

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：82706

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15379

研究課題名(和文) 粒子表面に束縛された溶媒層を電子顕微鏡で可視化する

研究課題名(英文) Electron microscopic imaging of the solvation layer on nanoparticles

研究代表者

岡田 賢 (OKADA, Satoshi)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・超先鋭研究開発部門(超先鋭研究開発プログラム)・研究員

研究者番号：90780916

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：溶媒に分散したナノ粒子の表面近傍には、非共有結合により溶媒が数nm程度束縛されていると考えられている。ピッカリングエマルションと呼ばれる、油と水を界面活性剤粒子により分散したものの内部でも同様な溶媒層が存在しても良いと考えられるが、これまで可視化されてこなかった。本研究では、エマルション内部の溶媒層を走査電子顕微鏡により可視化することを目的とし、要素技術の開発を行った。溶媒層厚さの決定には至らなかったが、極低温で動作する導電性接着剤、極低温条件での二次電子放出係数測定システム、非導電性試料の無蒸着観察、エマルション内面の露出手法など観察に必要な要素技術の開発に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで極低温条件での走査電子顕微鏡観察には、試料の固定、導通の確保、像解釈などの問題が残っていたが、本研究を進める上で開発した技術により、これらの問題が部分的に解決され、今後の1 nmスケールでの生物・材料系試料の極低温走査電子顕微鏡観察に向けた基盤が確立された。また、化粧品等に用いられるエマルションの内部構造を可視化することに成功しており、本研究をさらに拡張することで有効成分の徐放などへの応用展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：The surface of solvent-dispersed nanoparticles is covered with solvents several nanometers in thickness. A Pickering emulsion is a biphasic particle whose interface is stabilized by surfactant nanoparticles, and the solvent layer should also exist in its inside, though not visualized so far. I tried to develop methods to visualize the inner-emulsion solvent layer using low-temperature scanning electron microscopy. Although the solvent layer was not clearly visualized, methods and tools to visualize it has been developed, including conductive adhesives operatable at dry ice to liquid nitrogen temperature, a system to measure the secondary electron emission coefficient of low-temperature samples in a microscopy chamber, and methods to expose inside of high-pressure frozen emulsions.

研究分野：物理有機化学

キーワード：走査電子顕微鏡 極低温観察 含水試料

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

溶媒に分散したナノ粒子の表面近傍には、束縛溶媒と呼ばれる数 nm 厚の溶媒層が存在すると考えられている。束縛溶媒は、バルクの溶媒とは異なり、粒子と非共有結合による相互作用をしている溶媒分子層を指す。この溶媒層は、粒子の分散安定性や力学特性などに影響する上、その厚みは塩濃度などによっても変化するとされている。束縛溶媒に関する研究は、単分散したシリカ粒子など、表面に露出したものに対して、主に原子間力顕微鏡、X線散乱、電気泳動、理論計算による研究が行われている。一方で、エマルションと呼ばれる、脂質二重膜などにより油と水のような混じらない2液の一方を粒子状にして分散したのものには、粒子外部および粒子内部に溶媒層があると予想される。外部の溶媒層に関しては測定例があるものの、内部の溶媒層を測定することは困難だった。

### 2. 研究の目的

本研究では、幅広い粒子分散系の内外表面に存在する束縛溶媒を同一手法で観察するため、集束イオンビームを搭載したクライオ走査電子顕微鏡 (cryo-FIB-SEM) を用いて粒子を切断し、蒸気圧差を利用して束縛溶媒をバルク溶媒から分離し観察することを目的とし、手法開発を行った。特に、観察の容易さから、ナノ粒子を界面活性剤とするピッカリングエマルションを観察対象として選択した。最終的な目標として、束縛溶媒の厚み、条件による厚み変化等を計測し、閉じたナノ空間における溶媒の挙動についての基礎的知見を得ることを目指した。

