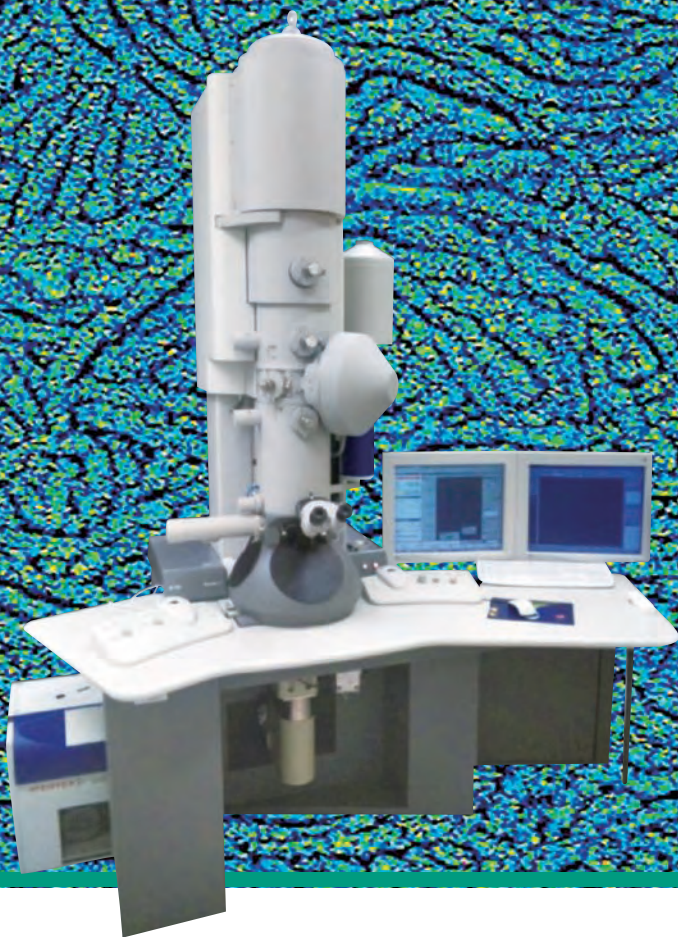


クライオ技法電子顕微鏡を駆使した 材料開発用のナノ構造評価技術



100 nm

背景:プラスチック製品表面のナノ構造

クライオ技法電子顕微鏡を駆使して 材料開発に必要なナノ構造評価をする。

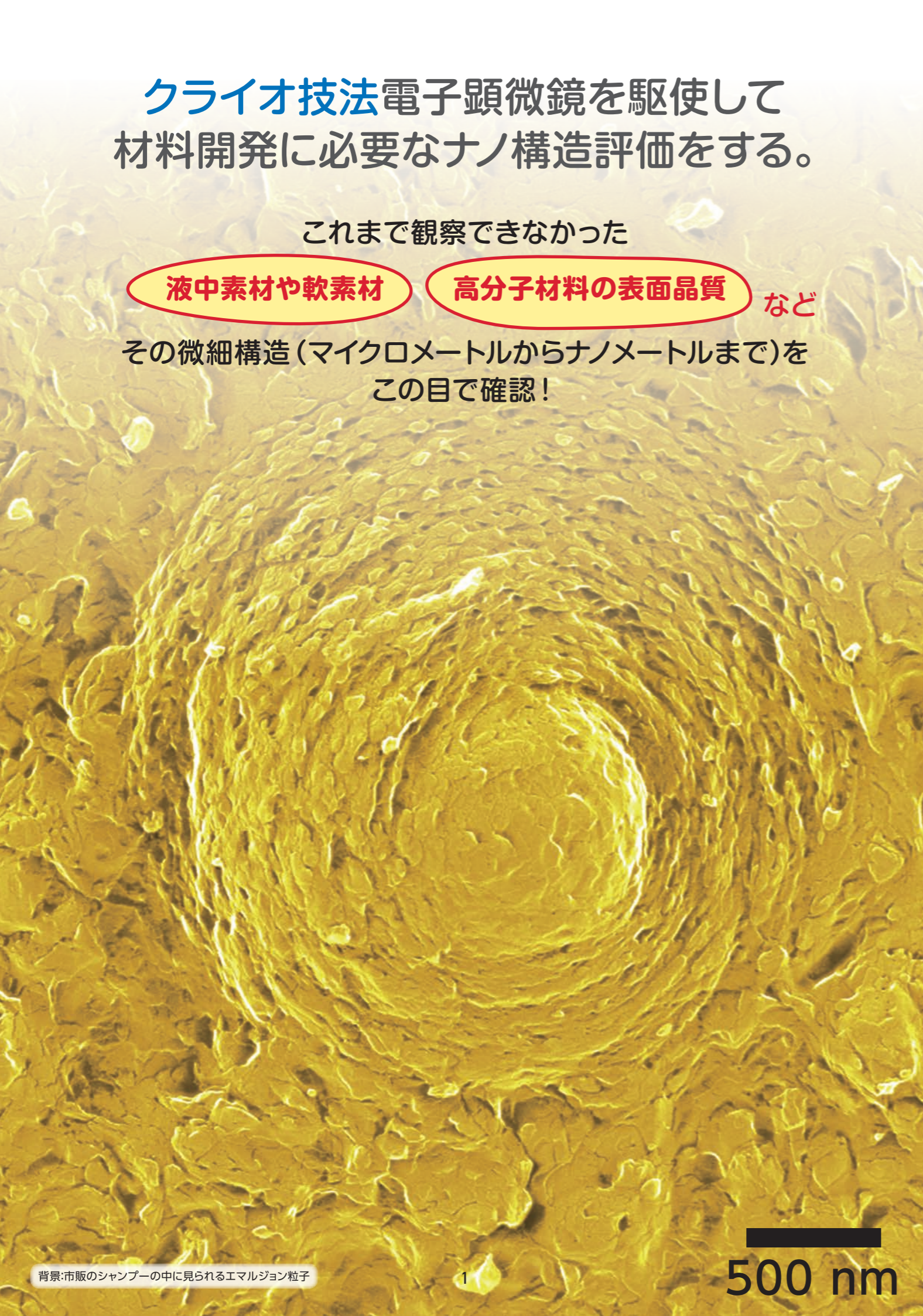
これまで観察できなかった

液中素材や軟素材

高分子材料の表面晶質

など

その微細構造(マイクロメートルからナノメートルまで)を
この目で確認!

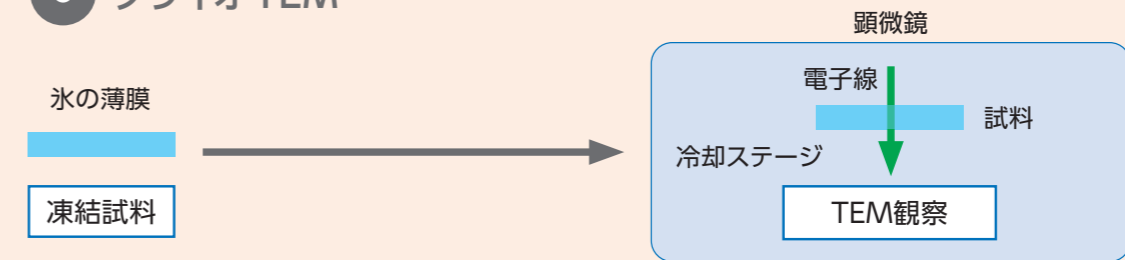


クライオ技法の 電子顕微鏡観察について

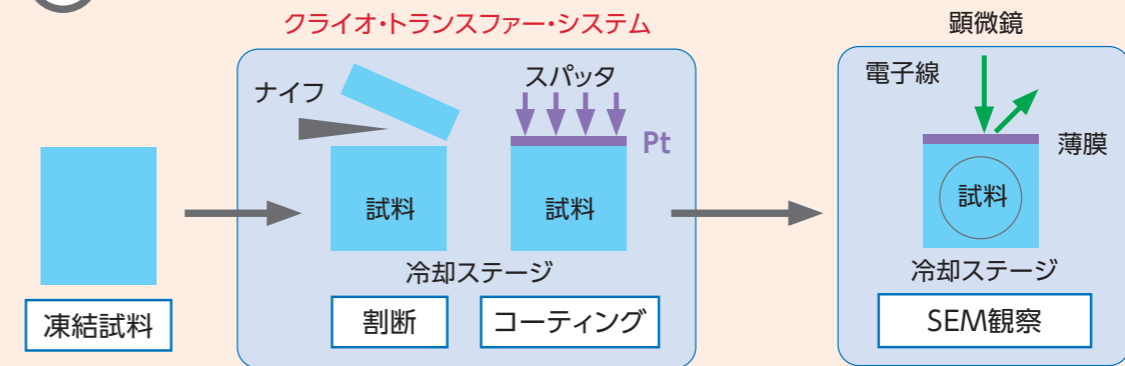
液中・含液素材や“柔らかい”素材は、電子顕微鏡で観察しようとしても、乾燥・真空環境や電子線照射などで試料が損傷するため、固体素材に比べると格段に困難な観察対象です。そこで生物系の電子顕微鏡観察では、この問題を解決するべく「クライオ技法」が発展してきました。「クライオ技法」とは、冷却・凍結を利用して試料調製をする技術、あるいは観察を行う技術の総称で、クライオTEM法やクライオSEM法では、凍結させた試料を冷却ステージのある顕微鏡に導入し、低温下で観察します。一方、フリーズ・レプリカ法のように、凍結試料を低温下で観察用に加工してから、常温で観察する技術もあります。



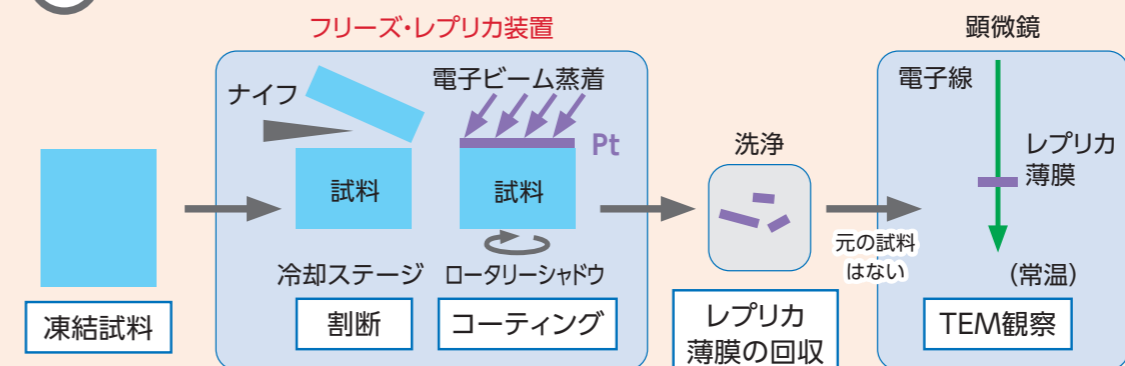
● クライオTEM



① クライオSEM



② フリーズ・レプリカTEM



クライオ技法の工程比較

いずれも、凍結試料を作製して観察。クライオTEMは、凍結試料を鏡体中で冷却して観察。①クライオSEMは、凍結試料に切断とコーティングをし、試料を鏡体中で冷却して観察。②フリーズ・レプリカTEMは、凍結試料に切断とコーティングをし、試料を除去してレプリカ膜のみを常温で観察。

クライオSEM法、フリーズ・レプリカTEM法と表面レプリカ法

電子顕微鏡にはいろいろな水準の拡大能力(倍率設定)や機能があり、使用する目的と装置・解析能力とをマッチングさせておくことが大切です。材料開発を目的とする場合は、数百 μm から数 nm に至るサイズ領域を把握する、マイクロメカニズム、ナノメカニズムの視点が重要になります。この冊子では、そのように微細な構造をカバーすることができるクライオ技法として、クライオSEM法とフリーズ・レプリカTEM法の評価例を紹介し、さらに、レプリカ法を常温の固体材料に応用させた、表面レプリカ法の新たな展開についても紹介します。

産総研は、「社会課題解決に必要なものづくり」に役立てられるように、「クライオ技法」の技術向上と共に、技術の普及にも力を入れています。

1 クライオSEM法

数百マイクロメートルから百ナノメートル程度までの構造体の観察に適しており、例えば、エマルジョンの観察や水中に分散化したナノファイバーのネットワークの様子を把握する目的に利用ができます。

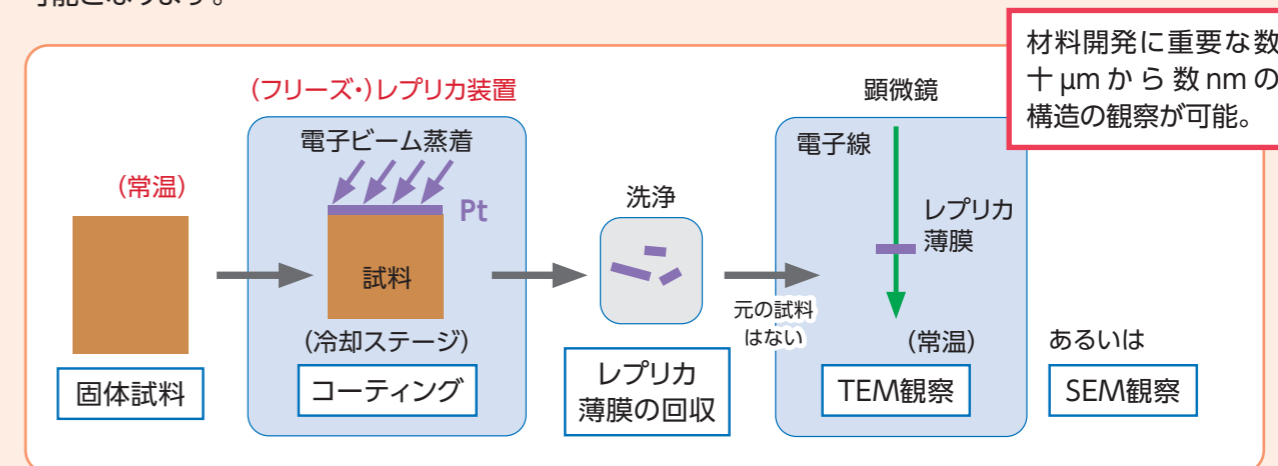
2 フリーズ・レプリカTEM法

数マイクロメートルから数ナノメートル程度までの構造体の観察に適しており、例えば、界面活性剤の分子集合体(ミセル)の形状観察や水中のナノファイバーの繊維径を評価することができます。

3 表面レプリカ法

フリーズ・レプリカ法をこれまでのように凍結試料に用いるのではなく、常温で固体の材料の評価目的に応用したのが、表面レプリカ法です。この手法により、軟材料の表面のわずかな凹凸(数ナノメートル程度)を画像化することが可能になり、例えば、電気自動車(EV)など省エネに必須な軽量複合材料の接着構造の解析に使うことができます。

