

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24656026

研究課題名(和文) 生体関連物質を模倣したイオン液体による電顕用可視化剤

研究課題名(英文) Development of biorelated-material-inspired ionic liquid for a visualizing agent for electron microscopic observations

研究代表者

米澤 徹 (YONEZAWA, TETSU)

北海道大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90284538

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、常温で熔融した有機塩であり、真空中で蒸発をしないイオン液体を用い、それを導電体として試料表面の塗布することで、試料のチャージアップならびに乾燥を防ぎ、生体関連試料を湿潤状態で観察することを実現する。さらに、そうした手法の応用展開を図ることを目的とする。

研究期間の2年間で、非導電性物質、特にナノ物質のイオン液体による観察法について確立することができたとともに、生体関連物質の観察を、水溶性の高いコリンと呼ばれる生体関連化合物と同様の構造を持ったイオン液体を用い、さらに、試料をイオン液体に分散させたのちに、柔らかく吸引することで変形なく観察することを可能とした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have used ionic liquids as the SEM visualizing reagent of non-conductive nanomaterials and bio-related samples including cells and construct an optimized pre-treatment method for SEM observation. Ionic liquids are organic salts which are in liquid at room temperature and do not evaporate even in a vacuum conditions. Therefore, they should be a suitable material for SEM visualization.

We have been able to establish the processes to visualize non-conductive nanomaterials during this research period. For bio-related samples, including cells, we applied choline-type structured ionic liquids as the visualizing agents. The samples were dispersed in the ionic liquids and put on a membrane filter. The dispersion was filtered gently under reduced pressure by using a syringe and excess ionic liquids were removed. Using this process, red blood cells could be observed by SEM without any deformation.

研究分野：応用物理学・工学基礎

科研費の分科・細目：薄膜・表面界面物性

キーワード：電子顕微鏡 走査型電子顕微鏡 イオン液体 可視化 導電性 生体試料 赤血球 コリン

1. 研究開始当初の背景

イオン液体とは、常温で液体状態であるイオン性の物質、つまり常温溶融塩のことで、一般に有機化合物の塩である。これは、水・有機溶媒(油)とは異なる「第三の液体・溶媒」として新規機能材料の観点や、新規有機合成溶媒としての見地から非常に興味を集めている物質である。

比較的空間体積の大きいカチオンとアニオン種の組み合わせによって多種多様なイオン液体がすでに合成されており、高濃度イオン場として、また、水とも有機溶媒とも混合しないもの場合は、回収および再利用が容易な液体媒体として合成用の新しい反応場としての用途が期待されている。

一方で、イオン液体は塩であり、基本的には蒸気圧が存在しない。つまり、真空下でも蒸発せず、液体として存在する物質である。この点を利用すれば、真空中での新しい反応場を提供できるとともに、真空を汚さない液体としての利用価値も期待できる。さらには、塩であるイオン液体は、高い導電性を有している。このため、イオン液体は有機物でありながら、走査型電子顕微鏡でその液体形状を観察することができる。

桑畑らは、実際にイオン液体が走査型電子顕微鏡で観察可能であることを示した。この手法は、非導電性物質の容易な SEM 観察法として認知されつつあるものの、まだ、湿潤状態での生体関連試料の観察例は多くない。生体関連試料は、当然ながら真空中では乾燥してしまうため、電子顕微鏡では「烏賊とスルメ」、「魚と干物」に例えられるような状態のサンプルを観察していることになっているとされており、生体関連試料向けの電子顕微鏡可視化剤の存在は強く期待される。

そこで本研究では、さまざまなイオン液体が開発されてきているなかで、油性のイオン液体だけでなく、水性のイオン液体にも着目する。水性イオン液体を用いれば、試料観察後、水洗によって試料を容易に回収できるほか、水溶液としてイオン液体の濃度を適切に制御して試料の水分とうまく置換できれば生体試料の変形を防げると考えられるからである。

そこで、一般的に用いられ、多くは油性のイミダゾリウム型のイオン液体に加え、コリン型イオン液体について検討を行うこととした。そして、血液細胞や組織細胞のありのままの姿を観察することを目指した。

イオン液体は、カチオンとアニオンの多数の組み合わせが可能であって、その分子構造によって性質が大きく変化する。しかし、そのイオン液体は粘度が高いものも多く、均一に試料表面をコートすることが難しい。また、どのように試料表面を傷つけずにコーティングするか、さらには、湿潤サンプルの場合、その状況をどう保持するかをよく考えて前処理プロセスの設計をしなければならぬ。こうした研究を行い、非固定細胞表面の観察