### 3. 研究の方法

粒径 50-200 nm の単分散シリカナノ粒子を合成し、各種シランにより表面修飾を行った。この表面修飾シリカナノ粒子および水と同程度以下の沸点を持ち水と混和しない有機溶媒を用いて、超音波処理により O/W 型エマルションを作成し、粒度分布を光学顕微鏡および動的光散乱により測定した。エマルションを形成する油は、具体的にはシクロヘキサン、イソペンタン、トルエン、クロロホルムを選択した。これらのエマルションを高圧凍結法により液体窒素温度まで急速に凍結し、クライオ SEM による観察、FIB による断面露出、SEM 中での温度制御による有機溶媒の昇華を行い、シリカ粒子層の高分解能観察を行った。

### 4. 研究成果

当初の目的を達成するためには、凍結試料の表面状態を保持したまま SEM の真空系に搬入する手技の確立、凍結試料の安定した切断、切断した断面の高コントラスト観察、溶媒除去速度の制御、断面の高分解能観察という 5 ステップを踏む必要がある。本研究では、これらの要素技術の一つずつ条件検討しながら確立していった。

#### (1) 真空搬送

高圧凍結した試料中では、氷はアモルファス状態で存在すると考えられるが、昇温すると氷が結晶化し、表面微細構造の解釈が困難になる恐れがあった。そのため、極低温を維持しつつ試料を SEM チャンバーに搬入する必要があり、試料を窒素雰囲気下のまま真空搬送する手段を確立することが必要となった。この問題は、高圧凍結試料専用の試料台を用いることで解決した。また、氷および有機溶媒という絶縁体の高分解能観察を可能にするため、低加速電圧条件での撮像手技も確立した。

低加速電圧 SEM 技術開発の一環として、生物のキチン質の高分解能観察を行い、無蒸着にて一本 6 nm 程度のキチンナノファイバーを観察することに成功した。さらに、極低温試料を用いた元素分析が可能であること、一方で解釈には注意を要することも明らかとなった。なお、前者の研究は本試料はスケーリーフットと呼ばれる鱗を持つ巻貝の鱗からタンパク質および灰分を除去することで得られ、本種で従来存在が確認されていなかったキチンを結晶構造を含めて初めて確認したものである。前者の研究成果は国際誌に論文として受理され、後者の研究は学会発表を行い、国際誌に投稿中である。

#### (2) 切断

高圧凍結したエマルション試料を FIB で切断することで、エマルション断面を暴露し SEM 観察することができた。観察された粒径は光学顕微鏡での結果と定性的に一致していた。断面の反射電子像コントラストは、水と比べて有機溶媒およびシリカナノ粒子では明るくなり、特にハロゲン系有機溶媒は明らかに高コントラストな物質として識別可能であった。一方、二次電子像としては水と有機溶媒のコントラストは似通っており、また断面像からシリカナノ粒子表面を見分けることは困難であった。そのため、高コントラスト条件の探索を行うことにした。

### (3) 高コントラスト観察

溶媒吸着層の観察にはシリカナノ粒子等の界面活性剤分子を水と明確に分離し、すなわちコントラスト差が最大になるような条件で観察する必要があった。コントラスト差はSEMの信号である二次電子の放出量に由来し、放出量は二次電子放出係数という、照射電圧に依存する物理パラメータで記述される。二次電子放出係数を厳密に測定しようとする、従来法では、ファラデーカップと呼ばれる電流測定装置の内部に平滑試料を固定し、試料に電子線を照射して測定する。しかしながら、試料固定は大気圧下常温にて行われるため、大気暴露および昇温が望ましくない高圧凍結試料には不適當であった。そのため、ファラデーカップを出し入れ可能な状態で予めSEM筐体内部に設置することを着想し、FIB使用時に電子ビームカラムを保護するためのシャッター下面に大口径ファラデーカップを装着するシステムを考案した。

上記システムは、試料の吸収電流および試料から放出された二次電子を、raspberry pi上に構築したpythonプログラムにより制御されたピコアンメーターで測定し、二次電子放出係数を算出する測定系および内径4mmを超えるファラデーカップからなる。高圧凍結試料は外形3mmの円盤状であるため、これをファラデーカップに導入できるように、高圧凍結試料を突き出した状態で保持できるような試料台も新たに開発した。この測定システムにより二次電子放出係数が測定できることを、各種金属ワイヤを用いて実証しているが、電源系由来の測定ノイズが排除できておらず、現在では100pA程度のノイズが乗る状態である。接続法やケーブルの実装法などを見直すことで、このノイズを10pA以下に抑えることができれば実用的な測定が可能になると考えている。