また、環境プラスチック分野でもPETボトルなど高分子材料の生分解について、鮮明な構造観察が可能となります。



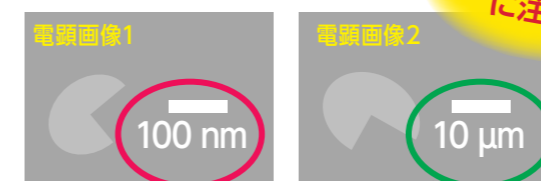
表面レプリカ法の工程

常温試料にコーティングをし、試料を除去してレプリカ膜のみを常温で観察。

評価例の見どころ

◎ ナノメートル・サイズの分解能。

どの画像も同じような大きさに感じられがちですが、



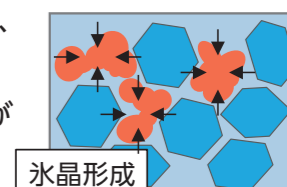
大きさに100倍の違い! ということも。

材料を見る解像度がアップ。

評価例の見どころ

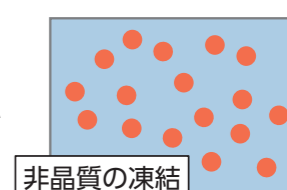
◎ 氷晶の影響のない観察。

水を含む試料が凍ると、氷晶の粒ができて、試料に凝集や変形が起こります。

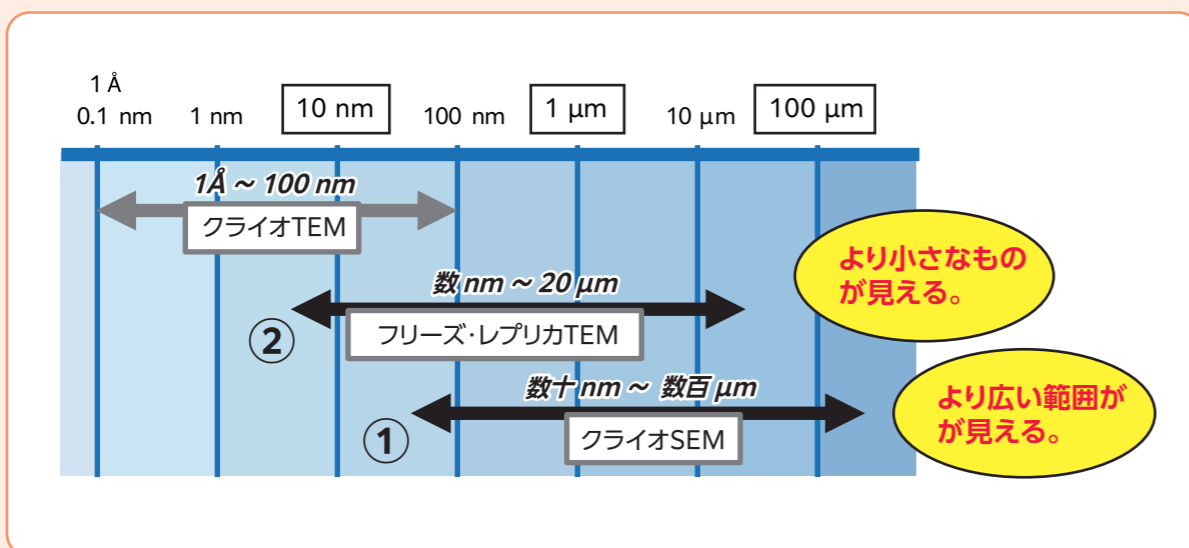


× 凍結障害を観察

氷晶を形成させない急速凍結によって、試料の分散状態や形を維持して観察ができます。



浸漬凍結法、金属接触凍結法、加圧凍結法



クライオ技法で観察が可能なサイズ領域

①クライオSEMおよび②フリーズ・レプリカTEMにより、材料開発研究に重要な数十 μm から数 nm の構造の観察が可能となる。

ナノ粒子と微細気泡の分散液 マイクロプラスチックの可視化解析も可能

液中素材

フリーズ・レプリカTEM

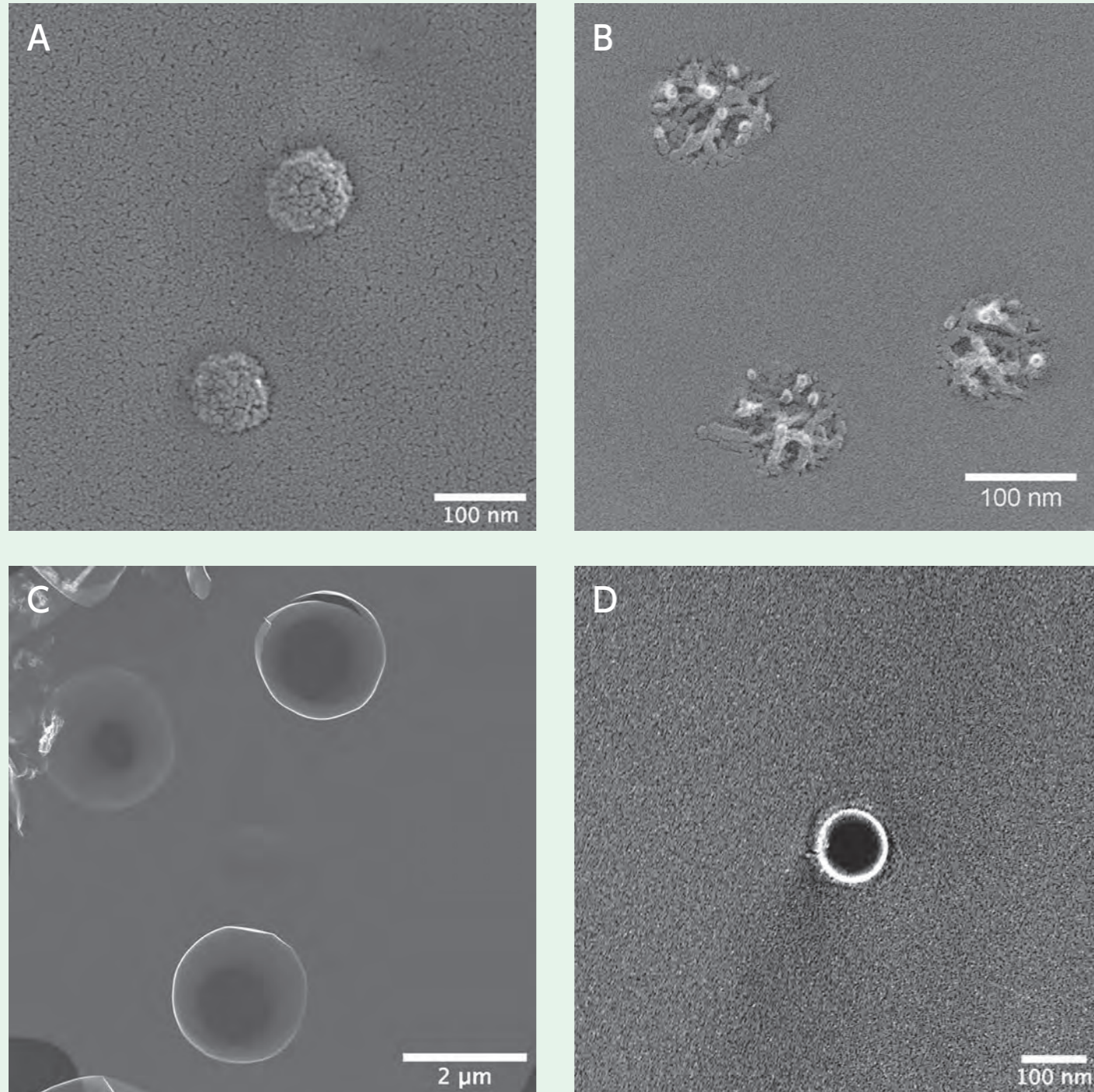


図1. ナノ粒子と微細気泡をフリーズ・レプリカTEMで観察した画像例。
A) 標準粒子(シリカ・ナノ粒子、粒径100 nm)の分散液の画像。B) 標準ナノ粒子(ポリスチレンラテックス粒子、粒径120 nm)の分散液の画像。C) マイクロ・バブル(超音波診断用造影剤、注射用ペルフルブタン)の画像。D) ウルトラファイン・バブル(IDECC株式会社提供、超高濃度試料)の画像。

水中に浮遊のナノ粒子、マイクロ・バブル、ウルトラファイン・バブルを可視化。 マイクロプラスチックの分析によって環境問題の解決を。

ナノ粒子の分散状態を、フリーズ・レプリカTEMで観察ができます。図1 Aと図1 Bは標準ナノ粒子のシリカ・ナノ粒子(直径100 nm)とポリスチレンラテックス(PSL)のナノ粒子(直径120 nm)の観察例です。100 nm程度の微粒子が、周囲の水領域の凍結断面上に単分散している様子が、確認できました。

シリカ・ナノ粒子は割断されずに球状を保っており、水領域の断面上で凸の構造体として観察されました(図1 A、および図2 A)。粒子の凸面はザラザラとしており、シリカの多孔質の様子がわかりました。

PSL粒子の場合は、割断によって粒子内部が露出され、樹脂の微繊維(ナノメートル・サイズ)が固まって粒子ができていた様子がわかりました(図1 B、および図2 B)。

図1 Bの画像は、5 mm以下といわれるマイクロプラスチックが、さらに約4万分の1の120 nmまで細分化しても観察できることを示しており、環境問題解決に役立つ可視化評価の技術として期待されます。

フリーズ・レプリカTEMでは、微細気泡(ファインバブル、直径100 μm未満)も観察できます。マイクロ・バブル(1~100 μm)、およびウルトラファイン・バブル(1 μm未満)の観察例として示した図1 Cおよび図1 Dは、いずれも水中に分散状態の微細気泡を急速凍結で固定化してレプリカ法でTEM観察したものです。

微細気泡は、周囲の水領域の凍結断面上に、マイクロメートル・サイズ、あるいはナノメートル・サイズの凹みとして確認ができます(図1 C、Dおよび図2 C、D)。

文献) "Ultrafine Bubbles" eds: Terasaka, K. et al. Jenny Stanford Publishing. Sep. 2021. ISBN: 9789814877596

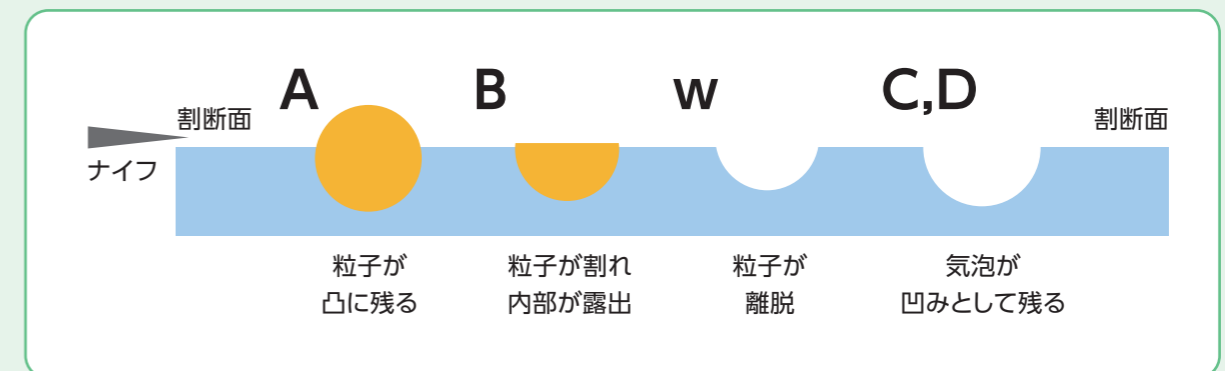


図2. ナノ粒子と微細気泡の分散液が凍結割断された様子の模式図。
A) 粒子が割断されず、水領域の断面上に凸に残るケース。B) 粒子が水領域と一緒に割断され、粒子の内部が露出するケース。W) 粒子が割断の際に離脱し、水領域の断面上に凹みが残るケース。C, D) 気泡が割断されて、水領域の断面上に凹みとして残るケース。

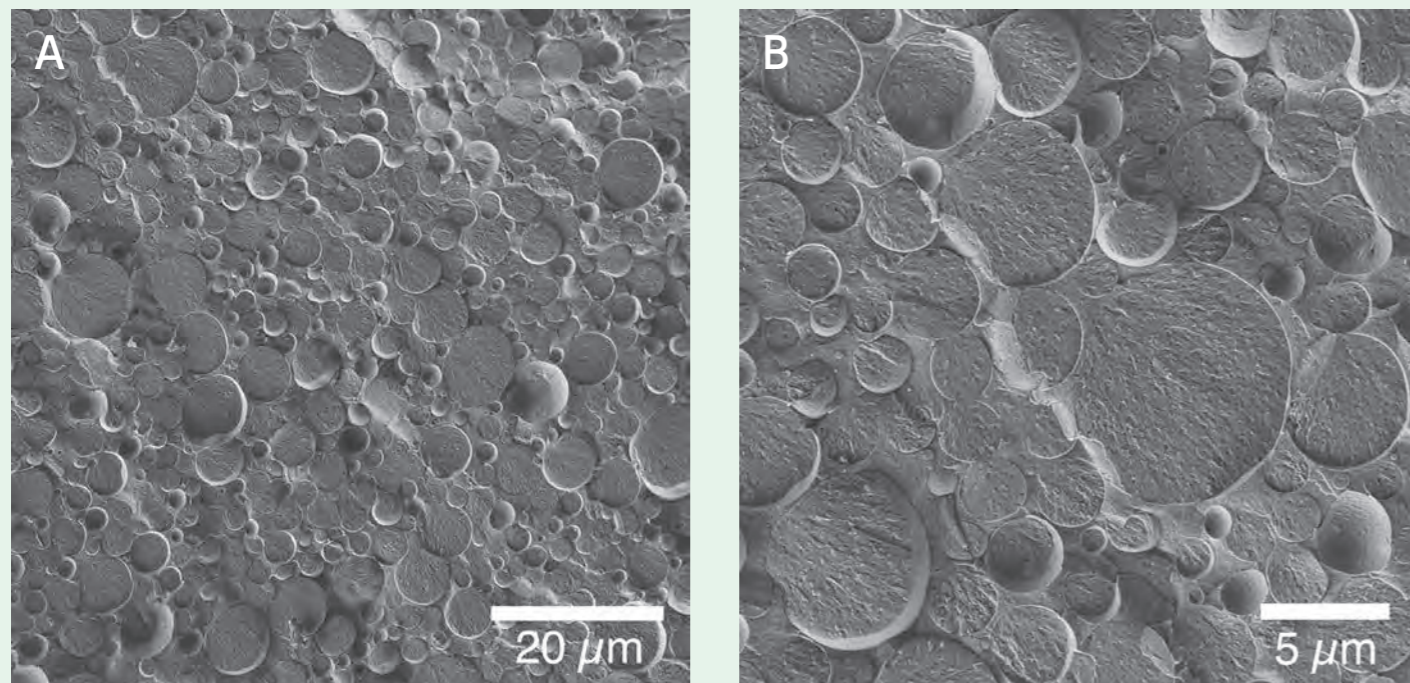
食品の微細構造解析

マヨネーズ中のエマルジョンと、ラメラ、ナノ微粒子が見える

含液素材

クライオ SEM / フリーズ・レプリカ TEM

クライオ SEM



フリーズ・レプリカ TEM

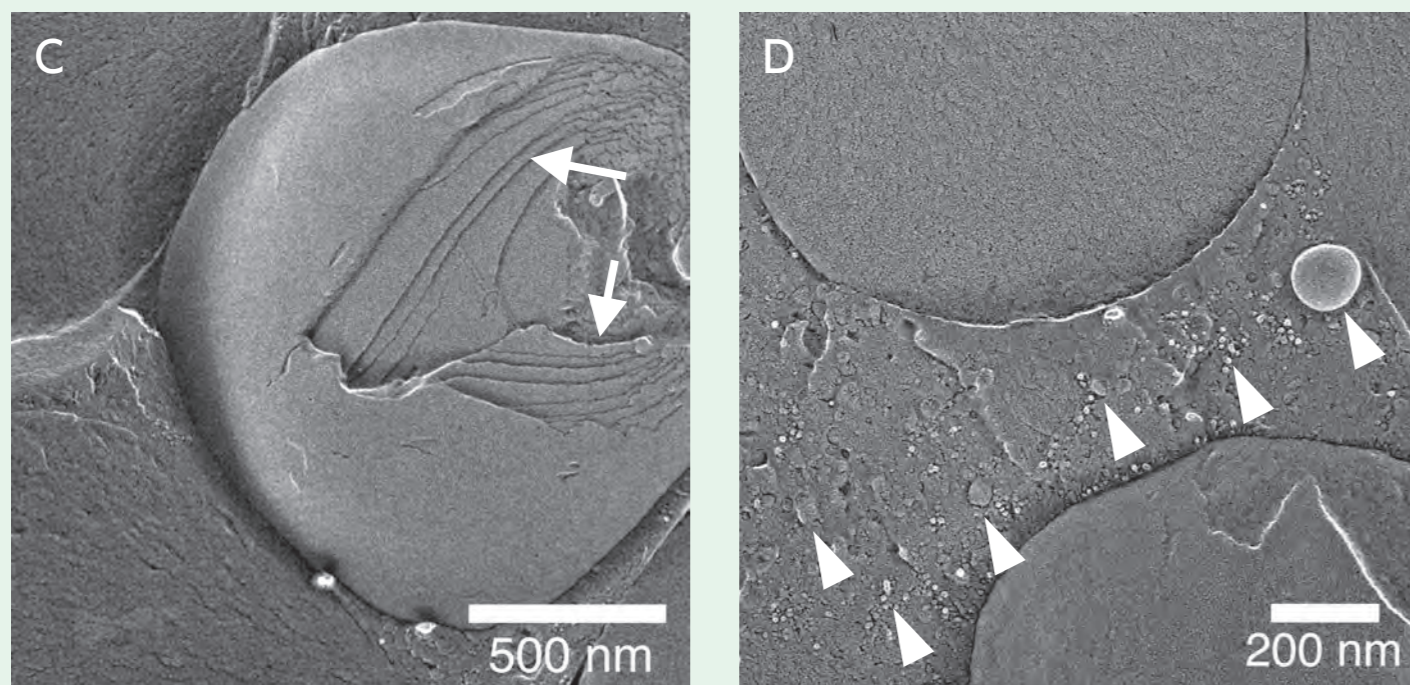


図3. 市販のマヨネーズをクライオSEM、およびフリーズ・レプリカTEMで観察した画像例。

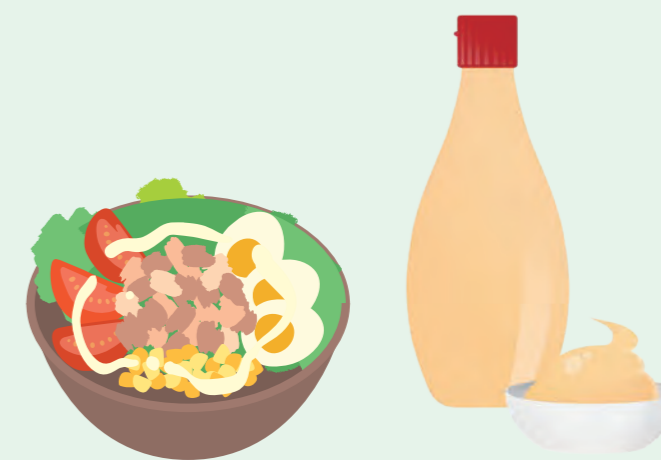
A, B) マヨネーズのクライオSEM画像。マイクロメートル・サイズの球状をしたエマルジョンが多数観察される。C, D) マヨネーズのフリーズ・レプリカTEM画像。エマルジョンの一部にラメラ構造が観察され(Cの矢印)、また、エマルジョンの周辺にはナノメートル・サイズの微粒子(Dの矢頭)が観察される。