を可能とする必要がある。

2. 研究の目的

本申請課題では、固定化・金属コーティングというこれまでの非導電性試料・生体関連試料の前処理方法に代え、より簡便な手法となりうるイオン液体を用いた走査型電子顕微鏡観察のための前処理手法をより確固としたものとして確立するために、種々のイオン液体を用い、前処理方法を最適化して多くのサンプルの観察を試みた。

これまでの、非導電性試料・生体関連試料の観察においては、電子顕微鏡の性質上、試料の脱水・乾燥、導電コーティング(金属コーティング)の過程が必須であった。この処理には時間を要し、さらには一度施した前処理から元に戻すことができない。生体関連試料には、たとえば病理サンプルなどの希少なサンプルがあり、これらはこのような前処理法では失敗ができない。

無機試料・カーボン試料などの導電性付与には、いくつかのイオン液体を表面に薄くコートすることが有効であることが知られているが、その手法はまだ十分確立されていない。本研究では、特にこうしたナノ構造体・自己集合体の観察を容易にするための手法・イオン液体の選択、塗布方法の開拓を行う。

一方、生体関連試料においては、湿潤状態での観察が今後必須となる。特に、硬い細胞である植物細胞のみならず、柔らかい細胞である動物細胞や組織細胞、血液細胞の真の姿を明らかにする SEM 観察法を確立することを本研究の目的とした。つまり、先滴下された実用的な細胞可視化法を考えることを目的とした。

3. 研究の方法

H24 年度は、従来のイミダゾリウム系イオン液体、さらには当グループで開発したコリン型イオン液体を含む水性イオン液体を用いた非導電性サンプル・生体関連試料の走査型電子顕微鏡観察を行った。

特にナノサイズ・マイクロサイズの試料観察を主に行った。

まず最初に、カーボン系材料を様々な前処理したものや、自己組織化したものについてイオン液体による可視化前処理を行って、その構造を SEM 観察した。そうして得られた像と、金属コーティングによって前処理した試料との像との違いについて詳細に検証した。さらに、より高度な試料として、陽極酸化によって作成したチタニアナノチューブの表面構造についても同様のイオン液体による前処理と金属コーティングによる前処理による SEM 像の違いについて検証した。この場合、チューブの壁の厚さが薄いため、イオン液体による可視化前処理においても解像度が高い像が得られることが求められた。

生体関連試料の観察においては、植物細胞だけでなく、さらに柔らかい血液細胞の観察を行った。植物細胞としては花粉などを観察対象とし、また、バクテリアも観察対象とした。

その際、界面活性が低く、低分子であるコリン型イオン液体を可視化剤として用いることとした。我々の合成したコリン型イオン液体の一部は、水中で 1:1 に電離することがわかっており、ほとんど界面活性を有していない。本研究では、対称となる血液細胞として赤血球を用いて、コリン型イオン液体で前処理し観察を行った。また、そのほかの細胞についてもこのイオン液体の有効性について検証した。

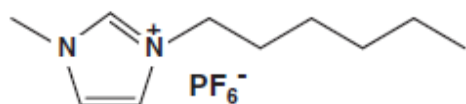
H25 年度では、さらに進めて、生体関連試料のイオン液体による試料前処理法について検討・最適化を行った。イオン液体によって試料をコーティングするためには、基板状の試料であれば、そのまま滴下する方法も考えられるが、粉体や小さな構造体である場合その手法の適用は難しい。そこで、細胞表面を薄くイオン液体をコートする方法としてメンブレンフィルターを用いる方法を試みた。具体的には、試料をイオン液体もしくはその溶液に分散し、その分散液をメンブレンフィルター上に置く。そして、試料を含むその液体を緩やかに注射器を用いて減圧で吸引することによって余分なイオン液体を除去し、試料表面をイオン液体で薄くコートした。

こうした手法によりさまざまな生体関連試料の SEM 観察法を確立することを目指した。

4. 研究成果

本研究においては、有機の常温熔融塩であるイオン液体を用いて非導電性試料、さらには同じく非導電性の生体関連試料表面に導電性を与え、走査型電子顕微鏡観察を容易に可能とすることを目的としている。

