 3D Network Nano-Structure of Carbon Nanotubes Scaffold for Cultivation, Journal of Surface Science and Nanotechnology, 査読有, Vol. 9, 2011, pp. 80-84

[学会発表] (計7件)

1. S.Abe, A. Hyono, T. Yonezawa, F. Watari: "SEM observation of carbon nano materials using ionic liquids", ISPlasma, 20122012/3/7 Chubu Univ. (Kasugai)

2. 阿部 薫明, 兵野 篤, 赤坂 司, 亘理 文夫, 米澤 徹
"イオン液体を用いた SEM の新規観察法の開発"
第 58 回日本歯科理工学会学術講演会、2011/10/23、奥羽大学 (郡山)

3. 兵野 篤, 河合 功治, 東 寛, 藤原 満博, 米澤 徹、新規水溶性イオン液体を可視化剤として用いた赤血球の電子顕微鏡観察、日本顕微鏡学会第 67 回学術講演会、2011/5/18、福岡国際会議場 (福岡)

4. 兵野 篤, 河合 功治, 阿部 薫明, 米澤 徹、親・疎水性のイオン液体を用いた親・疎水性 CNT の微細構造観察、日本顕微鏡学会第 67 回学術講演会、2011/5/18、福岡国際会議場 (福岡)

5. 阿部薫明、兵野篤、亘理文夫、米澤徹
"イオン液体を用いた細胞培養用カーボンナノチューブスキャフォールドの表面構造観察"
日本顕微鏡学会第 67 回学術講演会、2011/5/16、福岡国際会議場 (福岡)

6. S. Abe, S. Itoh, D. Hayashi, A. Hyono, T. Akasaka, M. Uo, Y. Yawaka, T. Yonezawa, F. Watari, T. Takada

"Biodistribution of water-soluble Carbon Nanotubes in mice and its biocompatibility"
AsiaNANO 2010, 2010/11/1, Tokyo Miraikan (Tokyo)

7. S. Abe, N. Iwadera, K. Ishikawa, A. Hyono, S. Itoh, T. Akasaka, M. Uo, Y. Yawaka, T. Yonezawa, F. Watari
“Internal Distribution of Micro-/ Nano-sized Inorganic Particles and Its Cytotoxicity”
3rd International Congress on Ceramics,
2010/10/15, Osaka International Convention Center (Osaka)

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

兵野 篤 (HYONO ATSUSHI)
北海道大学・大学院工学研究院・助教

研究者番号：20554299

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：