クライオSEMで、食品中のエマルジョンが見える。フリーズ・レプリカTEM法では、エマルジョンのラメラ構造やナノ・サイズの微粒子が見える。食品の品質や味覚のメカニズムを解明。

油分や水分の多い食品も、クライオ技法を用いて電子顕微鏡の観察をすることができます。左ページに示した画像は、市販のマヨネーズの観察例です。図3 Aと図3 Bは、クライオSEMによる観察例です。多数の球状のエマルジョンが詰まっている様子が見られました。ほとんどのエマルジョンの直径は、マイクロメートル・サイズであることがわかりました。

図3 Cと図3 Dは、フリーズ・レプリカTEMによる観察例です。エマルジョン像をさらに拡大することが可能で、ラメラ構造を持つものが含まれることもわかりました(図3 C)。エマルジョンの間隙の空間は、これまで顧みられなかったかもしれませんが、フリーズ・レプリカTEMの画像では、ナノメートル・サイズの微粒子が多数存在している様子が見られます(図3 D)。これらは、水溶性のタンパク質成分などが可視化されたものと考えられます。

食品の品質や味覚を、食品成分のマイクロメートルやナノメートルの構造と、関連付けしてメカニズムを考えることにより、新規製品の開発を促進できるかもしれません。



アイスクリームの微小領域の構造解析

アイスクリームの中の氷粒子と、気泡、脂肪球、カゼイン・ミセル

含液素材

クライオSEM / フリーズ・レプリカTEM

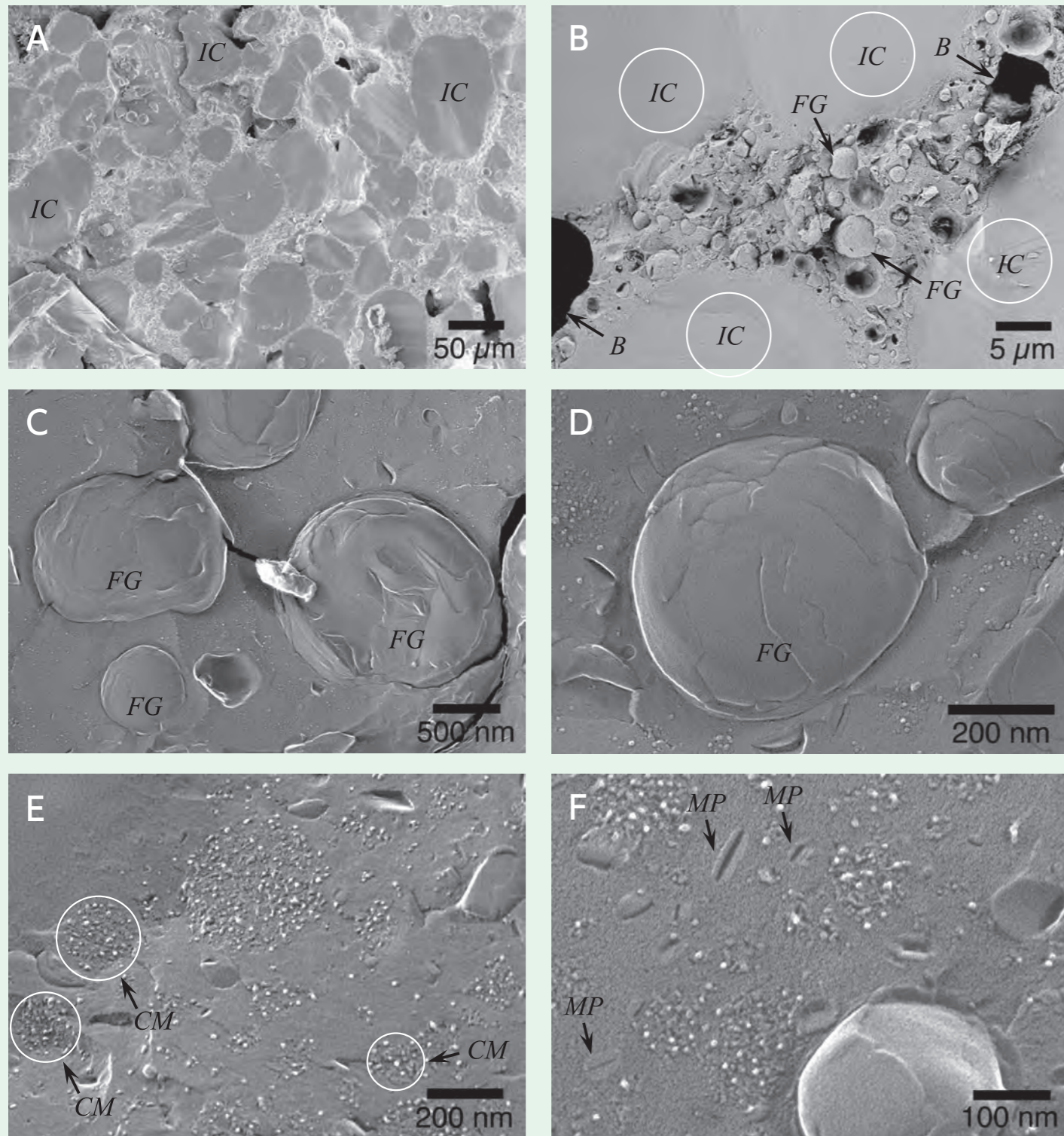


図4. アイスクリーム試作品をクライオSEM、およびフリーズ・レプリカTEMで観察した画像例。

A, B) アイスクリームのクライオSEM画像。大きさ数十μmでカドの取れた氷粒子(IC)が多数観察される(A)。氷粒子と氷粒子の間に脂肪球(FG)や気泡(B)が観察される。C-F) アイスクリームのフリーズ・レプリカTEM画像。脂肪球(FG)をさらに拡大して観察ができる(C, D)。脂肪球と脂肪球の間に、大きさ100 nm前後のカゼイン・ミセルが観察される(E)。カゼイン・ミセルの周辺に、数十nmのミセル粒子(MP)が観察される。

食感・味覚と構造の相関。

食品の科学に貢献し、新しい食品を開発。

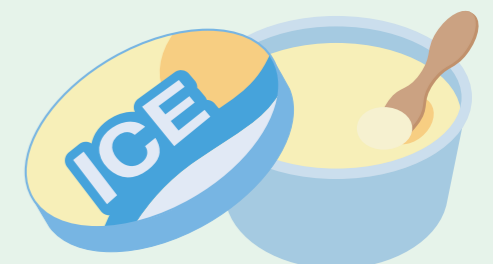
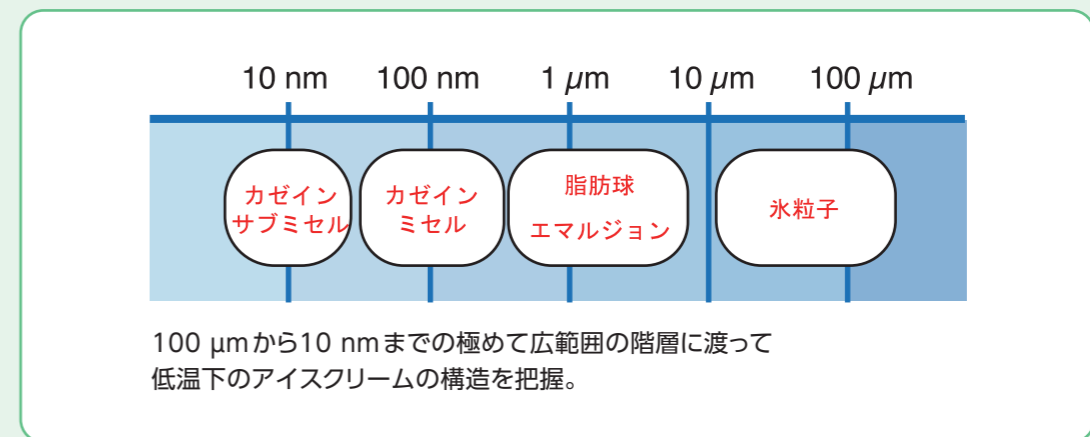
アイスクリームは-25~-30℃の低温化の凍った状態で保管されており、その微細構造の解析は低温化でなければ、実施することができません。低温でのサンプル処理に基づいているクライオSEMやフリーズ・レプリカTEMによる観察は、アイスクリームなどの氷菓の構造評価に適しています。

左ページの画像例(図4)は、三重県工業研究所の佐合徹主査研究員との連携で、「凍ったまま」のアイスクリームの試作品について、クライオSEMとフリーズ・レプリカTEMによる構造評価を行なった結果です。

クライオSEM観察では、アイスクリーム中に多数の氷粒子(ice crystals)が観察されました(図4 A, IC)。氷粒子の大きさは数十μmで、カドに丸みのある形状をしている特徴がありました。また、クライオSEMでは、氷粒子と氷粒子の間に脂肪球(Fat Globules)や気泡(Bubbles)を観察することができました(図4 A, FGおよびB)。

フリーズ・レプリカTEMではクライオSEMよりも倍率の高い観察が可能なので、アイスクリーム中の脂肪球をさらに拡大して見ることができました(図4 C, D, FG)。カゼイン・ミセルが脂肪球と脂肪球の間に散在している様子もわかりました(図4 E, CM)。カゼイン・ミセル(Casein Micelles)は大きさ100 nm前後の球状の構造体で、10ナノメートル程度の微粒子(カゼイン・サブミセル)がたくさん集合してできています。カゼイン・ミセルとは別に、より小さい数十nmのミセル粒子(Micelle Particles)も観察されています(図4 F, MP)。

アイスクリームの製造技術と品質や味覚の知見に、アイスクリーム中の微小構造に関する情報が追加されることによって、新しい発想の商品開発の糸口となるものと期待されます。



エマルジョン化粧品料の微細構造解析 ラメラ構造を安定化させる処方技術の開発

含液素材

フリーズ・レプリカ TEM

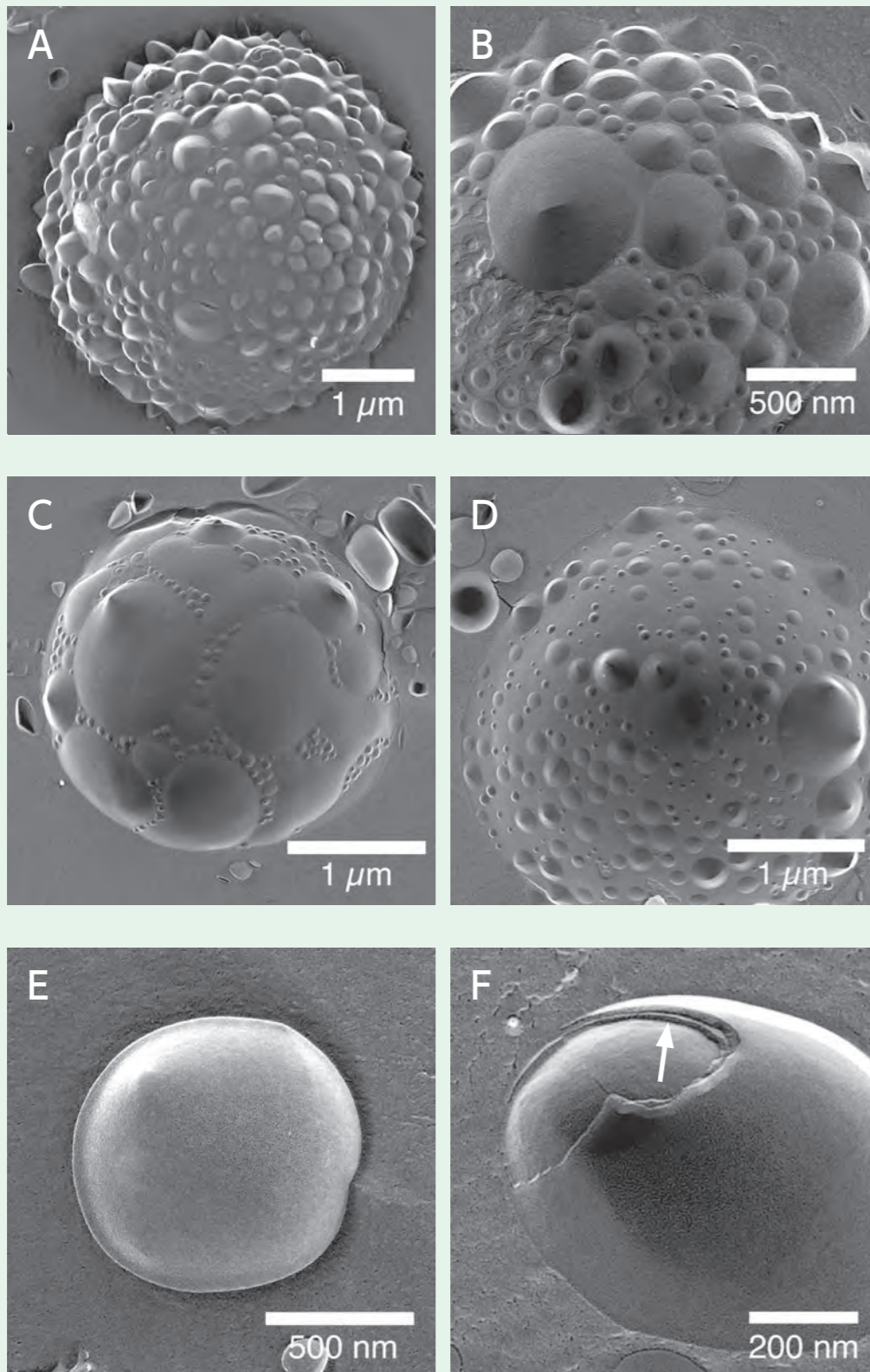


図5. 化粧品素材に加水分解セリシンを添加した場合のエマルジョンの形状変化を、フリーズ・レプリカTEMで観察した画像例。
A, B) 化粧品素材の油状混合物(ステロール脂肪酸エステルとレシチン)のエマルジョンの画像。表面に多数の突起が観察された。
C, D) 混合物に加水分解セリシン(ピュアセリシン™)を添加した際(企業が開発した配合の1/2量)の画像。突起の緩和が見られた。
E, F) 加水分解セリシンを添加した際(企業が開発した配合量)のエマルジョンの画像。表面の突起が消失するとともに(E)、ラメラ構造の形成が確認された(F、矢印)。

素材の化粧品への効果を、微細構造の違いから解明。
配合ごとに変化するエマルジョンをコントロールして製品化。

セリシンは絹糸のフィブロイン繊維を覆って保護・強化を行なっているタンパク質であり、機能性素材としての用途が期待されています。セーレン株式会社では、同社が開発した加水分解セリシン(試薬名:ピュアセリシン™)の応用技術開発に取り組み、その結果、加水分解セリシンがラメラ液晶エマルジョンを形成する可能性を見出しました。

加水分解セリシンがエマルジョンの構造に与える効果を、ナノレベルで明らかにすることを目的にして、同社と産業技術総合研究所が連携して、フリーズ・レプリカTEMを用いた微細構造解析による評価を行ないました(一部は、ふくい産業支援センターの「産総研シーズ活用可能性試験調査研究支援事業」に基づく)。

加水分解セリシン無配合の油状混合物(レシチンとステロール脂肪酸エステル)におけるエマルジョンでは、表面に多数の突起が観察されました(図5 A, B)。このように際立った形状を持つエマルジョンは、少なくとも化粧品分野では、これまでまったく知られていなかったものと思われます。この油状混合物に、セーレン株式会社が開発した配合の1/2量の加水分解セリシンを添加すると、突起が緩和された様子が観察されました(図5 C, D)。さらに、開発の配合量の加水分解セリシンを添加すると、突起のない滑らかな形状のエマルジョンが観察されました(図5 E)。エマルジョンが切断された部分の様子から、表層の近傍に複数の層が重なったラメラ構造が形成されていることが分かりました(図5 F、矢印)。これら観察の比較によって、加水分解セリシンにはエマルジョンに対してラメラ構造を安定化させる、顕著な効果があることが明らかになりました。

本評価試験で得た知見も考慮に加え、セーレン株式会社では天然成分の加水分解セリシンによってラメラ形成を促す新成分を完成し、これを配合した化粧品を製品化、市販しています。

