

急速凍結レプリカ電子顕微鏡法で観察したウルトラファインバブルの形状

Electron microscopic observation of ultrafine bubbles using quick-freezing-replica technique.

川崎一則(AIST), 川崎隆史(AIST), 小林秀彰(IDECC), 前田重雄(IDECC), 西原一寛(IDECC), 藤田俊弘(IDECC)
KAWASAKI Kazunori, KAWASAKI Takashi, NISHIHARA Ikkan, KOBAYASHI Hideaki, MAEDA Shigeo, FUJITA Toshihiro

Abstract Ultrafine bubbles of nitrogen in pure water were examined with quick-freezing-replica electron microscopy. Water samples containing ultrafine bubbles were quick-frozen by a metal-contact method using liquid helium, and were processed to make freeze-fracture replicas for observation with transmission electron microscopy. Ultrafine bubbles were observed as small pits about 10-100 nm on the fractured faces of frozen water. Shape of subpopulation of ultrafine bubbles on ice grain boundaries was elliptical or triangular, suggesting deformation upon exclusion from ice grains. Images of subpopulation of ultrafine bubbles in vitrified ice, on the other hand, was circular. The results demonstrated that shape of ultrafine bubbles in water was spherical.

Keywords: Ultrafine bubbles, Electron microscopy, Freeze fracture

1. はじめに

ファインバブル水を凍結した際にファインバブルは消滅するのか、あるいは、凍結した水(氷)の中にバブルとして残存するのか。一般に、温度が低下すると気体の水への溶解度は大きくなるので、ファインバブル水を冷却すると、溶解度増大がバブルを減少させる方向に働き、バブルは水の凍結の前に消滅する可能性も考えられる。一方、北海道大学の内田努らは、凍結活断レプリカ法によってファインバブルの電子顕微鏡観察を報告しており[1]、このことはファインバブルが凍結に耐性であることを示唆している。本研究では、電子顕微鏡用試料作製方法として最も凍結速度が速い液体ヘリウムによるメタルコンタクト法でファインバブル水を急速凍結し、氷晶形成のない状態でのファインバブルの形状の捕捉を試行した。氷晶形成のある場合との比較によって、ファインバブルの形状に関する考察を行なった。

J. E. Heuser が開発した急速凍結法[2]では、高速度の冷却のために冷媒は液体ヘリウム(-269°C)を用いる。常温の試料を、直接的に液化ガスと接触させたのでは接触部で液化ガスが気化し熱伝導率が低下(熱伝導率 $\ll 1 \cdot \text{W} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$)するので、冷却の効率が悪化する。そこで、予め金属ブロックを液体ヘリウムで冷却した後、試料を金属ブロックに接触させて凍結させる方法を採用。ブロックには熱伝導率の高い純銅($398 \text{W} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$)を用いて、鏡面仕上げに研磨した表面を試料の凍結に用いる。冷却銅ブロックとの接触面から10-20マイクロメートルまでの深さの範囲で、非氷晶の凍結が生じるとされているが、凍結状態には試料条件によって差が生じ得るので、ファインバブル水を用いた検証が必要と考えた。

2. ファインバブル形状把握のための凍結活断レプリカ膜作製

凍結活断レプリカの作製はフリーズ・レプリカ装置を用いて、Fig. 1に示す方法で行なう。急速凍結した試料を真空チャンバー内で-100°C程度に冷却した試料台に設置し、冷却ナイフによって試料の表面近くを切断する。切断の深さは非氷晶凍結の領域の観察を目的として、急速凍結させ

た面から10-20マイクロメートルまでの範囲とする。切断によって露出した面に対して斜め方向(角度45度)に設置した電子銃から白金を蒸着し、試料切断面を被覆する白金薄膜(厚さ約7ナノメートル)を作製する。蒸着の間に試料台をターンテーブルのように回転させることによって、切断面の形状が立体感をもって観察できるような影付けを行なう(ロータリーシャドウ法)。白金薄膜のみでは取り扱いに対する強度が不足であるので、さらに角度90度の位置に設置した電子銃から炭素を重ねて蒸着(厚さ約25ナノメートル)して薄膜を補強する。