非導電性試料として、ナノカーボンを最初の観察対象物とした。表面処理・未処理のナノカーボンにイオン液体塗布して SEM 観察を行った。このとき、下図に示すようなイミダゾリウムタイプのイオン液体を用いた。



ナノカーボンの SEM 像の場合、従来の金属スパッタリングによって試料を可視化処理した SEM 像と比較しても見劣りしない像が得られており、30 nm 程度の解像度を示した。また、フラレンの自己集合体についても同様に観察したところ、高解像度で SEM 観察できた。図 1 にイオン液体で可視化処理したフラレンの集合体の SEM 像を示す。この比較によって、非導電性サンプルに薄く

イオン液体をコートすると十分解像度が高く鮮明な SEM 像が得られることが示された。

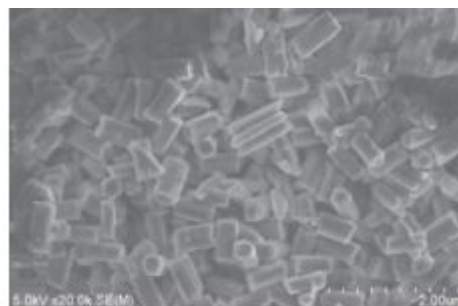


図 1 フラレン集合体の SEM 像。イオン液体による導電性付与によるもの。

また、金属酸化物のナノポーラス構造である、チタニアナノチューブにも本手法を適用してみたところ、やはり金属スパッタによるコーティングと同様な鮮明な SEM 像が高倍率で得られた。

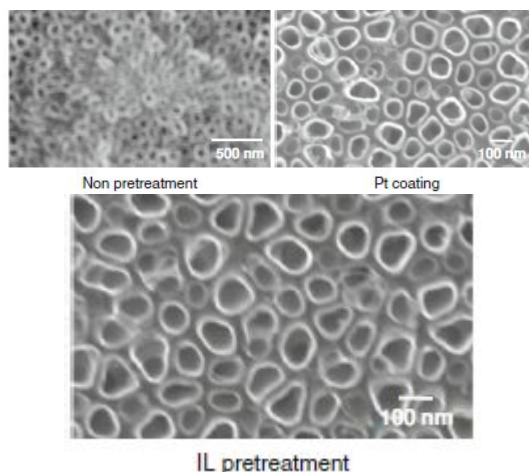


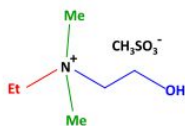
図 2 陽極酸化で得られたチタニアナノチューブの SEM 像。上左：前処理なし、上右：Pt スパッタコート、下：イオン液体処理。

このようにイオン液体処理は、非導電性物質の SEM 像形成において、金属スパッタリングと同様な性能を示すことがわかる。

そこで、次に生体関連試料にイオン液体による可視化を適用した。大きな組織などはイオン液体の塗布によって図 1、2 などと同様に可視化することができた。しかしながら、花粉や細胞などの小さな試料の観察の場合には、形状や表面にダメージを与えずにイオン液体を上手くコートすることは難しく、滴下・塗布による可視化はそれほど容易ではないことが示された。

そこで、より細かい粉末様の試料、特に生体関連試料に対するイオン液体コートが可能とする手法として、メンブレンフィルターを用いて余分なイオン液体を吸引除去する手法を試みた。

まずはイオン液体として次の分子構造式のようなコリンに分子構造を似せたイオン液体を用いた。



このイオン液体は親水性である。そして、図3に代表例を示すように、試料をこのイオン液体もしくはイオン液体の溶液に分散させメンブレンフィルターを乗せた吸引台の上に置いた。そして、下からゆっくりシリンジを用いて吸引し、余分なイオン液体を除去した。

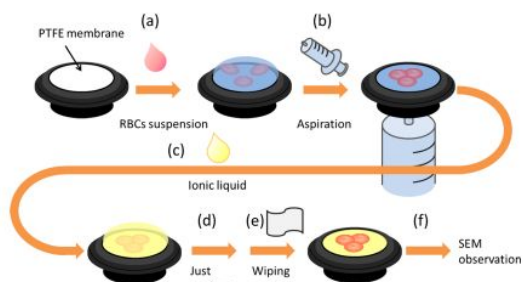


図3 細胞をイオン液体でコートする代表的な可視化前処理法例。フィルターの上に試料分散液を置き、吸引して余分なイオン液体を除去したのち、優しく拭いてサンプルとする。