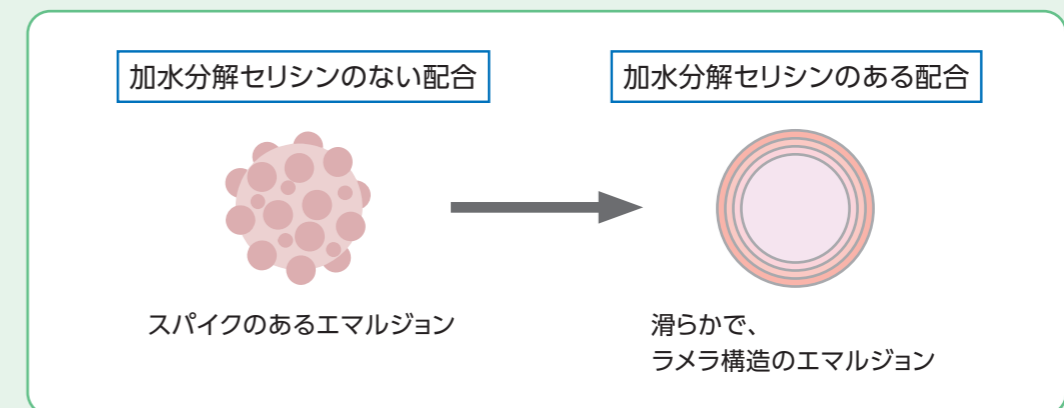


図6. 加水分解セリシンの添加がない場合(左)とある場合(右)のエマルジョンの模式図。

イソステアリルグリセリルの液晶相 薬剤の浸透を促進する担体の構造を設計

含液素材

フリーズ・レプリカ TEM

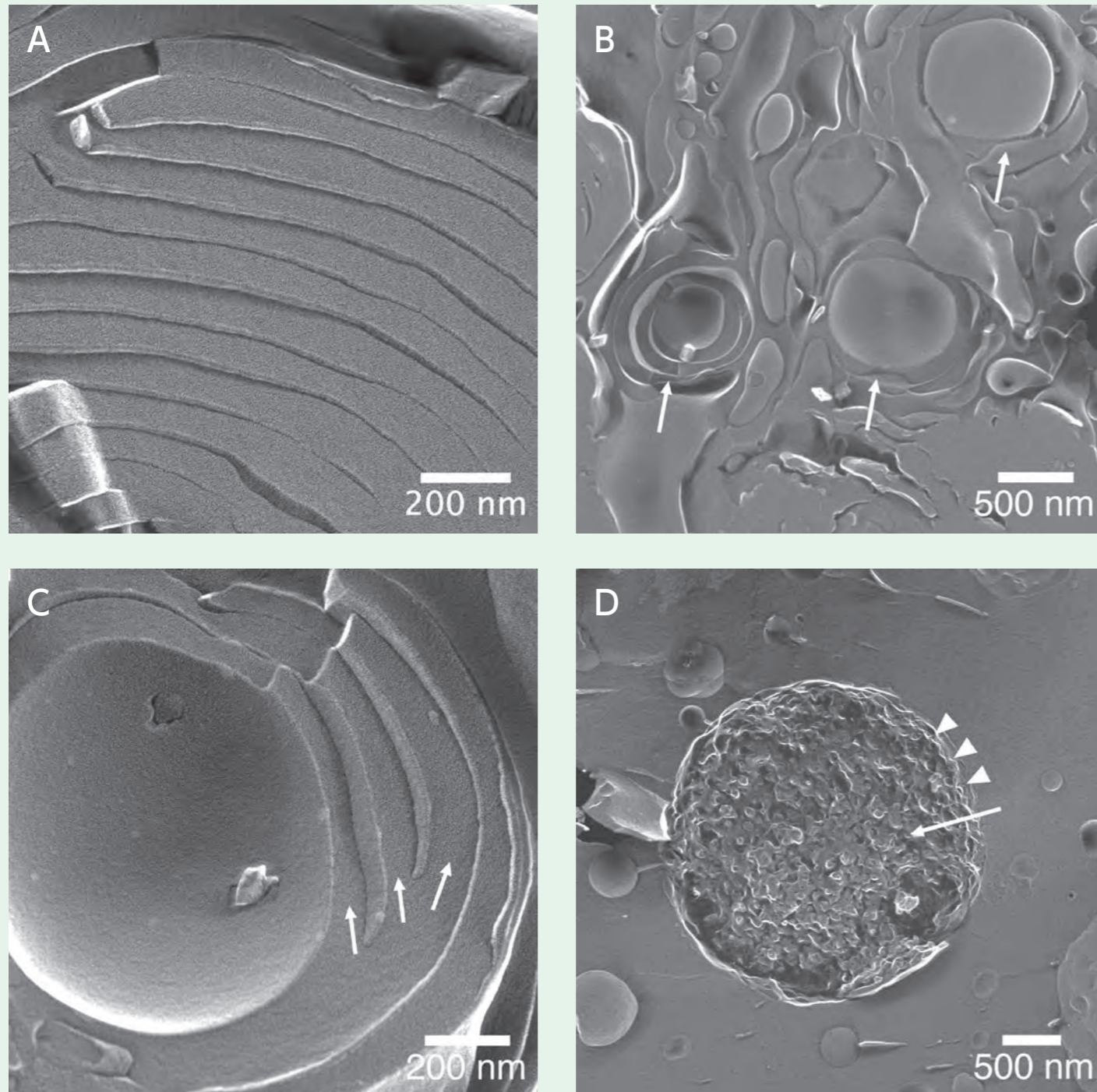


図7. イソステアリルグリセリルを含む[GET / BG / 水]系の液晶を、フリーズ・レプリカTEMで観察した画像例。
A-C) 液晶 GET6BG60の画像例。ラメラ構造が確認され、ラメラ間隔は約70 nmと比類のない長さであった(A)。マルチラメラ・ベシクル(B 矢印)やラメラの分岐(C 矢印)の様子が観察された。D) 液晶 GET6BG20の画像例。シェル(矢頭)によって囲まれたコア(矢印)をもつコアシェル構造の粒子が観察された。

薬剤の皮膚透過を著しく促進する液晶相の形状。 界面活性剤系では比類のない長間隔のラメラ相。

経皮吸収型製剤には多くのメリットがあり、経皮吸収の担体には界面活性剤を応用した固体脂質ナノ粒子、マイクロエマルジョン、ベシクルや液晶などが使われています。これら構造体を持つ変化に富んだ物性が、経皮薬剤送達の促進に役立ちます。

帝京科学大学生命環境学部の佐野友彦教授らは、イソステアリルグリセリル(α -Isostearyl glyceryl ether, GEIS)を用いた擬似3成分系[GET* / BG+ / 水]の液晶

* GEISとポリソルベート60(polysorbate 60)の2:1混合物を、GETと略した。
+ 1,3-ブタンジオール(1,3-butanediol)を、BGと略した。

が、組成比率によって様々な自己集合の状態を示すことに注目し、その構造と薬剤の経皮浸透効果との相関を解析しました。

文献) Sano, T. *et al.* Self-Assembled Structure of α -Isostearyl Glyceryl Ether Affects Skin Permeability - a Lamellar with 70-nm Spaces and L₃ Phase Enhanced the Transdermal Delivery of a Hydrophilic Model Drug. *AAPS PharmSciTech.* 2022, 23, 296.

[GET / BG / 水]系の中でも、二つの組成条件、GET 6% / BG 60% / 水 34%(GET6BG60と略す)とGET 6% / BG 20% / 水 74%(GET6BG20と略す)は、親水性モデル薬剤のアンチピリンの皮膚透過を著しく促進し、それぞれ異なる時間進行の形で効果を表すことが判明しました。GEISの表皮への蓄積量では、GET6BG60の方がGET6BG20より著しく多く、蓄積したGEISが表皮の細胞間脂質と相互作用して、薬剤の経皮送達を促進すると考えられています。

これら特徴的な二種類の組成、GET6BG60とGET6BG20の溶液をフリーズ・レプリカTEMで観察しました(図7)。GET6BG60は、小角/広角 X 線散乱測定(SWAXS)によって約70 nmと間隔の長いラメラ相であるとわかっていましたが、TEM画像で約70 nmのラメラ構造が確認されました(図7 A)。界面活性剤系でこのように間隔が長いラメラ相はかなり珍しくほとんど報告がない事例であり、GET6BG60の構造の特異性を表しています。GET6BG60では、加えてマルチラメラ・ベシクル(図7 B)やラメラの分岐(図7 C)など多様な構造が観察されました。一方、GET6BG20ではラメラ構造は観察されず、L₃相のコアをもつコアシェル粒子が観察されました(図7 D)。

GET6BG60の形状にバラエティが見られることはこの液晶の変形能が高いことを示し、その動的な性質が薬剤の透過促進に貢献していると考えられます。また、GET6BG20がGET6BG60とは全く異なる微細構造を持つことは、両者が薬剤の皮膚透過を促す上で機序の違いに繋がっているものと考えられます。

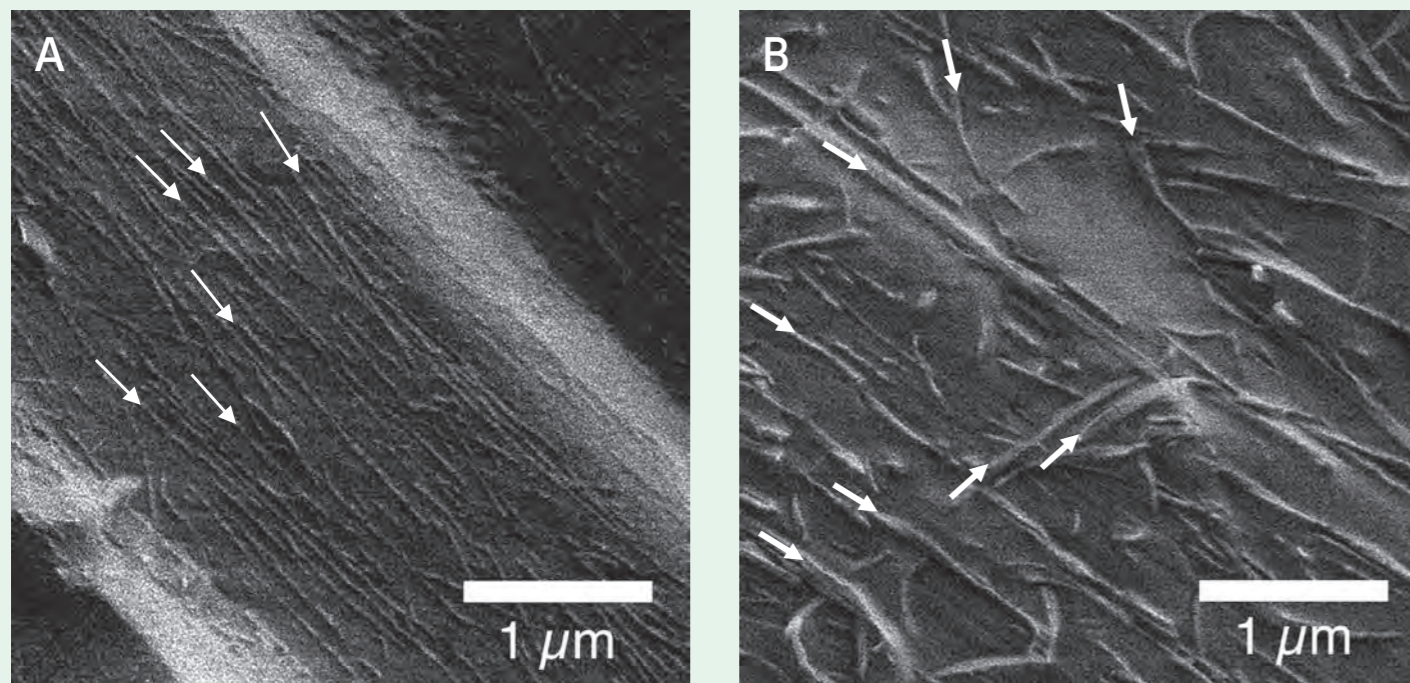
繊維状分子集合体の微細構造解析

アミドアミノオキシド (AAO) 型界面活性剤のミセル構造

含液素材

クライオ SEM / フリーズ・レプリカ TEM

クライオ SEM



フリーズ・レプリカ TEM

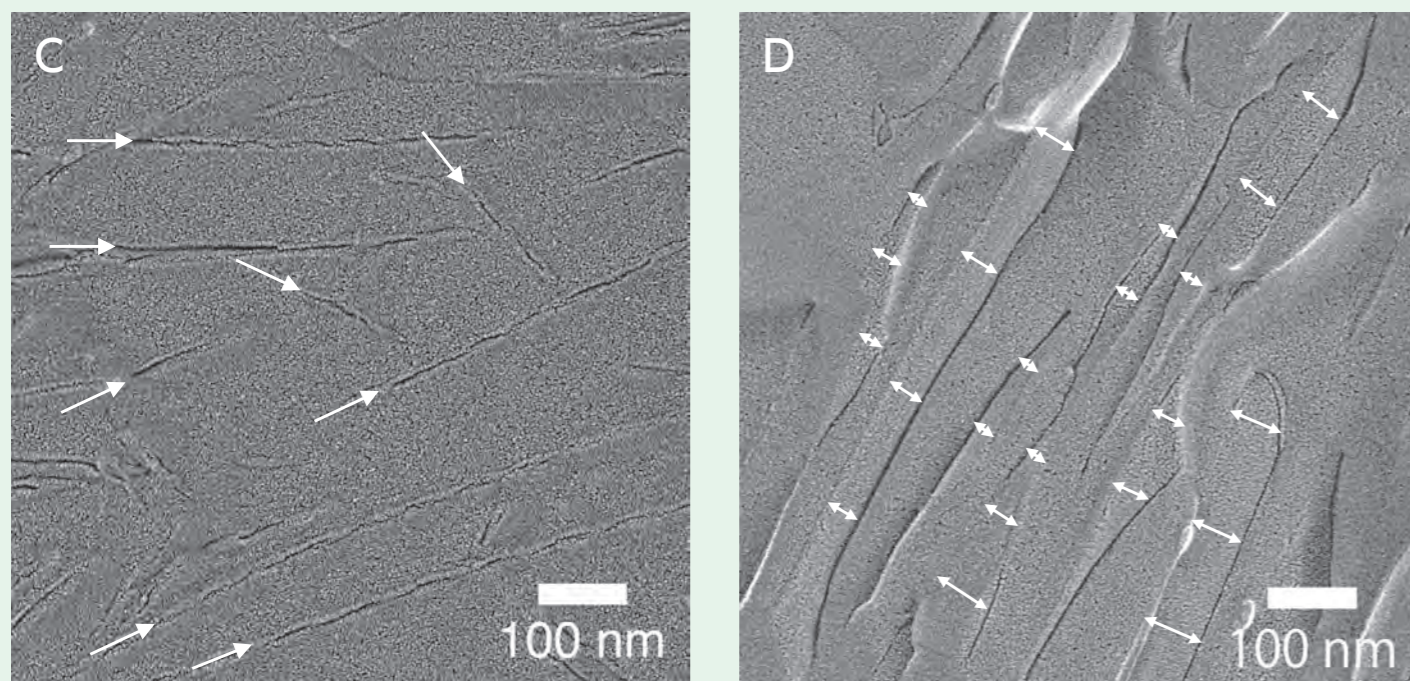


図8. AAO型界面活性剤の分散液をクライオSEM、およびフリーズ・レプリカTEMで観察した画像例。

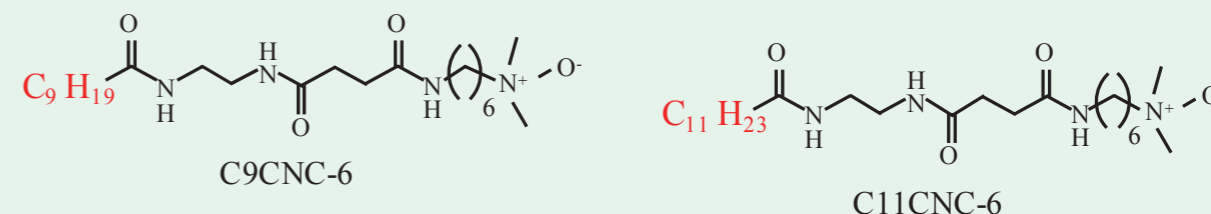
A) 界面活性剤C9CNC-6の分散液をクライオSEMで観察した画像。B) 界面活性剤C11CNC-6の分散液をクライオSEMで観察した画像。C) C9CNC-6分散液をフリーズ・レプリカTEMで観察した画像。D) C9CNC-6分散液をフリーズ・レプリカTEMで観察した画像。

ミセル構造に多形態があることが判明。

界面活性剤、両親媒性化合物の新機能開発を加速。

界面活性剤の分子構造を改変すると、疎水性相互作用や水素結合などの分子間相互作用が変化して、会合体形成に効果が及びます。その結果は、界面活性剤溶液の性質の改良に繋がります。大阪産業技術研究所の懸橋理枝、東海直治両博士は、アミドアミノオキシド (AAO) 型界面活性剤の分子構造を系統的に設計し、ゲル化や増粘挙動の制御を研究しています。開発されたC9CNC-6とC11CNC-6という2種類のAAOは類縁の分子構造ですが、クライオTEMで水溶液を調べた結果では、C9CNC-6はファイバー状、C11CNC-6はリボン状の会合体が形成されると報告しています。

文献) Kakehashi, R. et al. Effects of the spacer length on the aggregate formation and the gelation of alkylamide amine oxides. Colloid Polym. Sci., 2015, 293, 3157-3165.