ファインバブルが凍結活断を受けた際には内部の空間が露出されて、切断面上に窪みとして現れる。窪みの内部は、周囲に比較して白金の蒸着量が少なくなるため、レプリカ膜の透過電子顕微鏡観察でファインバブルの領域は周囲の氷の領域よりもコントラストが低く観察される。後で示す電子顕微鏡の画像では、コントラストが高い部分を白く、コントラストが低い部分を黒くする画像表示をするため、ファインバブルは周囲よりも黒いコントラストで見ることができる。

本研究では市販のフリーズ・レプリカ装置(Balzers, BAF400D)を用いて、ファインバブル水のレプリカ膜を作製した。ファインバブル水のレプリカ膜の観察は、透過電

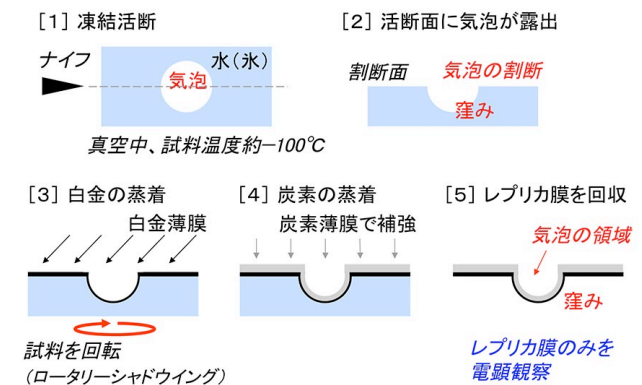


Fig. 1 Procedure for freeze-fracture replication of ultrafine bubbles.

子顕微鏡装置 (FEI 社, Tecnai G2 F20, 加速電圧 200 kV) を用いて高角度環状暗視野-走査透過電子顕微鏡モード (HAADF-STEM モード) で行なった. HAADF-STEM モードでは試料の原子番号のほぼ二乗に比例した画像強度が得られるため, 通常の透過電子顕微鏡法モード (TEM モード) よりも画像データのコントラストが高くなり, 白金のレプリカ膜に転写したマイクロバブルの形状をより鮮明に提示できる. また, HAADF-STEM モードでは TEM モードよりも低倍率での観察が可能であるため, 広い視野のもとでバブルを効率よく探すことが可能である.

3. マイクロバブルのレプリカ観察

まず, マイクロバブルのレプリカ観察の典型例を Fig. 2 に示す. 使用した試料は, 超音波診断用マイクロバブル (「ソナゾイド」, 注射用ペルフルブタン, 平均粒子径 2 μm 程度, 第一三共製薬) である.

マイクロバブルの観察像は, 直径 1-2 μm 程度の円を基本形としており (Fig. 2), 円内が周囲よりも黒く撮影されていること (低いコントラスト) から, 丸い窪みではなく丸い窪みであると像解釈される. これらはマイクロバブルを活断した部分形状を示していると考えられる. 周囲に比較した円内の黒さの度合いは活断で生じたバブルによる窪みの深さを反映しており, Fig. 2a よりも Fig. 2b の円内の方がより黒く見えるのは, 後者のバブルが前者のバブルよりも窪みが深くなる位置で活断されたものと解釈される.

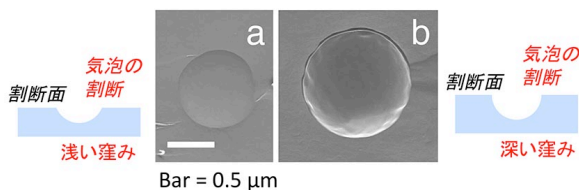


Fig. 2 Representative images of microbubbles observed by quick-freezing-replica electron microscopy.