また、新たに開発した試料台は、高圧凍結試料を何らかの接着剤で固定する必要があったが、接着時には高圧凍結試料の昇温を極限まで抑える必要があった。市販の接着剤には、極低温のみで固化し常温からドライアイス程度の温度に至るまで液体であるものは存在せず、また導電性のない製品が多いため、高分解能SEM観察には不適當であった。そのため、液体窒素温度で凍結し、融点が十分低い接着剤を新規に開発した。具体的には、低融点溶媒であるブタンジオールに酸化グラフェンを導電補助材として混練して接着剤とした。この接着剤は、ドライアイス温度で流動性を持ち、それ以下の温度で凍結する上、水よりも昇華速度が遅いため、高圧凍結試料の断面を昇華エッチングした際にも接着が取れないという特徴を持つ。接着強度は目視および引っ張り試験により確認し、クライオSEMで運用する温度域において試料が脱落しないことを確認した。この接着剤が水酸基を豊富に持つため生体関連分子にも親和性があることを活かし、珪藻土や深海の巻貝といった不定形試料の固定に応用し、また導電性接着剤によるチャージアップの低減など、撮像上の利点があることを明らかとした、本接着剤に関する研究は学会発表を行い、また論文として現在国際誌に投稿中である。

### (4) 溶媒除去速度の制御

上記接着剤を用い、高圧凍結試料をFIBで割断した後に試料を-90℃程度まで昇温することで、低沸点である有機溶媒だけを選択的に除去できることを確認した。一方で、FIBによるガリウムイオン照射部で溶媒が膜状の不揮発性物質へと反応した可能性を示す画像も得られており、この詳細については現在検討中である。昇温条件をより詳細に決定するため、各種有機溶媒のみを高圧凍結し、昇華速度を測定した。詳細は論文化に向けて準備中であるが、溶媒に水素結合が存在しうる場合は、溶媒の沸点以上に溶媒昇華が起こりにくいことが明らかとなった。この結果から、シクロヘキサンおよびクロロホルムを主な有機溶媒として今後の条件検討を行った。

### (5) 断面の高分解能観察

溶媒吸着層を観察するため、真空中で断面試料を昇温し、溶媒の内面を暴露した。その結果、粒子は必ずしも表面を最密充填していないこと、シリカ粒子の平均粒子間距離と平均粒径から粒子間空隙が25-30nm程度であることが明らかになった。ただし、粒子間空隙距離の誤差が大きく、この値をそのまま溶媒層の厚み相当と考えることには疑念の余地がある。また、シリカ粒子は反射電子像により観察しているが、反射電子像で観察できる粒径は引き出し電圧により数nm程度変化するため、観察条件による誤差も無視できない。以上の結果から、現段階では正確な溶媒層の厚さを走査電子顕微鏡のみから計測することは困難であると結論づけている。

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Isobe Noriyuki, Chen Chong, Daicho Kazuho, Saito Tsuguyuki, Bissessur Dass, Takai Ken, Okada Satoshi	4. 巻 19
2. 論文標題 Uniaxial orientation of -chitin nanofibres used as an organic framework in the scales of a hot vent snail	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of The Royal Society Interface	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） 10.1098/rsif.2022.0120	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡田賢
2. 発表標題 クライオSEMによる生体ナノ構造の決定
3. 学会等名 バイオメティクス研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡田賢、佐川直也、磯部紀之、出口茂
2. 発表標題 天然糖タンパクで安定化されたエマルションの油水界面構造の観察法
3. 学会等名 日本顕微鏡学会第75回学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡田賢、Chen Chong、渡部 裕美、磯部 紀之、高井 研
2. 発表標題 超深海に生息する端脚類カイコウオオソコエビにおける臭素濃集
3. 学会等名 日本地球惑星科学連合2022年大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡田寛、Chen Chong
2. 発表標題 クライオ走査電子顕微鏡用導電性接着剤の開発
3. 学会等名 日本顕微鏡学会第78回学術講演会
4. 発表年 2022年

〔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		
モーリシャス	Maritime Zones Administration and	Exploration, Prime Minister 's Office	