クライオSEMとフリーズ・レプリカTEMを用いることによって、これらAAO型界面活性剤の会合体の鮮明な画像を得ることができました(図8)。クライオSEMでは(図8 A, B)、C9CNC-6とC11CNC-6のどちらにも繊維状の構造が確認されました。両者の繊維の形状は異なっており、C9CNC-6の繊維は細く直線的でしたが(図8 A、矢印)、C11CNC-6の繊維はより太く、曲がりや捩れも見られました(図8 B、矢印)。フリーズ・レプリカTEMによるさらに高倍率の観察では(図8 C, D)、C9CNC-6の繊維は径が数nmの直線的なファイバー状(ロッド状)であり(図8 C、矢印)、C11CNC-6の繊維は巾が数十nmのリボン状であることがわかりました(図8 D、矢印)。このような会合体の形状データは、界面活性剤の新機能開発の基盤として、今後ますます重要になると考えられます。

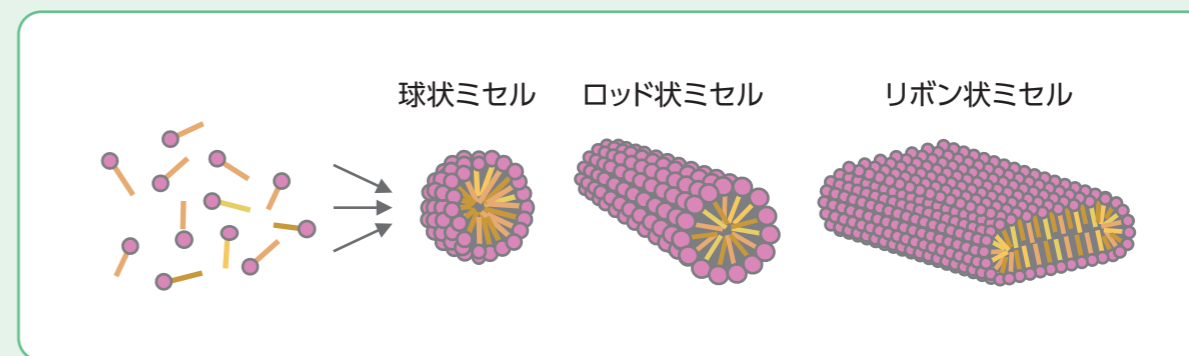


図9. 界面活性剤分子の会合によるミセル構造の模式図。

β-キチン・ナノファイバーのフリーズ・レプリカ 水中でナノファイバーの分散の違いがわかる画像

液中素材

フリーズ・レプリカ TEM

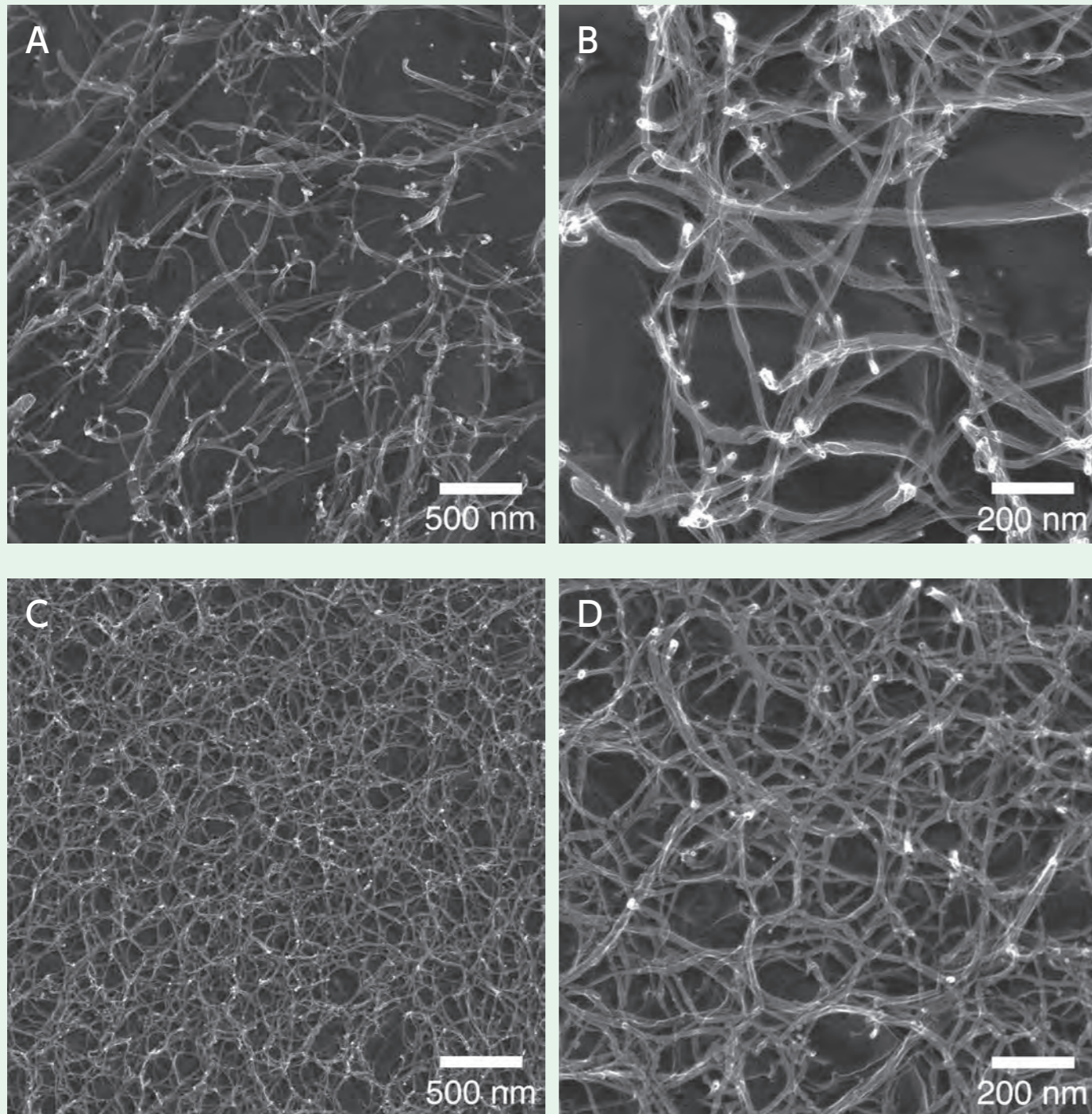


図10. イカの中骨から調製したβ-キチン・ナノファイバーを、フリーズ・レプリカTEMで観察した画像例。
三陸産イカ中骨から得られるβ-キチンを、乾式粉碎とウォータージェット処理によってナノ分散化した。A, B) 前処理が酸→アルカリ処理だった場合には、分散化の結果は径が数十nmの解繊度に留まった。C, D) 一方、前処理がアルカリ→酸処理だった場合には、径が数nmにまで分散化され、より高度にネットワーク化された構造が作製された。

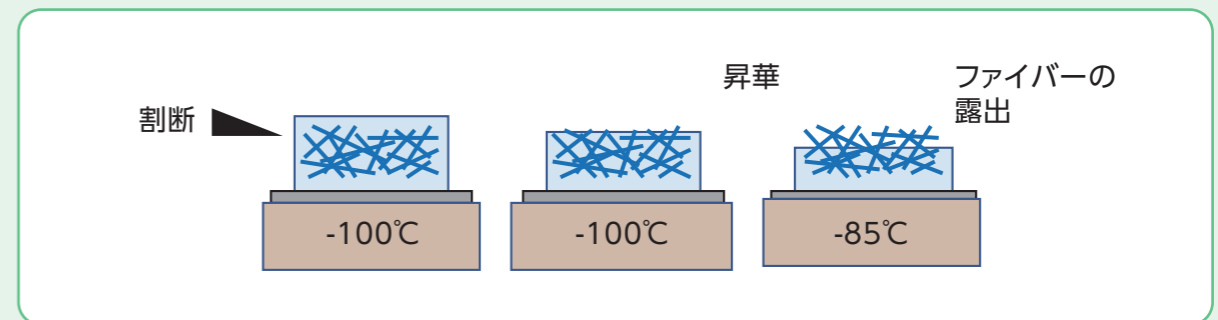
ナノファイバー化した機能性素材の開発に貢献。
ナノファイバーの形成や、ナノファイバーの集合など、
見たことのない反応途中の評価が可能。

イカの中骨は、N-アセチルコリンが多糖化したβ-キチンを多量に含み、機能性素材への可能性を持つバイオマスとして注目されます。一関工専の戸谷一英教授、信州大学の長田光正教授らとヤエガキ醗酵技術株式会社は、三陸産のイカの中骨からβ-キチンを精製(酸処理で脱灰+アルカリ処理で徐蛋白)した後、乾式粉碎と湿式解繊処理(ウォータージェット処理)によって、β-キチン・ナノファイバーの作製方法を検討しました。前処理の順番が、酸処理→アルカリ処理の場合とアルカリ処理→酸処理の場合では、得られる分散液の物性(透明度、粘性など)が異なることがわかりました。

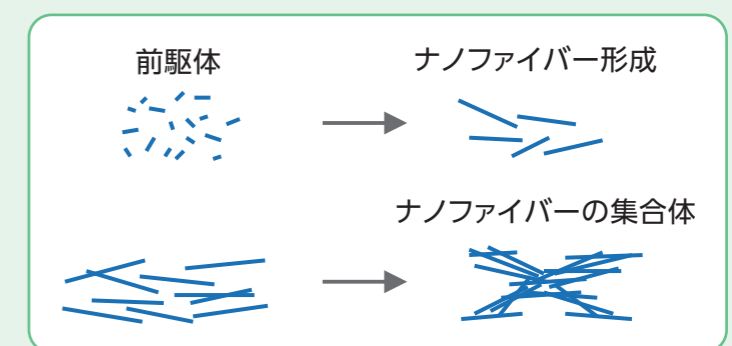
これら2条件の試料液の分散状態を、フリーズ・レプリカTEMで可視化して評価しました。順番が酸処理→アルカリ処理の場合は、β-キチン・ナノファイバーの径が数十nmに留まっている様子が観察されました(図10 A, B)。ところが、アルカリ→酸処理の順番では、径が数nmのナノファイバーが作製されており、ゲル化状態の高度なネットワークが確認されました(図10 C, D)。効率よくβ-キチン・ナノファイバーを作製する方法が明らかになりました。本評価試験の知見も考慮に加え、非アレルギー性β-キチン・ナノファイバーとして製品化されています。

文献) Suenaga, S. et al. Effect of purification method of β-chitin from squid pen on the properties of β-chitin nanofibers. Int J Bio Macromol. 2016, 91, 987-993.

ここに紹介したフリーズ・レプリカTEM観察では、凍結切断した試料に対してさらに水分の昇華をさせ、切断面より下に埋まっていたナノファイバーを露出させてから、レプリカ膜の作製をしています(フリーズ・フラクチャー・ディープ・エッチング法)。



ナノファイバーを本方法で可視化することにより、ナノファイバーが形成される反応途中の様子や、ナノファイバーが集合体を形成する様子など、動的な変化の過程を調べることもできます。



柑橘由来セルロースナノファイバーのフリーズ・レプリカ 乳化の効果を画像で評価

液中素材

フリーズ・レプリカ TEM

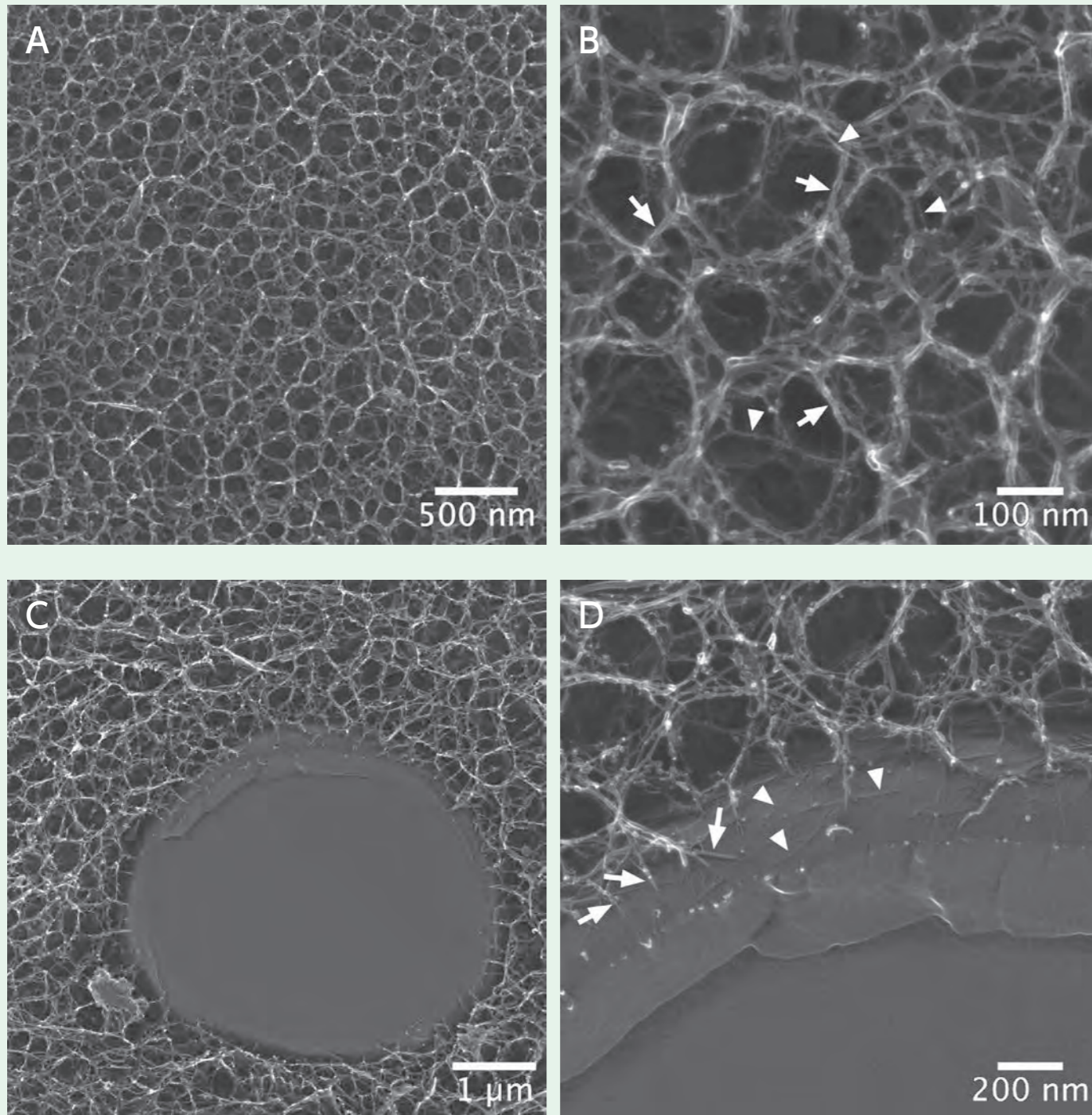


図11. イヨカンの果皮から調製したセルロースナノファイバー(CNF)を、フリーズ・レプリカTEMで観察した画像例。
A, B) イヨカンCNFの分散液の画像例。約10 nm程度のナノファイバー(B 矢印)と、10 nmよりも細いナノファイバー(B 矢頭)の二種類が、絡み合っ網目を構成していた。C, D) イヨカンCNFを乳化処理した素材の画像例。ナノファイバーがエマルジョン粒子に結合する様子(D 矢印)や、エマルジョン粒子の表面上に展開する様子(D 矢頭)がわかる。

ナノファイバー化した機能性素材の開発に貢献。
乳化のために添加した油分のエマルジョンに、
ナノファイバーが結合する様子を、構造解析によって評価。

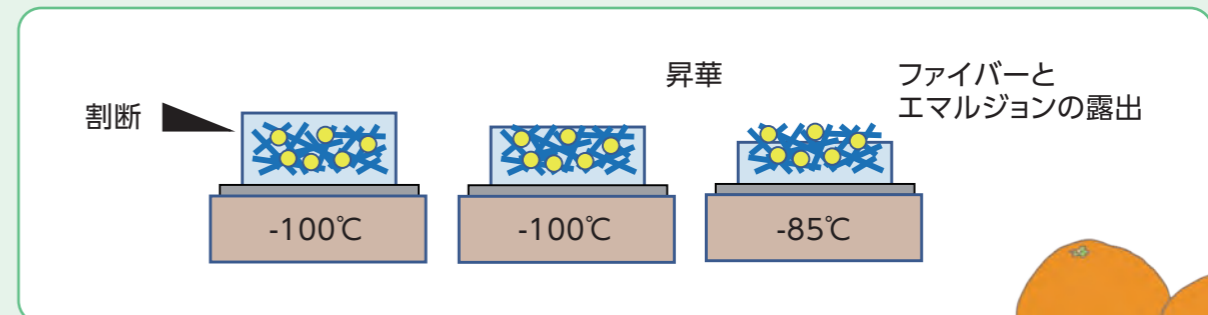
セルロースナノファイバー(CNF)は、植物繊維由来のセルロースを高度にナノ化することによって得られる新素材です。豊富なバイオマス資源から製造され環境負荷が小さく、軽さ、強度、高い弾性率などの長所が注目されています。新規機能性素材への応用開発や、製造プロセスの効率化、製造コスト削減の努力などが活発に進められており、新規な用途の開拓が期待されています。

愛媛製紙株式会社は、柑橘由来のCNFを製造するプロセスの開発を行いました。経済産業省の戦略的基盤技術高度化支援事業(サポイン事業)における産学官連携の実施体制(株式会社アイテック、産業技術総合研究所、愛媛県産業技術研究所、および愛媛大学)のもと、イヨカンを中心とした柑橘の果皮から有用なCNFを得るユニークな技術が実現されました。