4. 氷晶形成の影響下でのウルトラファインバブルのレプリカ像

上でみたように急速凍結レプリカ法によってマイクロバブルの形状を観察することができたので, 同方法によってウルトラファインバブルの観察を行なうことも可能と期待された. 超純水を原水として窒素ガスを使用して製造したウルトラファインバブル水について, 急速凍結レプリカ法による電子顕微鏡観察を行なった.

急速凍結を液体ヘリウムによるメタルコンタクト法で行なった場合でも, 常に均一な非氷晶凍結がなされるのではなく, 試料の場所によって氷晶凍結の領域と非氷晶凍結の領域が混在している. 実際の観察では, しばしば氷の活断面上に長い線が形成されている様子を遭遇する. 氷晶形成の過程では氷晶の粒と粒が接する境界 (粒界) が生じており, これら結晶方位が変化する部分が線として現れたものと考えられる.

粒界線の影響が及んでいると思われる観察例を, Fig. 3 に示した. Fig. 3a では, 数十 nm 程度の丸い窪みが撮影されており, これらはウルトラファインバブルが凍結活断されて露出した窪みであると考えられる. 4 個のバブルが粒界線 (矢印) の上に一列に並んでいる様子が見える. Fig. 3b

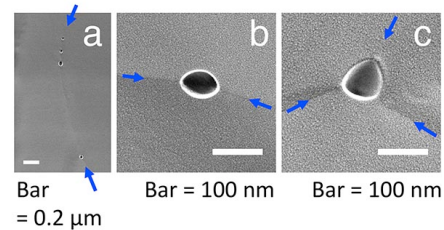


Fig. 3 Representative images of ultrafine bubbles on ice grain boundary observed by quick-freezing-replica electron microscopy.

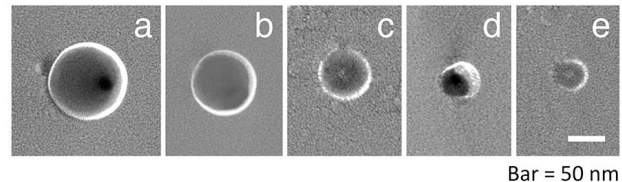


Fig. 4 Representative images of ultrafine bubbles in vitrified ice observed by quick-freezing-replica electron microscopy.

のように粒界線の方向に長くなった楕円状のバブルが観察されたり, また, Fig. 3c のように粒界三叉交線の上では三角形状のバブルが観察されたりする様子から, ウルトラファインバブルが粒界によって変形を受けていることが示唆される.

これら Fig. 3 の画像は, 氷晶の生じた凍結領域ではウルトラファインバブルが粒界に優先的に存在する傾向を示唆している. 微氷晶が形成される過程でウルトラファインバブルは消滅することなく, 氷晶の形成された空間から排除され粒界に集められた結果であると推測される. 凍結過程におけるバブルの粒径や濃度等の定量的な変化については, 今後の課題である. 氷晶凍結においてウルトラファインバブルが粒界線に濃縮される傾向は, 顕微鏡の視野の中で粒界線に集中して観察をすればバブルをより容易に見出すことができるため, バブルの検出作業にとっては有用である.

5. 非氷晶凍結領域でのウルトラファインバブルのレプリカ像

非氷晶の場合には, ウルトラファインバブルの状態はどのように観察されるのだろうか. 広い視野範囲に渡って粒界線が見つからない領域は, 非氷晶凍結の条件での観察が期待される. 粒界線の出現していない凍結活断面上におけるウルトラファインバブルの像を, Fig. 4 に示す. ウルトラファインバブルが活断されて露出した窪みの輪郭 (二次元像) は, いずれも円状であった. このことは, 非氷晶条件で凍結されていれば, ウルトラファインバブル自体は球状であることを示している.

ウルトラファインバブルの形状把握のためには, 非氷晶凍結領域からの画像データでの確認が有用であることが明らかになった.

参考文献

- [1] Uchida, T. et al., Nanoscale Res. Lett. Vol. 6, 295 (2011).
- [2] Heuser, J.E. J. Mol. Biol. Vol. 169, 155-195 (1983).