このようにして得られる試料は大きく変形していないことが分かった。例えば、花粉を観察したところ図4のように、非常に鮮明な像が得られた。この像は、イミダゾリウム型イオン液体を用いたよりもチャージアップが少なく鮮明であった。

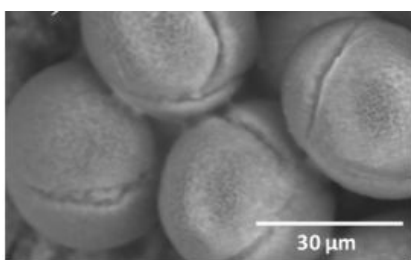


図4 コリン型イオン液体で前処理した花粉のSEM像の例。

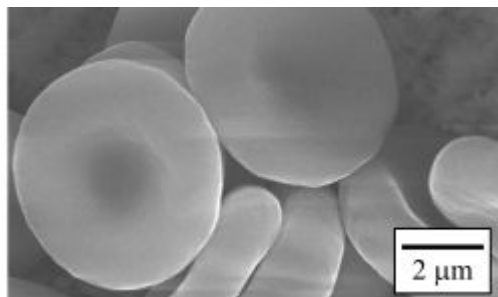


図5 コリン型イオン液体を用い、吸引法によって前処理して観察した赤血球のSEM像の例。

また、柔らかい細胞の代表例である赤血球の観察にこのイオン液体を用いたところ、図5に示すように光学顕微鏡像で見られるような真ん中がくぼんだ赤血球が多く見られた。破壊されているものも見られたが、これは浸透圧による影響の可能性が高い。

さらには、赤血球は刺激によって構造変化する場合があるが、そのような変形した赤血球も観察され、よりありのままの細胞像の走査型電子顕微鏡観察が可能となったことが示された。

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8件)

1. Shigeaki Abe, Atsushi Hyono, and Tetsu Yonezawa, "Influence of surface properties for SEM observation of carbon nanotubes prepared with room temperature ionic liquid", *Journal of Solution Chemistry*, 査読有, Vol. 43, 2014, 印刷中.
2. Shigeaki Abe, Nobuki Iwadera, Yusuke Hamba, Atsushi Hyono, Fumio Watari, Tsukasa Akasaka, Yasutaka Yawaka, Jun-ichiro Iida, and Tetsu Yonezawa, "Static and time lapse observation for estimation of biocompatibility of nano-sized ceramic particles with osteoblasts and hepatocytes", *Biomatter*, 査読有, Vol. 4, 2014, 印刷中.
3. Shigeaki Abe, Atsushi Hyono, Koji Kawai, and Tetsu Yonezawa, "Visualizing preparation using asymmetrical choline-like ionic liquids for scanning electron microscope observation of non-conductive biological samples", *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 査読有, Vol. 14, 2014, 2620-2623.
4. Atsushi Hyono, Tetsu Yonezawa, Koji Kawai, Shigeaki Abe, Mitsuhiro Fujihara, Hiroshi Azuma, and Shinobu Wakamoto, "SEM observation of the live morphology of human red blood cells under high vacuum conditions using a novel RTIL", *Surface and Interface Analysis*, 査読有, Vol. 46, 2014, 425-428.
5. Chaorui Xue, Takashi Narushima, and Tetsu Yonezawa, "Direct SEM observation of non-electroconductive TiO₂ nanotube arrays prepared by anodization using an ionic liquid as a visualizing reagent", *Journal of Inorganic & Organic Polymers & Materials*, 査読有, Vol. 23, 2013, 239-242.
6. Koji Kawai, Kotaro Kaneko, Hayato Kawakami, Takashi Narushima, Tetsu Yonezawa, "Simple pretreatment of non-conductive small hydrous bio-samples with choline-type ionic liquid and membrane filter for microsample mounting",

Colloids and Surfaces B – Biointerfaces, 査読有, Vol 102, 2013, 9-12.

7. Shigeaki Abe, Atsushi Hyono, Yuri Machida, Fumio Watari, and Tetsu Yonezawa, “Conductivity preparation of choline lactate ethanol solution for SEM observation: Both hard and soft tissues in living matter”, *Nano Biomedicine*, 査読有, Vol 4, 2012, 18-23.
8. Shigeaki Abe, Atsushi Hyono, Katsutoshi Nakayama, Tomoya Takada, and Tetsu Yonezawa, “SEM observation of nano carbon materials with imidazolium-type room temperature ionic liquid”, *Japanese Journal of Applied Physics*, 査読有, Vol 52, 2013, 01AH02.