イヨカンCNFは分散性が良く繊維幅が細いと考えられています。ペースト状の素材の中における分散状態を詳しく確かめるためには、フリーズ・レプリカTEMの観察が役に立ちます(図11 A, B)。まず、ナノファイバーの分散化は、均一な網目のパターンになっていることがわかりました(図11 A)。高倍率の画像では、網目が二種類の直径のナノファイバーから構成されていて、約10 nm程度のナノファイバー(図11 B 矢印)と、10 nmよりも細いナノファイバー(図11 B 矢頭)が絡み合っていることがわかりました。

同社では、イヨカンCNFを化粧品素材や食品素材へ応用する目的で、ナノファイバー材料を乳化する技術の検討を行なっています。フリーズ・レプリカTEMの観察では、ナノファイバーだけでなく、乳化に用いられた油分のエマルジョンの形状も同時に観察することができました(図11 C, D)。ナノファイバーがエマルジョン粒子に結合する様子(図11 D 矢印)や、エマルジョン粒子の表面上に展開するナノファイバーの様子(図11 D 矢頭)を捉えることに成功し、乳化のメカニズムを構造から理解することに役立ちました。

ここに紹介したフリーズ・レプリカTEM観察では、凍結切断した試料に対してさらに水分の昇華をさせ、切断面より下に埋まっていたナノファイバーとエマルジョンを露出させてから、レプリカ膜の作製をしています(フリーズ・フラクチャー・ディープ・エッチング法)。



リチウム電池用電極(負極)のクライオSEM観察画像 サイクル試験前後のSEM観察でモルロジー変化を把握

液中素材

クライオSEM

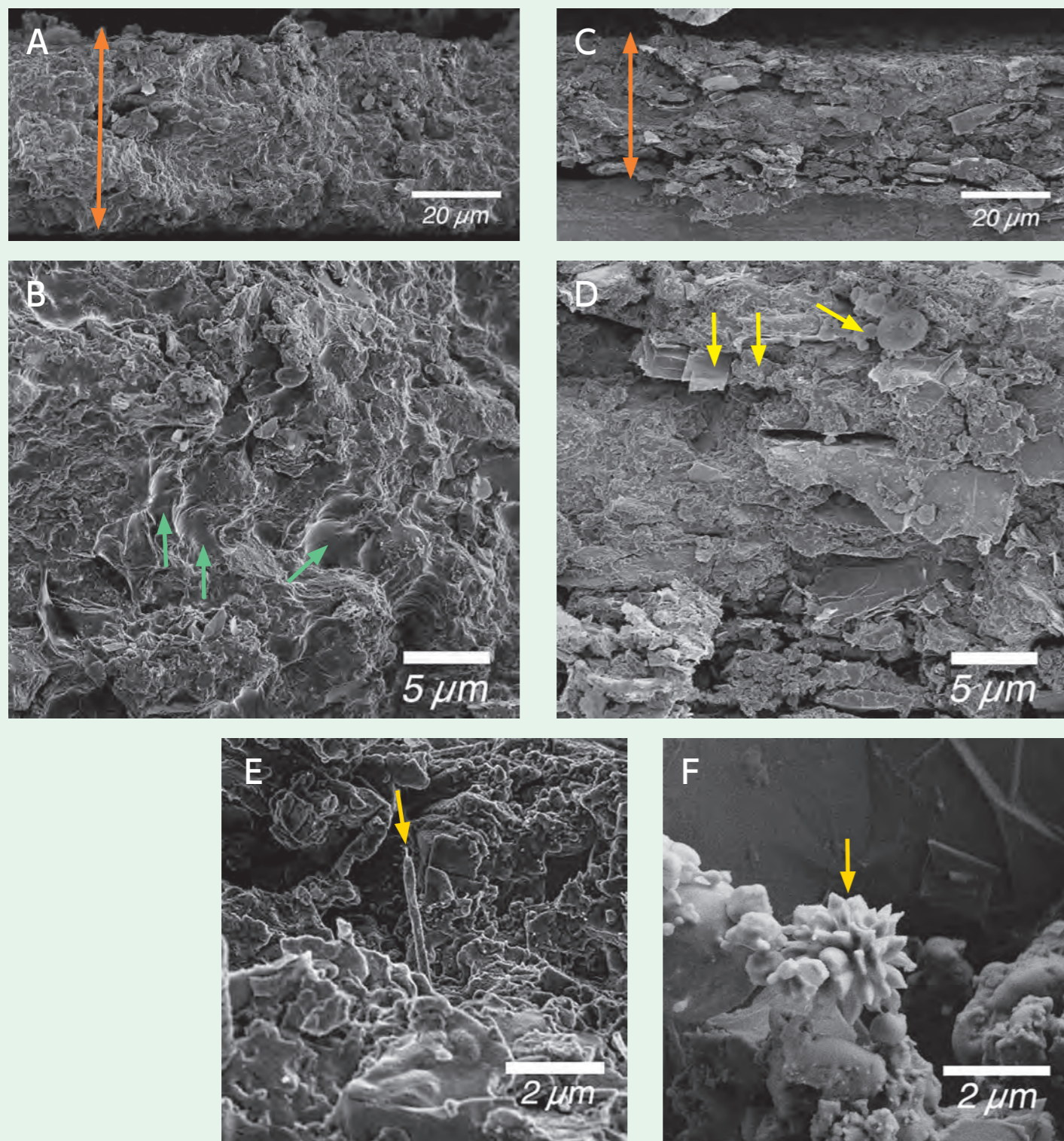


図12. セルに組み込み状態の電極(負極)の形状を、充放電前後で評価した画像例。
A, B) 充放電前の電極のクライオSEM画像の例。C, D) 充放電後(100サイクル)の電極のクライオSEM画像の例。E) 充放電後の電極に見られた初期的なウィスカの構造。F) 充放電後の電極に見られた初期的なデンドライトの構造。

クライオSEM法では試料を凍結状態にして観察し、
負極に形成された ウィスカやデンドライトなどの
微細構造の画像化が可能。

EV普及や完全自動運転システムの構築に向けて、電池の性能向上は必須の課題です。本観察では、民間企業がリチウムイオン電池用に新規に開発したシリコン系負極材料を評価するために、電池に組み込んだ状態の電極をクライオSEMによって形状の評価を行いました。

電池セルの内部のサンプル電極(負極、充放電前)は次のように調べました。スラッシュ窒素(窒素の固液二相流体、 -210°C)にセルを浸漬して迅速凍結した後、凍結状態の電極(負極)を取り出し、低温下(-140°C)で切断して白金によるスパッタ・コーティングをしました。クライオSEMにより、負極材料層の破断面の様子を観察できました(図12 A, B)。倍率を上げた画像では(図12 B)、負極材料層の中の微粒子の様子が観察され、クライオ観察の特性により、微粒子の間に存在する電解液の部分も可視化され、細部まで電解液が浸透していることが確認されました。

同様に、サイクル試験の後の電極についてもクライオSEM観察を行いました(図12 C, D)。電極内に電解液が観察され、細部までの電解液の浸透が維持されていることが確認できました。また、サイクル試験後の観察では、一部に棒状の構造(図12 E)や放射状に枝分かれした構造(図12 F)が確認されました。どちらも充放電前の観察では観察されないため、サイクル試験において発生したものと考えられます。前者は単結晶性のウィスカ(ひげ状結晶)であり、後者は複数方向に結晶成長したデンドライト(樹枝状結晶)と考えられます。撮影された構造はいずれも $2\mu\text{m}$ 程度と微小なサイズの段階であり、電池性能への影響はないと判断されました。これらは空気中では容易に加水分解して観察が困難なため、クライオSEM観察ならではの知見と言えます。



ポリプロピレンの表面処理の効果の評価

表面レプリカ法によるTEM観察でモルロジー変化を把握

軟素材

表面レプリカ法

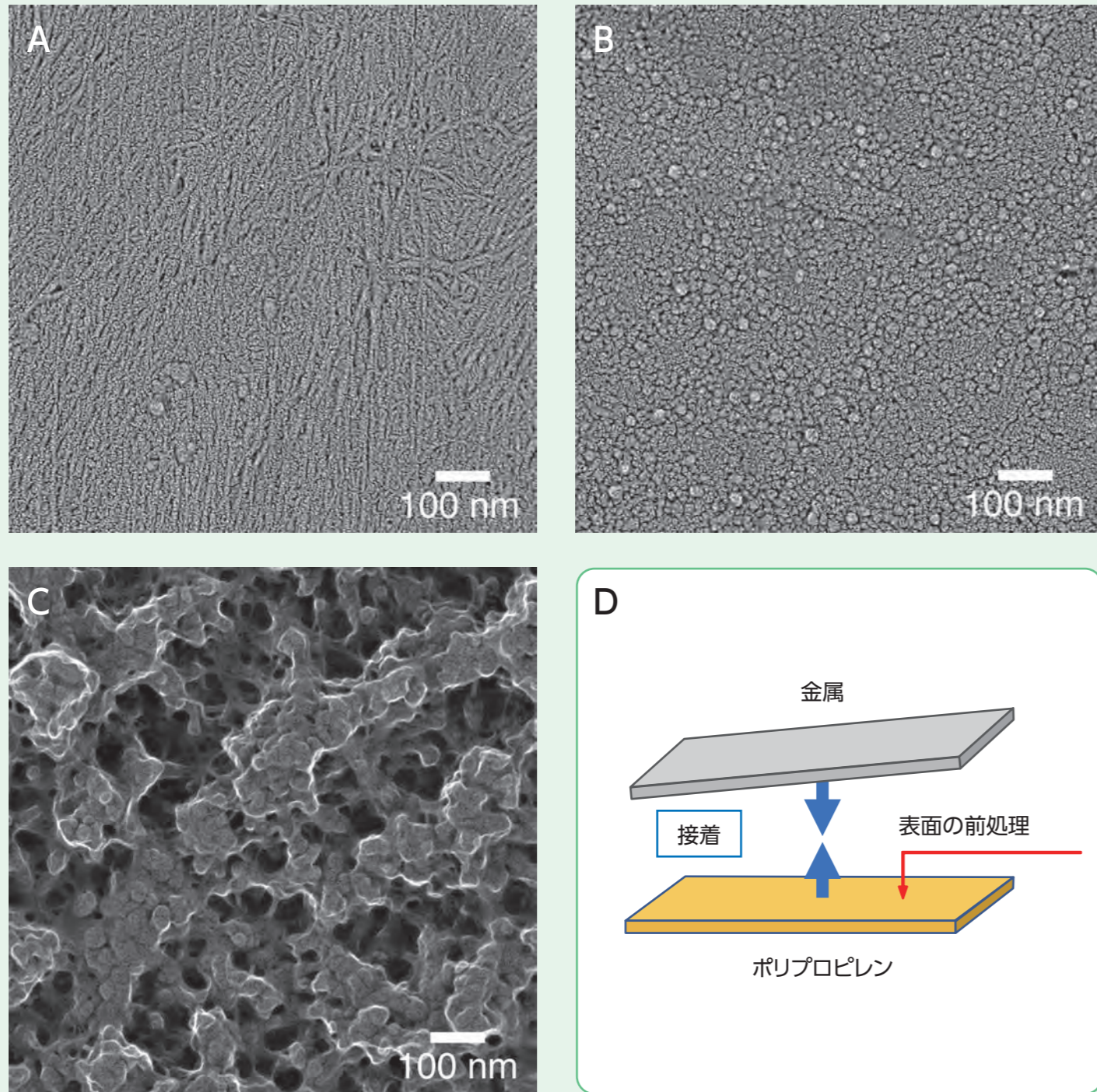


図13. ポリプロピレン(PP)の表面処理に伴う最表面の微細構造の変化を、表面レプリカ法によってTEM観察した画像例。

A) 未処理のPPの表面レプリカ画像の例。ナノサイズの微繊維(直径10 nm程度)が配列している様子が観察される。B) 火炎処理を施したPP表面の表面レプリカ画像の例。Aのような微繊維の配列は見られない。C) プラズマ処理を施した表面レプリカ画像の例。数十nmの凹凸構造が観察された。D) 最表面の形態は、その材料の他材料との接着特性に大きく影響を与えるので、表面レプリカ法から得られる最表面の高分解画像の価値は高い。

軟素材であるポリプロピレンは、表面の観察が難しかったが、表面レプリカ法によりナノ分解能の画像が可能になった。複合材料の接着性増大のメカニズムに貢献。

プラスチックは、細長い高分子が結晶状あるいは非晶状に配列して形づくられます。結晶部分と非晶部分がプラスチック製品の中でどのように混在しているのかは、不明な点が多く、効果的な可視化の方法が必要とされています。しかし、プラスチックは導電性が低く柔軟な性質を持つため、従来は電子顕微鏡による高分解観察を適用するには障壁があると考えられてきました。

産総研ナノ材料研究部門の堀内伸上級主任研究員らが行った図13の観察例では、ポリプロピレン(PP)の表面に白金とカーボン真空蒸着して薄膜を作製し、その表面レプリカ膜をTEMで観察しました。表面レプリカ法では、PPの最表面に存在するわずかな凹凸の形状が、導電性が高く物理的に安定なレプリカ膜に転写されます。この方法によって、PPの最表面の形状の変化を、TEMの高分解観察で評価できるようになり、接着技術への貢献が始まりました。

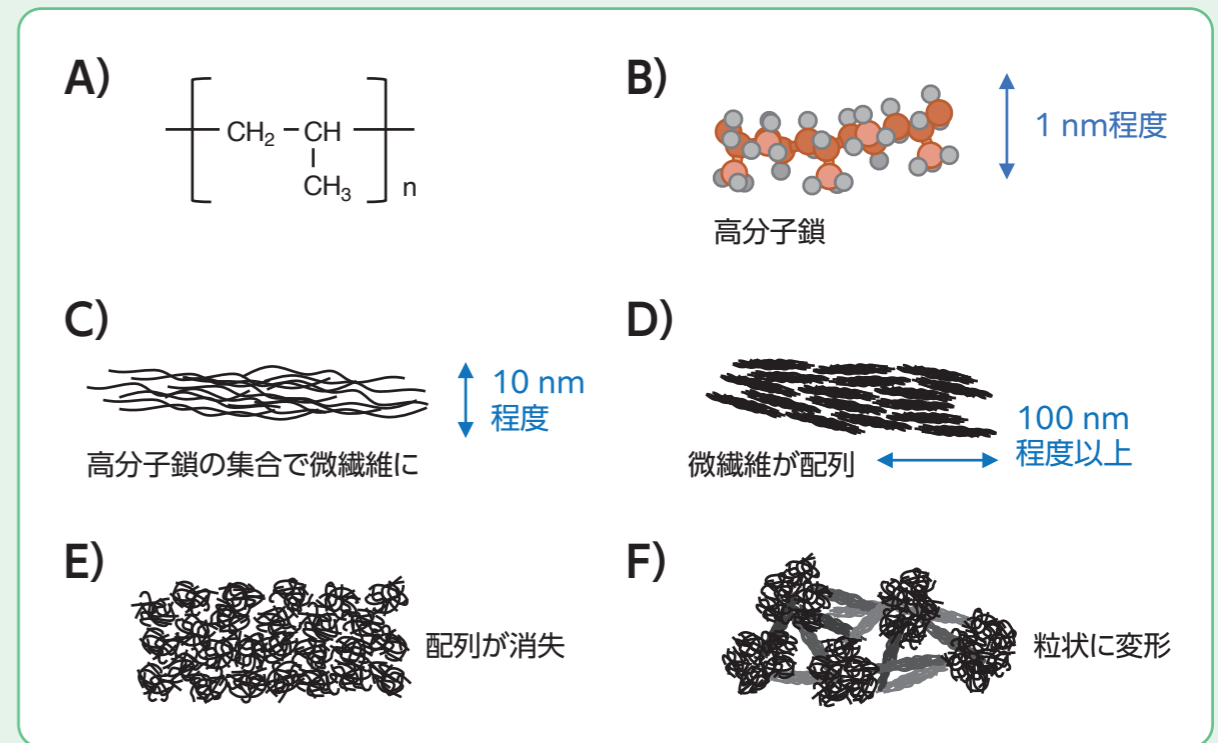


図14. ポリプロピレン(PP)の構造の模式図。

- A) PPの化学式。
- B) PPの分子モデル。
- C) PPの高分子鎖の集合による微繊維の形成の模式図。
- D) PPの表面レプリカで観察された微繊維の配列(図13 A)の模式図。
- E) PPを火炎処理した際の微繊維が消失した状態(図13 B)の模式図。
- F) PPをプラズマ処理した際に観察された粒状の形態(図13 C)の模式図。

複合材料の接着面のTEM観察 プラスチックと金属の接着部の剥離試験

軟素材 表面レプリカ法

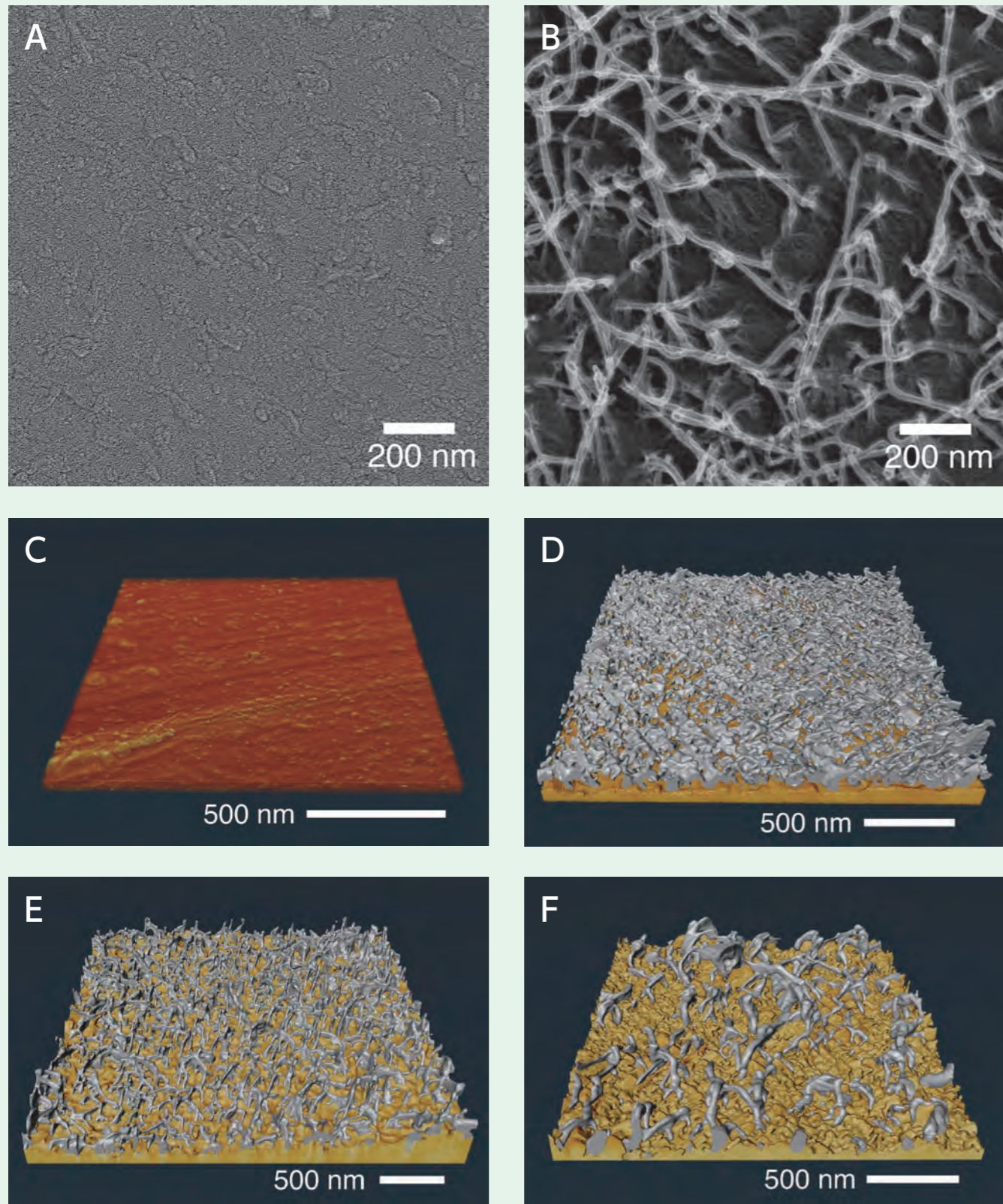


図15. 表面レプリカ法によるTEM観察で得たアルミとポリプロピレン(PP)の接着部剥離試験の画像例。
A) 接着させていないアルミ・シート表面の画像。B) PPシート(PP:PPgMA = 9:1)と接着させた後にPPシートを剥離した際の、アルミ・シート表面の画像。C-F) PP:PPgMA比が異なる4種類のPPシートとアルミ・シートを接着させた後、PPシートを剥離した際のアルミ・シート表面について電子線トモグラフィーを用いて取得した三次元再構成像。

プラスチックと金属の接着の強さの様子を、 接着界面の表面レプリカ観察から調べることができる。

複合材料の接着面を評価する方法として、表面レプリカ法はナノ・サイズの形状の情報をもたらし、接着技術の進歩に貢献することが明らかになりました(図15)。産総研ナノ材料研究部門の堀内伸上級主任研究員らと、接着の剥離試験を次のように行いました。アルミ・シートとポリプロピレン(PP)・シートを加熱圧着して接着させた後に、両者を剥離し、アルミ側の剥離面を表面レプリカ法で観察しました(図16)。接着をしていないアルミ・シートでは、比較的平滑な表面であった(図15 A)のに対して、PPシートと接着させた場合は、アルミ表面に微繊維が観察されました(図15 B)。接着に関与していたPP由来の微繊維が、剥離後もアルミ表面に結合したまま残されたものです。

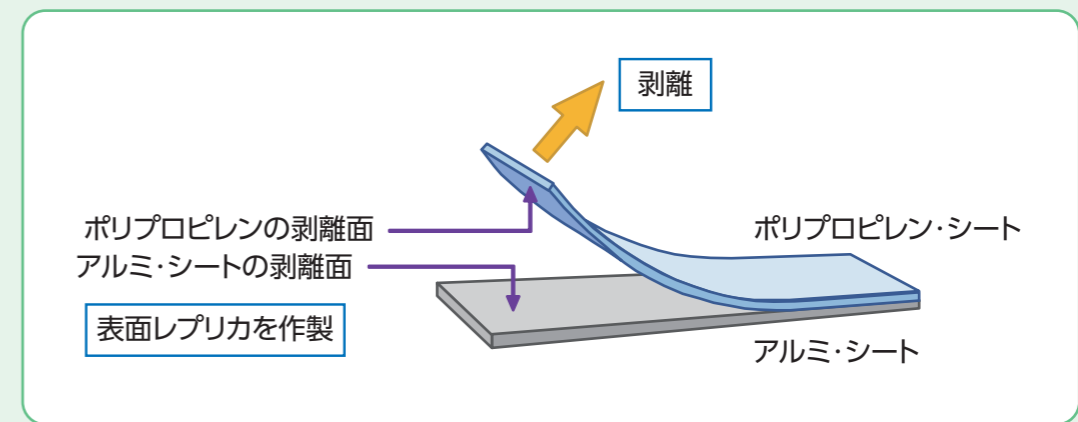


図16. アルミとポリプロピレンの接着部で行った剥離試験の模式図。

PPの接着性は、無水マレイン酸変性PP(PP grafted with maleic anhydride, PPgMA)の添加によって、著しく強くなります。図15 Bの観察は、アイソタクチックPP(isotactic PP, iPP)にPPgMAを9:1の比率で添加したPPシートで行ったものです。PPgMAの比率を変えて接着性の異なるPPの条件で剥離試験を行い、電子線トモグラフィーによって観察した結果を三次元再構成像で表しました(図15 C-F)。

iPPのみでPPgMAのない場合は、アルミ側に微繊維はほとんど残りませんでした(図15 C)。iPP:PPgMA比率が8:2の場合は、微繊維が最も高密度に見られました(図15 D)。PPgMAを増やして、同比率を5:5、および0:10とした場合は(図15 E, F)、比率8:2の場合よりも微繊維の密度は下がりました。微繊維の密度の変化は、接着強度の測定と一致しており、微繊維がアルミ側にアンカーすることが接着の機構であると考えられます。

表面レプリカによる接着界面の解析は、今後もいろいろなタイプの複合材料の接着を評価する手段として期待されます。

文献) Liu, Y. et al. Role of chemical functionality in the adhesion of aluminium and isotactic polypropylene. ACS Appl. Mater. Interfaces, 2021, 13, 11497-11506.

PET ボトルの TEM 観察

表面レプリカ法で見てきた微繊維の形状

軟素材

表面レプリカ法

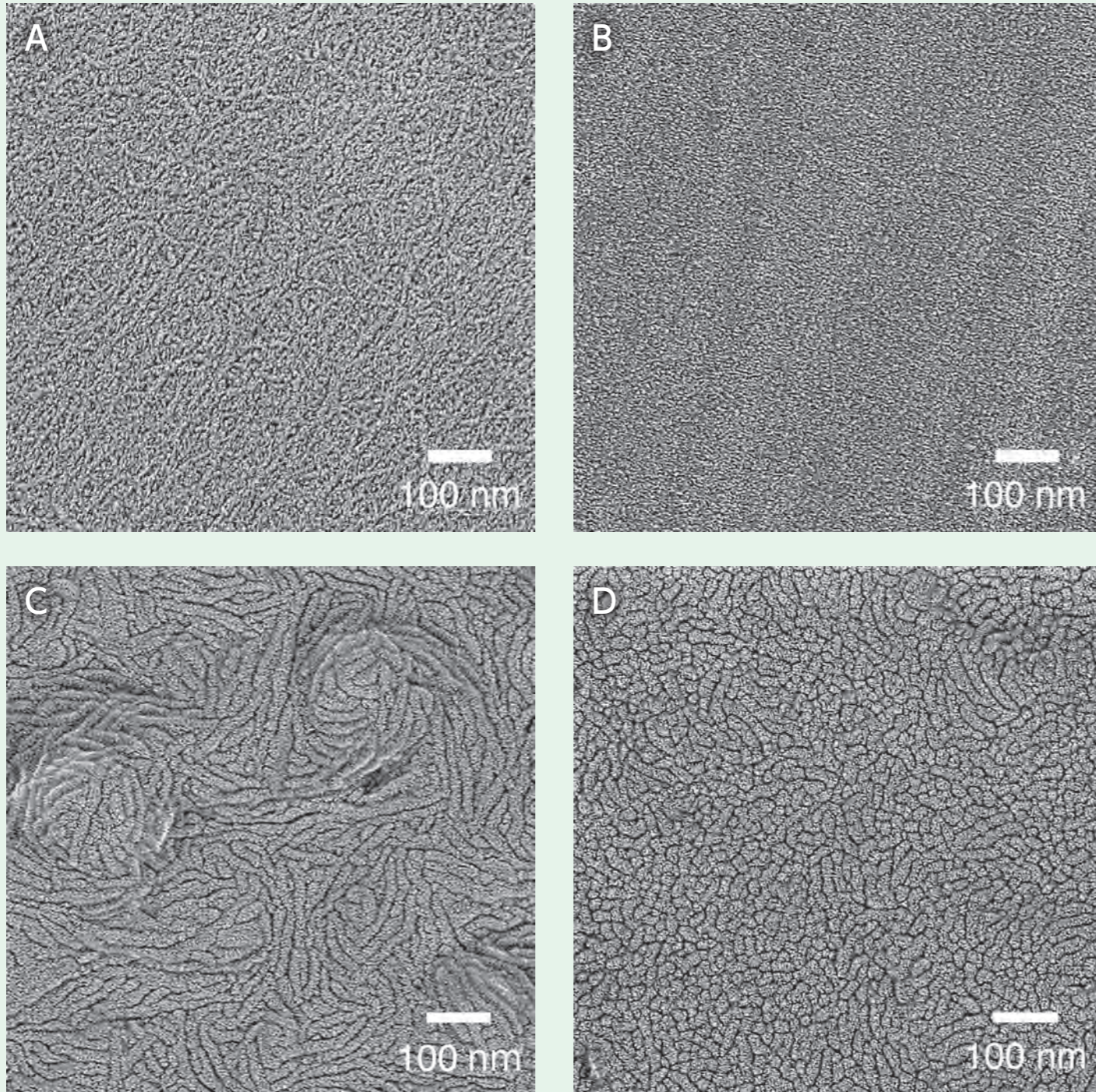


図17. 表面レプリカ法によるTEM観察で得たPETボトルの微細構造の画像例。

A) PETボトルの底部の表面レプリカ画像。ナノサイズの微繊維が観察される。B) PETボトルの最上部の表面レプリカ画像。Aのような微繊維は見られない。C,D) PETボトルのキャップ(ポリプロピレン製)の表面レプリカ画像。Aよりも太い微繊維(径20 nm程度)が観察される。同一のキャップの表面上で、指紋状の配列(C)が観察される場所や、表面に対して鉛直に配列(D)して観察される場所がある。

軟素材であるプラスチックは、これまで表面の観察が難しかったが、表面レプリカ法によりナノ分解能の画像が可能になった。

左ページ(図17)に示したPETボトルの評価例では、素材のプラスチックの表面に白金とカーボンとを真空蒸着して薄膜を作製し、その表面レプリカ膜をTEMで観察しました。プラスチック表面のわずかな凹凸を、

導電性が高く物理的に安定なレプリカ膜に転写することによって、TEMを用いた高分解の観察が可能になりました。

PETボトルのポリエチレンテレフタレート(PET)からなる表面(図17 A, B)と、キャップのポリプロピレン(PP)からなる表面(図17 C, D)について、それぞれの微繊維の配列の様子を観察することに成功しました。プラスチックの結晶性/非晶性や結晶欠陥の構造、あるいは生分解の過程などを画像によって評価する技術として有用と考えられます。

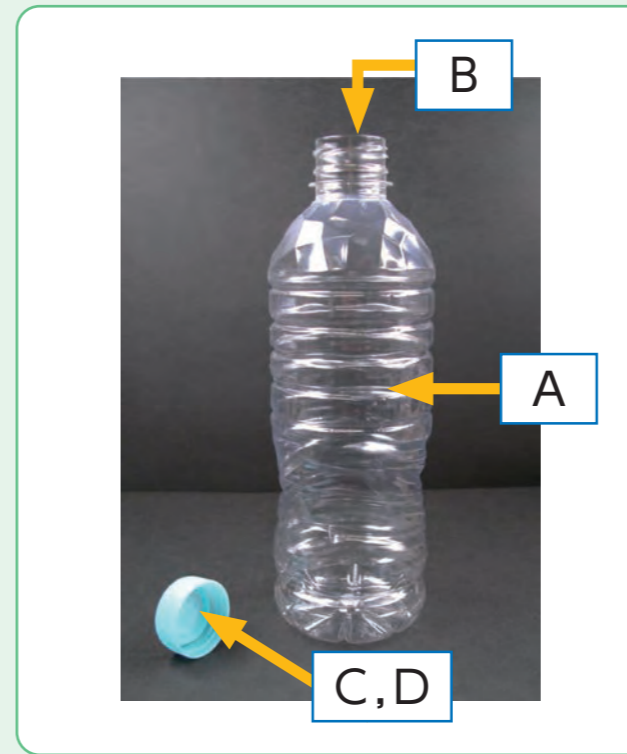


図18. PETボトルの写真。

矢印とA~Dの記号は、それぞれ図17 A-Dの画像の観察に用いたPETボトルとキャップの部位を示す。

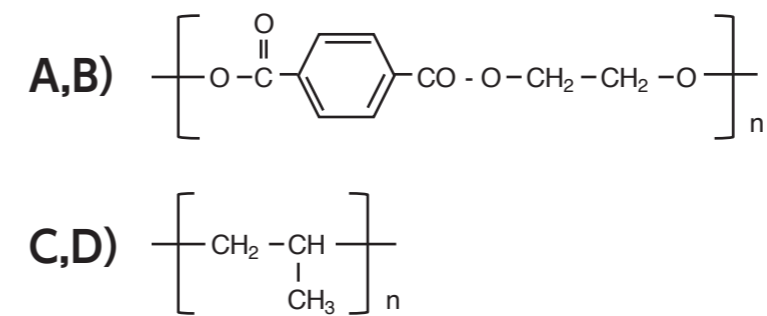


図19. プラスチック素材の構造式。

A, B) PETボトルに用いられているポリエチレンテレフタレート(polyethylene terephthalate, PET)の化学式。C, D) キャップに用いられているポリプロピレン(polypropylene, PP)の化学式。これらの高分子鎖の配列によって、図17の画像で撮影された微繊維の形状が作られる。