〔学会発表〕(計 13 件)

1. 米澤徹, 「イオン液体における応用技術」, ScanTech 2014(招待講演), 2014/9/12, 東京都市大学世田谷キャンパス(東京都)
2. 兵野篤, 阿部薫明, 赤坂司, 巨理文夫, 米澤徹, 「イオン液体を用いたバイオマテリアルの SEM 新規観察法の開発」, 代用臓器・再生医学研究会, 2014/3/1, 北海道大学(北海道)
3. Shigeaki Abe, Atsushi Hyono, Yusaku Hamba, Nobuki Iwadera, Shuuichi Yamagata, Fumio Watari, Tsukasa Akasaka, Yasutaka Yawaka, J-i. Iida, and Tetsu Yonezawa, “Biocompatibility and biodistribution of several micro-/nano-sized inorganic particles”, 2013/10/29, 6th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health (NanOEH), Nagoya Congress Center (愛知県)
4. 阿部薫明, 兵野篤, 河合功治, 米澤徹, 「イオン液体を用いたナノ/バイオマテリアルの SEM 観察」, 医学生物学顕微鏡技術学会, 2013/6/8, 神奈川歯科大学(神奈川県)
5. Shigeaki Abe, Atsushi Hyono, Koji Kawai, and Tetsu Yonezawa, “Scanning electron microscope observation of nano/biological materials with room temperature ionic liquids”, International Conference on Solution Chemistry, 2013/7/10, Kyoto Tera (京都府)
6. 許斐麻美, 塩野正道, 坂上万里, 中澤英子, 河合功治, 桑畑進, 米澤徹, 「イオン液体による肝細胞由来スフェロイドの SEM 観察」, 日本顕微鏡学会第 69 学術講演会, 2013/5/20, ホテル阪急液スポパーク(大阪府)
7. 坂上万里, 許斐麻美, 塩野正道, 中澤英子, 河合功治, 桑畑進, 米澤徹, 「イオン液体を用いた柔組織の SEM 観察」, 日本顕微鏡学会第 69 学術講演会 2013/5/20, ホテル阪急液スポパーク(大阪府)

8. 阿部薫明, 兵野篤, 河合功治, 巨理文夫, 米澤徹, 「SEM 観察における生体試料可視化のためのイオン液体の利用」, 日本顕微鏡学会第 69 学術講演会 2013/5/20, ホテル阪急液スポパーク(大阪府)
9. Chaorui Xue, Takashi Narushima, and Tetsu Yonezawa, “Double-walled TiO₂ nanotube arrays prepared by anodization in fluoride/glycerol electrolyte”, 2012 International Joint Symposium between HU & CNU on Advanced Material Science and Technology, 2012/11/30, 北海道大学(北海道)
10. 中澤英子, 許斐麻美, 塩野正道, 河合功治, 桑畑進, 米澤徹, 「イオン液体の電子顕微鏡応用」, 日本顕微鏡学会第 56 回シンポジウム(招待講演) 2012/11/19-20, 北海道大学(北海道)
11. 米澤徹, 「コリン型イオン液体による含水物質への導電性付与と SEM 観察への応用」, 日本顕微鏡学会第 56 回シンポジウム, 2012/11/19-20, 北海道大学(北海道)
12. 薛超瑞, 成島隆, 米澤徹, 「チタニアナノチューブアレーの簡便な SEM 観察法」, 日本顕微鏡学会第 68 回学術講演会, 2012/5/14-16, つくば国際会議場(茨城県)
13. 阿部薫明, 兵野篤, 巨理文夫, 米澤徹, 「イオン液体を用いたナノカーボン物質の微細構造の観察」, 日本顕微鏡学会第 68 回学術講演会, 2012/5/14-16, つくば国際会議場(茨城県)

〔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
先進材料ハイブリッド工学研究室ホームページ

ーシ

<http://labs.eng.hokudai.ac.jp/labo/limsa/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

米澤 徹 (YONEZAWA TETSU)
北海道大学・大学院工学研究院・教授
研究者番号：90284538

(2)研究分担者

阿部 薫明 (ABE SHIGEAKI)
北海道大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：40374566

(3)連携研究者

()

研究者番号：