熱に強いプラスチック分解酵素を造る タンパク質工学を用いた耐熱性酵素の製造技術

軟素材

表面レプリカ法

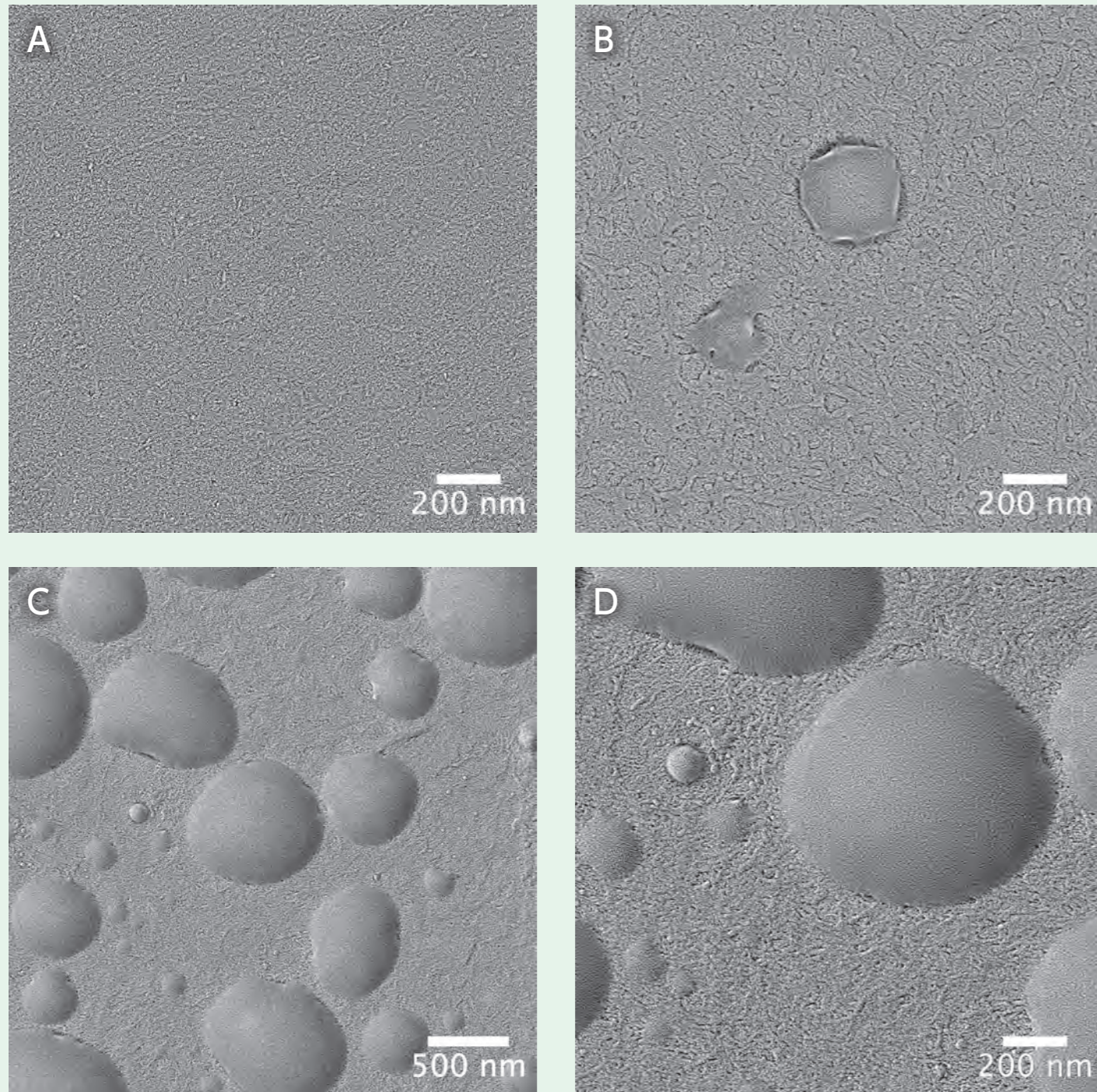


図20. PET分解酵素のはたらきによるPETボトル表面の構造の変化を、表面レプリカ法によってTEM観察した画像例。

A) PETaseを含まないバッファー液中において、60℃の温度で48時間処理したPETボトルの表面レプリカ画像。微繊維が配列した平坦な表面が観察された。B) 耐熱性PETaseを加えた液中で60℃、12時間処理した後の表面レプリカ画像。表面にまだら模様が見えるように変化し、直径100 nm～200 nm程度の粒子が観察された。CおよびD) 耐熱性PETaseを加えた液中で60℃、48時間処理した後の表面レプリカ画像。より大きな直径500 nm～1 μmの粒子が多数観察されるようになった。

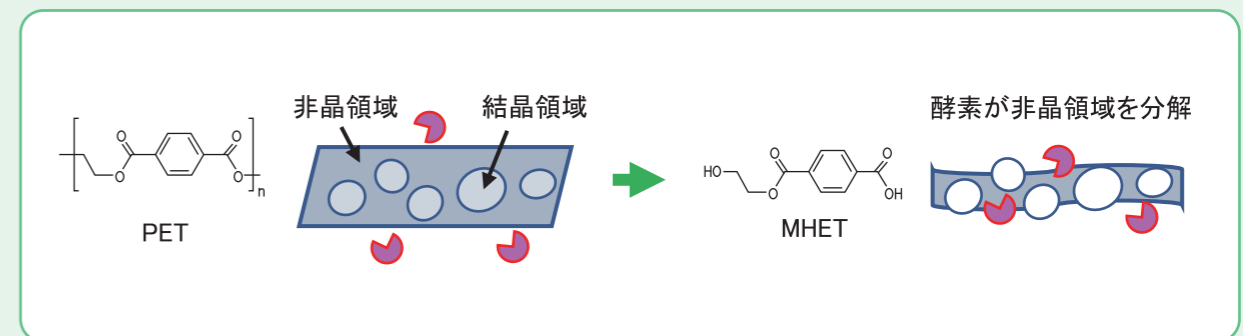
プラスチック表面の構造を見て、酵素反応の確認ができる。
非晶領域の分解が進行することによって、高分子球晶が露出してくる。

PET(ポリエチレンテレフタレート)を主とするプラスチック廃棄物は、環境汚染の一因として問題視されています。PET分解酵素“PETase”を用いると、PETを原料に近い物質に分解ができます。ただ、PET分解に有利な温度の60℃以上では、酵素の機能が失われてしまう点が課題と考えられます。熱に強いPETaseを設計することにより、環境負荷の少ない条件でPETを分解できる、新たな産業用酵素が創出されると期待されます。

産総研バイオメディカル研究部門の峯昇平主任研究員は、熱安定性を高めるための合理的なタンパク質工学戦略を確立しました。その技術をPETaseに適用して、PET分解能力が大幅に改善された新たな耐熱性PETaseの作製に成功しました。

左ページ(図20)に示した表面レプリカ法による評価例では、温度60℃で耐熱性PETaseが働くことによって、PETボトルの表面が分解を受け形状が変化することが確認されました。PETボトルをバッファー液に浸けて、PETaseのない条件での48時間処理では、27ページで紹介したPETボトルの表面(図17 A)と同様の、微繊維が配列した様子が観察されました(図20 A)。

耐熱性PETaseを加えて12時間の処理をすると、表面に不定形のまだら模様が見えるようになり、ところどころに直径100 nm～200 nm程度の粒子が突き出していました(図20 B)。耐熱性PETaseで48時間処理した場合は、より大きな直径500 nm～1 μmの粒子が多数観察されるようになりました(図20 C, D)。PETボトル表面の非晶領域が分解されて、侵食によって内部に存在していた球晶が露出してきたものと考えられます。



本技術の適用により、PETフィルムの親水化やポリエステル繊維の加工による吸水性向上など、材料の高機能化に展開ができると期待されます。また、本タンパク質工学の手法は他の酵素全般にも適用可能であるため、耐熱化が必要な産業用酵素開発に広く活用が期待されます。

生分解性プラスチックの表面の変化

海中での分解の進行がナノサイズでわかる

軟素材

表面レプリカ法

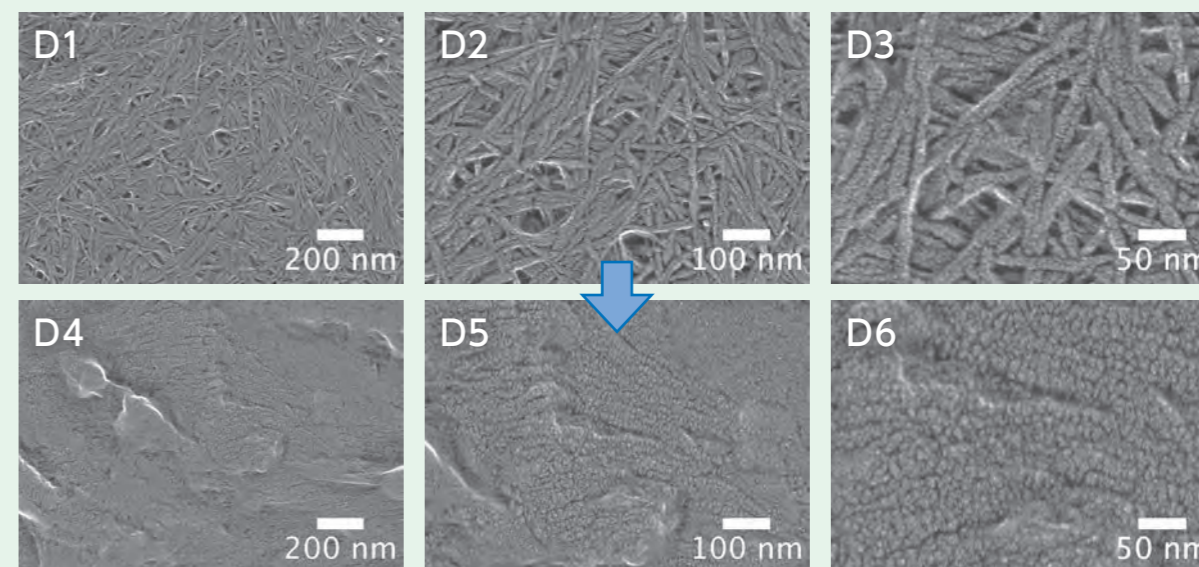
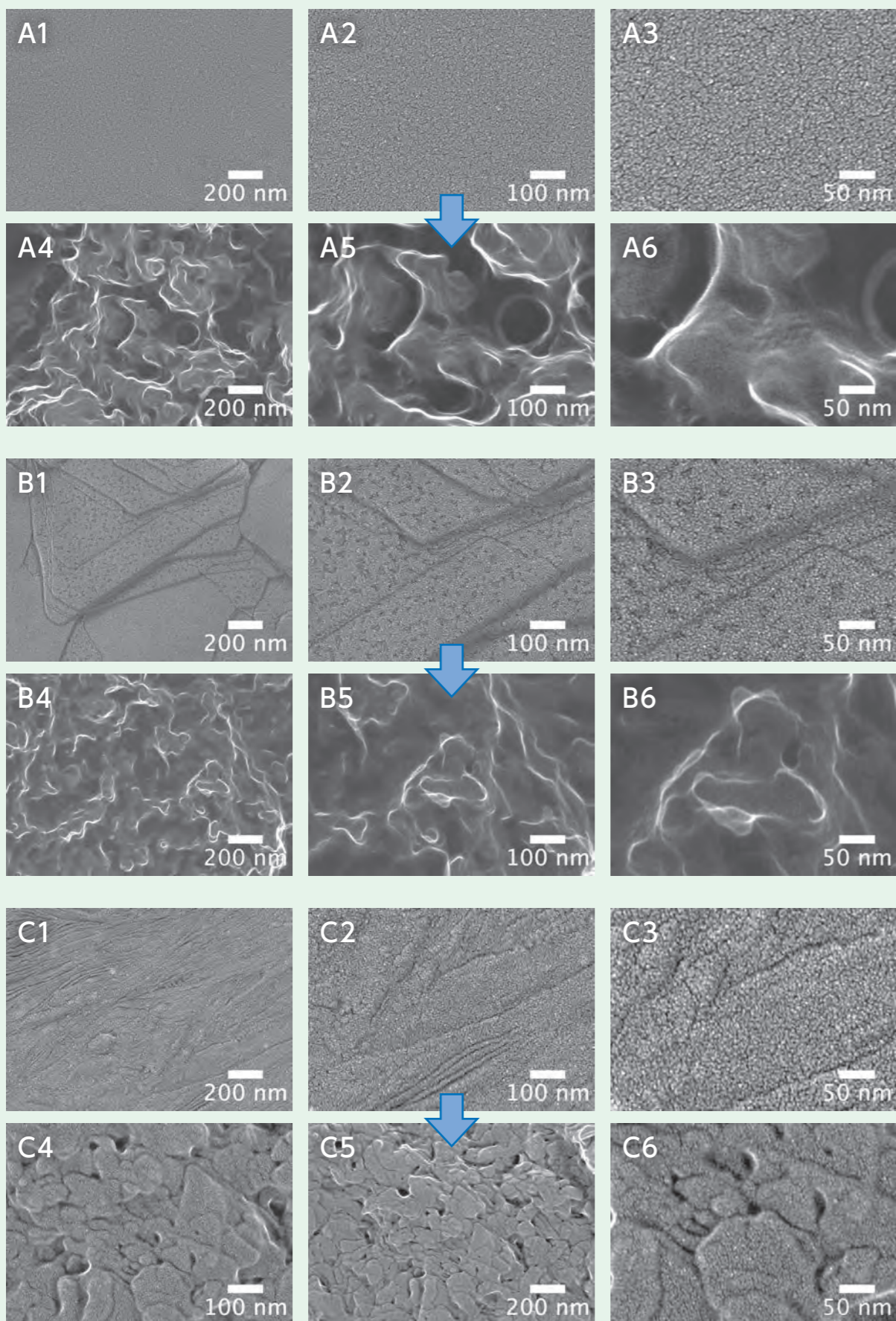


図21. 4種類の生分解性プラスチックA、B、C、およびポリアミド4を大阪湾の海中に浸漬する試験を行い、浸漬前と浸漬後(4週間)の試験サンプルを表面レプリカ法で観察したTEM画像の例。

- A) 浸漬前(A1-3)と浸漬後(A4-6)の生分解性プラスチックAの表面。
- B) 浸漬前(B1-3)と浸漬後(B4-6)の生分解性プラスチックBの表面。
- C) 浸漬前(C1-3)と浸漬後(C4-6)の生分解性プラスチックCの表面。
- D) 浸漬前(D1-3)と浸漬後(D4-6)の生分解性プラスチック、ポリアミド4の表面。

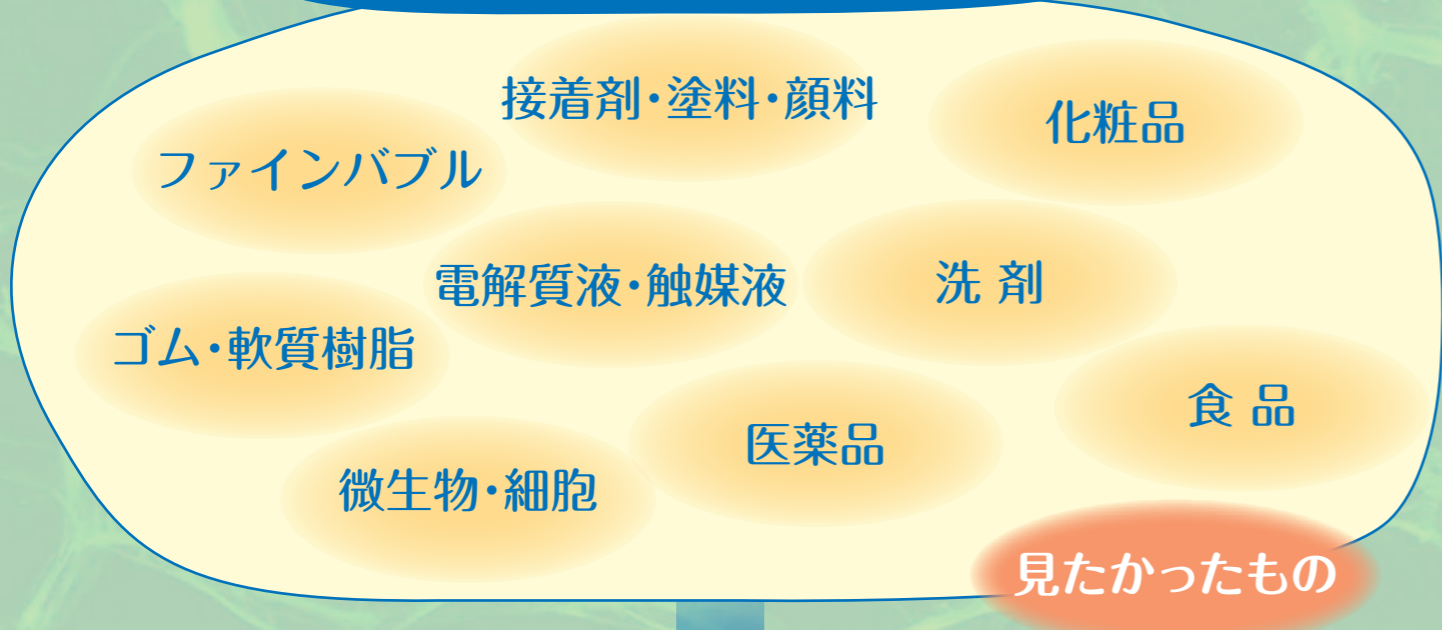
環境中のプラスチックの構造を評価。 新規材料の開発に必要なアイデアを創出。

海洋マイクロプラスチックの課題に向けて、生分解性プラスチックの技術が重要視されています。産総研バイオメディカル研究部門の中山敦好主任研究員と川崎典起主任研究員らは、環境負荷を低減させる材料開発のために、異なる環境条件の海洋に、各種の生分解性プラスチックのサンプルを浸漬し、分解の効率や分解プロセスの解析を実施しています。

そのような浸漬試験の一部について、浸漬前後のサンプルを表面レプリカ法によってTEM観察しました。図21は大阪湾の海中に、4種類の生分解性プラスチックA、B、C、およびポリアミド4を4週間にわたって浸漬したサンプルの結果です。いずれのプラスチックも、海中浸漬によって表面構造が著しく変化しており、それぞれ変化のパターンが異なる様子がわかりました。それだけでなく、浸漬前の時点から、これら4種類の表面がまったく異なっていることも判明しました。

表面レプリカ法による観察は、生分解性プラスチックの解析においても詳細な情報をもたらしてくれます。ナノサイズの構造を把握していることは、新規材料の開発に必要なアイデアの創出につながるでしょう。

身の回りにある**液中素材・軟素材**



品質・機能の
改善や設計に有効!

素材開発のための
重要な評価技術

材料開発を **促進** します。

産総研で培った精緻な評価技術で
貴社も一度微細を見極めませんか?

私たちと一緒に、

産総研の
共同研究

産総研の
技術コンサル
ティング

国立研究開発法人
産業技術総合研究所

2023年3月:関西センター 編

お問合せ・相談窓口

関西センター 産学官連携推進室

Eメール:kansai-counselors-ml@aist.go.jp

https://www.aist.go.jp/kansai/ja/collabo/inquiry_tech.html



※無断転載禁止

AIST Kansai, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology